



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**O papel das enzimas quitinase e catepsina na patologia viral de
baculovírus**

ANABELE AZEVEDO LIMA

Brasília, 2013.



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

O papel das enzimas quitinase e catepsina na patologia viral de baculovírus

ANABELE AZEVEDO LIMA

Orientador: Dr. Bergmann Morais Ribeiro

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito parcial para à obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular.

Brasília, 2013.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de Brasília. Acervo 1006047.

L732p Lima, Anabele Azevedo.
O papel das enzimas quitinase e catepsina na patologia viral dos baculovírus / Anabele Azevedo Lima. -- 2013. xvi, 149 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) - Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, Pós-Graduação em Patologia Molecular, 2013. Inclui bibliografia.
Orientação: Bergmann Morais Ribeiro.

1. Agentes no controle biológico de pragas. 2. Baculoviroses. 3. Fungos como agentes no controle biológico de pragas. 4. Soja. 5. Enzimas.
I. Ribeiro, Bergmann Morais. II. Título.

CDU 632.937.16

ANABELE AZEVEDO LIMA

O papel das enzimas quitinase e catepsina na patologia viral de baculovírus

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito parcial para à obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro

Universidade de Brasília (UnB)

Profª Dr. Jose Luiz Caldas Wolff

Universidade Presbiteriana Mackenzie

Dra. Marlinda Lobo De Souza

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN)

Profª Dra. Rita de Cássia Pereira Carvalho

Universidade de Brasília (UnB)

Profº Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Universidade de Brasília (UnB)

MEMBRO SUPLENTE:

Profº Dr. Renato de Oliveira Resende

Universidade de Brasília (UnB)

*“A força não provém da capacidade física
e sim de uma vontade indomável”*

Mahatma Gandhi

Aos meus pais, Luetil e Fátima, por todos os esforços atribuídos à minha formação profissional e principalmente à formação humana, bem como pelos incentivos, amor e confiança. Amo vocês!

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar a minha vida e o meu caminho, pela proteção e por me dar forças para lutar pelo que acredito.

À minha querida família, pela confiança, pelo apoio, pelo amor e compreensão.

Ao meu querido e admirável orientador, Prof^o Dr. Bergmann Morais Ribeiro, principalmente por ter proporcionado essa experiência em minha vida, por acreditar em mim, pela ajuda sempre que necessária, pelo carinho, atenção, pelas dicas e conselhos e pelo incentivo. Serei eternamente grata!!

As amigadas que carrego em meu coração, fundamentais na minha vida!! São elas: Aline (e Luísa), Gláucinha (e sua linda família), Susane, Bruno, Ana Paula, Lorrainy, Bernardo, Clarinha (e Samuel), Érica, Paulo, Maria, Dani, Ana Carolina, Brianinha, Lorena e Breno. Muito obrigada por fazerem parte da minha vida!! Cada um com a seu jeito de ser onde o respeito sempre predomina.

Aos amigos do laboratório, Mariana Senna, Fábria, Daniel, Leonardo, Fernando, Fabrício, todos os estagiários, que muito me ensinaram (e continuo aprendendo...), principalmente pela convivência agradável que encontramos no nosso laboratório e por contribuírem com o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos membros da banca por aceitarem gentilmente a participar da minha Defesa de Tese e por contribuírem para o melhoramento do trabalho.

A Dra Maria Elita B. de Castro, sou muito grata, por toda ajuda quando solicitada, pelo carinho e confiança.

À Universidade de Brasília pela oportunidade de crescimento profissional.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

O papel das enzimas quitinase e catepsina na patologia de baculovírus

RESUMO

O Brasil destaca-se por ser um dos maiores exportadores de produtos agrícolas no mundo e diante dessa realidade a utilização de agrotóxicos impacta tanto o meio ambiente quanto a saúde pública. Uma alternativa a essa prática é a utilização de agentes biológicos no controle de pragas. Um exemplo é a utilização do baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) no controle da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*, sendo o maior exemplo mundial de sucesso de um vírus utilizado como bioinseticida. Os baculovírus são vírus de DNA fita dupla, específicos de artrópodes. Uma das características apresentada no genoma viral do isolado AgMNPV-2D está na ausência dos genes quitinase (*chiA*) e catepsina (*v-cath*). Essa ausência pode ser responsável por não ocorrer a liquefação e a melanização das larvas de *A. gemmatalis* mortas pela infecção com o AgMNPV-2D. O capítulo I do presente trabalho teve como objetivo analisar o efeito da expressão dessas proteínas em insetos infectados com AgMNPV recombinantes contendo esses genes derivados de dois baculovírus (*Choristoneura fumiferana defective nucleopolyhedrovirus* - CfDefNPV e *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* - AcMNPV). O vírus recombinante, contendo os genes *chiA* e *v-cath* provenientes do baculovírus CfDefNPV, (vAgp2100Cf.*chiA/v-cath*) foi capaz de promover a liquefação e melanização do corpo das larvas de *A. gemmatalis* após a morte das mesmas, entretanto, o vírus vAgp2100Ac.*chiA/v-cath*, construído neste trabalho, não teve o mesmo efeito. Bioensaios com larvas neonatas e de terceiro instar de *A. gemmatalis* infectadas com o vírus recombinante vAgp2100Cf.*chiA/v-cath* apresentaram uma maior atividade inseticida. A CL₅₀ do vírus recombinante foi de 3 (para larvas neonatas) a 4 vezes (para larvas de 3º estágio) menor do que a CL₅₀ do vírus selvagem. A expressão dos genes *chiA* e *v-cath* durante a infecção de células de inseto pelo vírus recombinante foi analisada por qPCR e detectou a presença e aumento de transcritos dos genes a partir de 6 h até 72 h p.i. Outro exemplo à prática de utilização de agentes biológicos no controle de inseto-praga destaca-se o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. O capítulo II do presente trabalho propôs avaliar se a expressão de enzimas quitinase do fungo durante a infecção do vírus é capaz de aumentar a patogenicidade viral em larvas de *Spodoptera frugiperda*. Foi construído um vírus recombinante inserindo o gene de uma quitinase (*chi2*) do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* no genoma do vírus AcMNPV, para avaliar o efeito da expressão heteróloga na patogenicidade do vírus recombinante. A CL₅₀ apresentada pelo vírus recombinante sugere um aumento na virulência quando comparado com o vírus selvagem e a quantidade de enzima detectada também apresentou maiores níveis em células de inseto infectadas com o vírus recombinante comparado ao vírus selvagem.

Palavras-chave: Baculovírus, gene *chiA*, gene *v-cath*, fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*.

The role of chitinase and cathepsin enzymes in pathology of baculovirus

ABSTRACT

Brazil stands out for being one of the largest exporters of agricultural products in the world, therefore the use of pesticides impacts on both the environment and public health. An alternative to this practice is the use of biological agents to control pests. An example is the use of baculovirus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) in the control of velvetbean caterpillar, *A. gemmatalis*, which is the greatest global example of successfully using a virus as a bio-insecticide. Baculoviruses are arthropod-specific double-stranded DNA viruses. One of the interesting features of the AgMNPV-2D isolate viral genome is the absence of chitinase (*chiA*) and cathepsin (*v-cath*) genes. This absence can be responsible for the lack of liquefaction and larval melanization in *A. gemmatalis* killed by AgMNPV-2D infection. Chapter I of this study intended to analyze the effect of these proteins expression in insects infected by recombinant AgMNPV containing these genes derived from two baculovirus (*Choristoneura fumiferana defective nucleopolyhedrovirus* - CfDefNPV e *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* - AcMNPV). The recombinant viruses containing the genes *v-cath* and *chiA* from the baculovirus CfDefNPV (vAgp2100Cf.chiA/v-cath) was able to promote the liquefaction and melanization of *A. gemmatalis* larvae bodies after their death, although the vAgp2100Ac.chiA/v-cath virus prepared in this study, did not present the same effect. Bioassays with third-instar neonate larvae of *A. gemmatalis* infected with the vAgp2100Cf.chiA/v-cath recombinant virus showed higher insecticidal activity. The LC₅₀ of the recombinant virus was from 3 (for neonate larvae) to 4 times (for 3rd larval stage) lower than the LC₅₀ of the wild-type virus. The expression of *v-cath* and *chiA* genes during infection of insect cells by the recombinant virus was analyzed by qPCR, which detected both the presence and the increase of gene transcripts from 6 h to 72 h p.i. Another noteworthy example of the practical use of biological agents to control insect pest is the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Chapter II of this study aimed to assess whether the expression of fungal chitinase enzymes during viral infection is able to increase viral pathogenicity in larvae of *Spodoptera frugiperda*. Constructs was made inserting a chitinase gene (*chi2*) from the entomopathogenic fungus *M. anisopliae* into the genome of AcMNPV virus, in order to evaluate the effect of heterologous expression in the recombinant virus pathogenicity. The LC₅₀ presented by the recombinant virus suggests an increase in virulence when compared to wild type virus and the amount of enzyme also showed the highest levels detected in insect cells infected with recombinant virus compared to wild virus.

Keywords: Baculovirus, *chiA* gene, *v-cath* gene, entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Plantação de soja.....	4
Figura 2: Taxonomia da família Baculoviridae.....	10
Figura 3: Estrutura de um vírus extracelular (BV) produzido por um baculovírus do grupo dos NPVs.	11
Figura 4: Estrutura de um vírus derivado da oclusão (ODV).....	12
Figura 5: Ciclo de infecção do baculovírus em uma larva de lepidoptera.	14
Figura 6: Entrada dos ODVs no epitélio do intestino médio de uma larva de lepidoptera.	16
Figura 7: Efeitos citopáticos da infecção de um baculovírus em uma célula permissível.	17
Figura 8: Molécula de quitina.....	21
Figura 9: Larvas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> (4°/5° ínstar)	28
Figura 10: Fragmento amplificado por PCR, a partir do plasmídeo p2100Cf.chiA/v-cath, para construir o plasmídeo p2100Cf.v-cath.ΔchiA	35
Figura 11: Fragmento amplificado por PCR a partir do plasmídeo p2100Cf.chiA/v-cath para construir o plasmídeo p2100Cf.chiAΔv-cath.....	36
Figura 12: Esquema ilustrativo da construção e do isolamento do baculovírus recombinante vAgp2100Ac.chiA/v-cath pelo método de recombinação homóloga.	38
Figura 13: Esquema dos eventos de recombinação baseado no sistema Gateway	49
Figura 14: Mapa do plasmídeo pDONR™207 (Invitrogen).	50
Figura 15: Mapas do plasmídeos pDONRCf.chiA e pDONRCf.v-cath	52
Figura 16: Mapa do plasmídeo pDEST™17 (Invitrogen).....	53
Figura 17: Mapa dos plasmídeos pDESTCf.chiA e pDESTCf.v-cath.....	55
Figura 18: Mapa dos plasmídeos amplificados com a deleção dos genes <i>chiA</i> e <i>v-cath</i> .59	
Figura 19: Gel de agarose (0,8%) mostrando os produtos de PCR amplificados a partir de oligonucleotídeos específicos para a deleção dos genes <i>chiA</i> e <i>v-cath</i>	59
Figura 20: Confirmação da inserção dos genes <i>chiA</i> and <i>v-cath</i> de AcMNPV no genoma do AgMNPV.....	61
Figura 21: Análise estrutural da infecção de células UFL-AG-286 pelo vAgp2100Ac.chiA/v-cath.....	62
Figura 22: Análise estrutural de larvas de <i>A. gemmatalis</i> infectadas com o vírus selvagem e o vírus recombinante.	63
Figura 23: Amplificação dos genes <i>chiA</i> e <i>v-cath</i> com os oligonucleotídeos específicos para PCR em tempo real.	64
Figura 24: Média da expressão temporal do gene <i>v-cath</i>	66
Figura 25: Média da expressão temporal da <i>chiA</i>	67
Figura 26: Produção de corpos de oclusão em larvas de <i>A. gemmatalis</i> infectadas com os vírus selvagens e o recombinante	69
Figura 27: Análise da atividade quitinolítica.....	71
Figura 28: Atividade proteolítica a partir dos poliedros e da hemolinfa produzidos pelos vírus recombinante e selvagem, assim como, do extrato de células de inseto.	73
Figura 29: Amplificação do gene <i>chiA</i> a partir do plasmídeo p2100Cf.chiA/v-cath utilizando oligonucleotídeos attBQuit F e attBQuit R.	75
Figura 30: Esquema ilustrativo da construção do plasmídeo pDONRCf.chiA pelo método de recombinação homóloga.....	76
Figura 31: Confirmação da construção do plasmídeo pDONRCf.chiA.....	77

Figura 32: Amplificação do gene <i>v-cath</i> a partir do p2100Cf.chiA/ <i>v-cath</i> utilizando oligonucleotídeos attBCath F e attBCath R.....	78
Figura 33: Esquema ilustrativo da construção do plasmídeo pDONRCf. <i>v-cath</i> pelo método de recombinação homóloga.....	79
Figura 34: Confirmação da construção do plasmídeo pDONRCf. <i>v-cath</i>	80
Figura 35: Esquema ilustrativo da construção do plasmídeo pDESTCf. <i>chiA</i> pela reação de recombinação LR.....	82
Figura 36: Esquema ilustrativo da construção do plasmídeo pDESTCf. <i>v-cath</i> pela reação de recombinação LR.....	83
Figura 37: Confirmação da construção dos plasmídeos pDESTCf.chiA e pDESTCf. <i>v-cath</i> pelo perfil de restrição.....	84
Figura 38: Análise da expressão das proteínas ChiA e V-CATH em <i>E. coli</i>	85
Figura 39: Mapa do plasmídeo PUC:: <i>chi2</i>	101
Figura 40: Mapa do plasmídeo pFB1/Acc1-PSX.....	103
Figura 41: Esquema mostrando os diferentes passos para construção de baculovírus recombinantes usando o sistema Bac-to-Bac	107
Figura 42: Perfil de restrição do plasmídeo pUC:: <i>chi2</i>	111
Figura 43: Mapa da construção do plasmídeo pGem. <i>chi2f</i>	112
Figura 44: Confirmação da construção do plasmídeo pGem. <i>chi2f</i>	113
Figura 45: Esquema ilustrando a construção do plasmídeo pPSX. <i>chi2f</i>	114
Figura 46: Confirmação da construção do plasmídeo pPSX. <i>chi2f</i>	115
Figura 47: Amplificação e clonagem dos genes <i>chi1</i> e <i>chi2</i> de <i>M. anisopliae</i> no vetor p2100.....	116
Figura 48: Esquema da construção do plasmídeo p2100.chi2f.....	117
Figura 49: Esquema da construção do plasmídeo p2100.chi1f.....	118
Figura 50: Confirmação da construção dos plasmídeos p2100.chi2f e p2100.chi1f. ...	119
Figura 51: Confirmação da transposição do gene <i>chi2</i> para o DNA do bacmídeo.....	120
Figura 52: Esquema da construção do vírus vAc. <i>chi2f</i>	121
Figura 53: Análise estrutural de células de inseto infectadas com o vírus recombinante vAc.chi2f	122
Figure 54: Análise da atividade quitinolítica	124
Figura AII.1: Curvas de amplificação de cada diluição seriada dos gene <i>chiA</i> e <i>v-cath</i>	146
Figura AII.1: Curvas padrão para os genes <i>chiA</i> e <i>v-cath</i>	147
Figura AIII.1: Parte da sequência do plasmídeo pDEST. <i>chiA</i>	148

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista dos plasmídeos utilizados no Capítulo I.....	32
Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados nas PCR para deleção dos genes quitinase e catepsina	34
Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados nas PCR para detecção dos genes <i>chiA</i> e <i>v-cath</i> do AcMNPV no DNA do vírus recombinante construído.....	40
Tabela 4: Sequência de oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR em Tempo Real do vírus selvagem AcMNPV e do recombinante AgMNPV	41
Tabela 5: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos genes quitinase e catepsina que deram origem aos vetores de expressão das proteínas recombinantes.	50
Tabela 6: Concentração letal média (CL ₅₀) para larvas neonatas de <i>A. gemmatalis</i> infectadas oralmente com poliedros dos vírus AgMNPV e vAgp2100Cf.v- <i>chiA</i> /v- <i>cath</i>	68
Tabela 7: Concentração letal média (CL ₅₀) para larvas no 3º ínstar de <i>A. gemmatalis</i> infectadas oralmente com poliedros dos vírus AgMNPV e vAgp2100Cf.v- <i>chiA</i> /v- <i>cath</i>	69
Tabela 8: Lista dos plasmídeos utilizados no Capítulo II.	98
Tabela 9: Lista dos vírus utilizados no Capítulo II.	100
Tabela 10: Oligonucleotídeos utilizados nas ampliações dos genes <i>chi2</i> do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i>	102
Tabela 11: Oligonucleotídeos utilizados nas ampliações dos genes <i>chi1</i> e <i>chi2</i> do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i>	105
Tabela 12: Concentração letal média (CL ₅₀) para larvas neonatas de <i>S. frugiperda</i> infectadas oralmente com poliedros dos vírus AcMNPV e vAc. <i>chi2</i> f.	123
Tabela IV.1: Dados obtidos a partir dos bioensaios feitos com larvas de <i>A. gemmatalis</i> em relação a produção de corpos de oclusão obtidos com os respectivos vírus...	149

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Amp	ampicilina
BSA	albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
CL ₅₀	Concentração letal média
TL ₅₀	Tempo letal médio
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
dNTP	Deoxinucleotídeos
HCl	ácido clorídrico
Kb	quilobase = 1000 pares de base
KDEL	possível sinal de localização no retículo endoplasmático (K - Lisina, D - ácido aspártico, E - ácido glutâmico e L - leucemia).
L	litro
M	molar: mol/L
mg	miligrama
µg	micrograma
min	minuto
mL	mililitro
µL	microlitro
mm	milímetro
mM	milimolar
µM	micromolar (micromol por litro)
NaCl	Cloreto de sódio
ng	nanograma
nm	nanômetro
nt	nucleotídeo
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
pfu	unidade formadora de placa
pH	potencial de hidrogênio
RNA	ácido ribonucléico
SDS	dodecilsulfato de sódio

Tris	tris (hidroximetil) aminometano
g	grama
h	hora
h p.i.	horas após infecção
U	unidade de enzima
°C	grau Celsius
s	segundo
OB	<i>occlusion body</i> – corpos de oclusão
ORF	<i>open reading frame</i>

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	vii
RESUMO	viii
The role of chitinase and cathepsin enzymes in pathology of baculovirus	ix
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
SUMÁRIO.....	xv
INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
1. Plantações de interesse econômico atingidas pelos insetos praga <i>Anticarsia gemmatalis</i> e <i>Spodoptera frugiperda</i>	4
1.1 Sojicultura.....	4
1.2 Outras culturas de interesse econômico	6
2. Baculovírus	7
2.1 Taxonomia.....	7
2.2 Citopatologia.....	12
2.3 Regulação da expressão gênica.....	17
2.4 Sistema de expressão dos Baculovírus.....	18
3. Quitinases.....	20
4. Cisteíno-proteases.....	24
CAPÍTULO I.....	27
“Efeito da expressão das proteínas heterólogas quitinase (ChiA) e catepsina (V-CATH) em larvas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> infectadas por baculovírus <i>Anticarsia gemmatalis</i> MNPV recombinantes”	27

1. INTRODUÇÃO	27
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo Geral.....	30
2.2 Objetivos Específicos.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Linhagens celulares de inseto, vírus e larvas de insetos utilizadas.....	31
3.2 Plasmídeos com genes de baculovírus utilizados	32
3.3 Construção do baculovírus recombinante vAgp2100Ac.chiA/v-cath.....	36
3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real.....	40
3.5 Bioensaios.....	42
3.6 Análise da atividade quitinolítica.....	44
3.7 Análise da atividade proteolítica.....	46
3.8 Produção de antisoro para analisar a expressão das proteínas recombinantes ..	48
4 RESULTADOS	58
4.1 Análise dos genes <i>chiA</i> e <i>v-cath</i> , dos baculovírus AcMNPV e CfDefNPV	58
4.2 Construção e confirmação dos vírus recombinantes AgMNPV	60
4.3 Análise do efeito causado pelo vírus recombinante vAgp2100Ac.chiA/v-cath em larvas de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	62
4.4 Análise da expressão temporal dos genes <i>chiA</i> e <i>v-cath</i> do CfDefNPV em células de inseto.....	64
4.5 Bioensaios.....	68
4.6 Análise enzimática	70
4.7 Construção dos plasmídeos para expressão das proteínas <i>chiA</i> e <i>v-cath</i> em <i>E. coli</i>	74
4.8 Análise da expressão das proteínas ChiA e V-CATH em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e imuno-deteção	84
5 DISCUSSÃO.....	86
CAPÍTULO II.....	94
“Análise da ação de quitinases do fungo entomopatogênico <i>Metarhizium anisopliae</i> , como inseticida contra larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> infectadas por baculovírus recombinante”	94
1 INTRODUÇÃO	94
2 OBJETIVOS	97

2.1 Objetivo Geral.....	97
2.2 Objetivos Específicos.....	97
3 MATERIAIS E MÉTODOS	98
3.1 Linhagens celulares e larvas de insetos.....	98
3.2 Construção de plasmídeos recombinantes contendo os genes <i>chi1</i> e <i>chi2</i> de <i>Metarhizium anisopliae</i>	100
3.2 Construção de vírus recombinante	106
3.3 Bioensaios.....	109
3.4 Análise da atividade quitinolítica.....	109
4 RESULTADOS	111
4.1 Confirmação da construção do plasmídeo pGem.chi2f	111
4.2 Construção de vírus recombinantes	120
4.3 Bioensaios.....	122
4.4 Análise enzimática	123
5 DISCUSSÃO.....	125
PERSPECTIVAS.....	129
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130
ANEXOS.....	145
Anexo I – Artigo submetido à revista Plos One.....	145
Anexo II - Gráficos preparados para os ensaios de qRT-PCR:	146
Anexo III - Sequenciamento do plasmídeo pDEST. <i>chiA</i>	148
Anexo IV – Quantidade de OB/g em larvas de <i>A. gemmatalis</i> no início do terceiro ínstar, infectadas com os baculovírus AgMNPV-LDB80, AgMNPV-2D e com o vírus recombinante vAgp2100Cf.chiA/v-cath por bioensaios	149

INTRODUÇÃO GERAL

Por séculos, a agricultura vem acompanhando o desenvolvimento da humanidade. O Brasil é o terceiro maior exportador de produtos agrícolas no mundo e nos últimos anos, o país aumentou sua produtividade (Bolliger, 2012) e essa atividade movimentou bilhões de reais por ano (Ministério da Agricultura, 2012). Junto a essa prática, o uso indiscriminado de agrotóxicos está causando impactos tanto no âmbito da saúde pública, como ambiental, atingindo o solo e mananciais de água com esses resíduos (Peres, 2001).

O consumo de agrotóxicos no Brasil é muito alto e quase não existem fiscalização e orientação com relação ao controle da utilização desses resíduos tóxicos no campo. Vários estudos mostram a relação entre o perigo da ingestão de alimentos contaminados por agrotóxicos a saúde humana (Peres, 2001). Uma alternativa ao uso de agrotóxicos no campo para o controle de pragas é a utilização de agentes biológicos, como os microorganismos, que são mais específicos e menos danosos ao meio ambiente em geral.

Atualmente, o meio ambiente está associado à prática de desenvolvimento sustentável, sendo um assunto que cresce a cada dia, e tratando-se da agricultura do país, o controle biológico de insetos praga vem assumindo uma posição de destaque. Existe uma ampla disponibilidade de microorganismos utilizados nesse controle de pragas, como por exemplo, microrganismos entomopatogênicos que apresentam alta patogenicidade para os insetos alvo, assim como, o desenvolvimento de plantas transgênicas por manipulação genética de genes que codificam proteínas com ação

inseticida, para o desenvolvimento de uma linhagem resistente a pragas agrícolas que apresentem valor econômico (Secchi *et al.*, 2002).

Entre os métodos aplicados ao controle biológico de pragas destaca-se a utilização de produtos à base de vírus, principalmente os baculovírus (Souza *et al.*, 2002). O baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) é capaz de controlar populações de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae), uma importante praga da soja que provoca o desfolhamento da soja. Como bioinseticida, os baculovírus podem ser aplicados em forma de pó (um produto formulado) sobre a cultura para serem ingeridos pelos insetos-alvo. Esses vírus apresentam algumas vantagens como bioinseticida, como por exemplo, apresentam ação específica sobre o inseto alvo e são considerados um método seguro para o manuseio, além de, não poluírem o meio ambiente (Ramachandran *et al.*, 2001). Entretanto, existem algumas limitações do uso desses vírus por ser pouco utilizado nas lavouras, além do longo período entre a infecção e a morte do inseto alvo, permitindo assim, que o inseto ainda cause danos à lavoura antes de sua morte.

Desde a década de oitenta, a eficiência da utilização de vírus nos programas de controle de insetos praga no Brasil tem sido demonstrada. Alguns programas de controle biológico são aplicados no Brasil em culturas como a soja, milho e mandioca, controladas com os baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV), *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) e *Erinnyis ello granulovirus* (EeGV), respectivamente. Outros vírus têm sido isolados de pragas com potencial de uso nas culturas como a cana-de-açúcar, algodão, trigo, arroz, frutíferas, hortaliças, pastagens e florestas (Ribeiro *et al.*, 1998).

A utilização da Engenharia Genética permitiu a construção de baculovírus recombinantes visando melhorar sua virulência pela inserção de diferentes genes codificantes de proteínas inseticidas (Ghosh *et al.*, 2002) no genoma dos baculovírus, consequentemente aumentando a patogenicidade viral contra seus hospedeiros, para futuras aplicações nos programas de controle biológico.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Plantações de interesse econômico atingidas pelos insetos praga

Anticarsia gemmatalis e *Spodoptera. frugiperda*

1.1 Sojicultura

Atualmente, a prática de cultivo da soja (*Glicine max* (L.) Merrill) (Figura 1) se expandiu pelo mundo apresentando diferenças genéticas, devido a cruzamentos naturais e artificiais, com relação aos seus ancestrais que lhe deram origem na costa leste da Ásia, na China. A soja sempre fez parte da dieta da antiga civilização chinesa. O ocidente ignorou o seu cultivo até a segunda década do século vinte, quando os Estados Unidos (EUA) iniciou sua exploração comercial. A partir de 1941, a produção de grãos cresceu de forma exponencial no Brasil e em outros países das Américas, até que o Brasil se tornou o segundo produtor de soja, responsável por 26,8% da safra mundial (Bonato e Bonato, 1987; Almeida *et al.*, 2003).



Figura 1: Plantação de soja. A figura à esquerda ilustra uma plantação de soja e à direita os grãos de soja produzidos. (<http://www.jornale.com.br>).

A revolução socio-econômica e tecnológica protagonizada pela soja no Brasil Moderno pode ser comparada ao fenômeno ocorrido com a cana de açúcar, no Brasil

Colônia e com o café, no Brasil Império/República, que em épocas diferentes comandou o comércio exterior do País (Dall'agnol *et al.*, 2000). A soja responde por uma receita cambial direta para o Brasil de mais de sete bilhões de dólares anuais. Estima-se que, antes de terminar a presente década, o Brasil será considerado líder mundial na produção dessa leguminosa (Embrapa Soja, 2011).

A cultura da soja está sujeita, durante todo o seu ciclo, ao ataque de diferentes espécies de insetos. Embora esses insetos tenham suas populações reduzidas por predadores, parasitóides e doenças, em níveis dependentes das condições ambientais e do manejo de pragas que se pratica, quando atingem populações elevadas, capazes de causar perdas significativas no rendimento da cultura, necessitam de controle. Apesar dos danos causados na cultura da soja serem em alguns casos alarmantes não se indica a aplicação preventiva de produtos químicos, pois, além do grave problema de poluição ambiental, a aplicação desnecessária eleva os custos da lavoura e contribui para o desequilíbrio populacional dos insetos (Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB, 2011).

Visando o combate às pragas que atacam a soja, vários países produtores dessa leguminosa, dentre eles o Brasil, estão empregando investimentos tecnológicos de alto nível. Desde a década de 1970, o Brasil vem desenvolvendo e aprimorando programas visando a excelência da qualidade e produtividade desta leguminosa. Entre esses programas, destaca-se o maior programa mundial de controle de uma praga usando um biopesticida, desenvolvido pela Embrapa Soja (Londrina-PR), implantado no início da década de 1980, que utiliza o baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV), que foi isolado pela primeira vez de larvas do inseto

Anticarsia gemmatalis Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) (Allen e Knell, 1977; Moscardi *et al.*, 1999).

1.2 Outras culturas de interesse econômico

Culturas como, milho, sorgo, arroz, trigo, café, alface, feijão, amendoim, tomate, algodão, batata, repolho e abóbora também apresentam alto valor econômico, principalmente para o Brasil. De acordo com as estatísticas, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, plantado principalmente nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul. O grão é transformado em óleo, farinha, amido, margarina, xarope de glicose e flocos para cereais matinais. Outra cultura importante é o café, com o Brasil sendo o maior produtor mundial e o segundo maior consumidor da bebida. A cafeicultura se fixou, inicialmente, no Sudeste e depois se expandiu para o Paraná e Bahia. Assim como para o cultivo de feijão, o Brasil se destaca como o maior produtor com produção média anual de 3,5 milhões de toneladas. O feijão é um típico produto da alimentação brasileira cultivado por pequenos e grandes produtores em todas as regiões. Os maiores produtores são Paraná e Minas Gerais. O arroz está entre os cereais mais consumidos do mundo e o Brasil é o nono maior produtor mundial. A produção está distribuída nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Mato Grosso (Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB, 2011; Ministério da Agricultura, 2012).

Tais exemplos, de diferentes culturas de interesse econômico para o Brasil, também necessitam de controle de insetos praga. Dentre as principais pragas que comprometem as lavouras destas culturas encontra-se a larva *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) que é uma espécie polífaga (Cruz *et al.*, 1999; Praça, 2006) causadora de severos danos às plantações. Visando o combate desta praga, microorganismos entomopatogênicos, como por exemplo, bactérias (ex. *Bacillus*

thuringiensis), fungos (ex. *Beauveria bassiana*), vírus (ex. *Spodoptera frugiperda* MNPV) e nematoides (ex. *Heterorhabditis indica*) são utilizados em programas de controle. A maioria destes entomopatógenos tem maior eficiência, se aplicado sobre os primeiros estágios larvais, onde os insetos hospedeiros estão mais susceptíveis (Melo e Azevedo, 2000).

2. Baculovírus

2.1 Taxonomia

Estudos indicam que vem ocorrendo um processo de co-evolução entre vírus e lepidópteras (Zanotto *et al.*, 1993). Acredita-se que os baculovírus da atualidade podem estar relacionados com os vírus presentes nos antigos ancestrais de artrópodes. Esses vírus, denominados baculovírus, que atacam insetos foram classificados dentro da família *Baculoviridae* (Labandiera e Sepkoski, 1993). São vírus com DNA dupla fita, circular, super enovelado, possuindo um ou mais vírions em um capsídeo com formato de bastão (daí surgiu a origem do nome da espécie), variando entre 80 e 200 kilobases (kb) o seu genoma (Lauzon *et al.*, 2006).

Ao contrário de alguns vírus envelopados, como por exemplo, o Herpesvírus ou o Coronavírus, que utilizam estratégias de sobrevivência para persistir como um vírus latente no hospedeiro, os baculovírus não tendem a apresentar essa característica devido a alguns fatores, tais como: a vida curta dos insetos comparada a dos outros animais, o mecanismo de metamorfose e as populações de insetos que são sazonais e cíclicas (Efstathiou e Preston, 2005; Li *et al.*, 2005a).

A maioria dos baculovírus foram isolados a partir de lepidópteros, outros baculovírus também foram isolados a partir de outras ordens como Diptera e

Himenoptera (Larsson, 1984; Tinsley e Kelly, 1985; Martignoni e Iwai, 1986; Adams e McClintock, 1991; Murphy *et al.*, 1995; Herniou *et al.*, 2003). Os baculovírus possuem a capacidade de ocluir os seus vírions em estruturas compostas de proteínas necessárias para manter a integridade das partículas virais fora do ambiente celular, denominada corpos de oclusão (OBs), e do ponto de vista evolutivo está é uma relevante característica para o vírus (Afonso *et al.*, 2001; Herniou *et al.*, 2003; Garcia-Maruniak *et al.*, 2004; Lauzon *et al.*, 2004).

No início do estudo da família *Baculoviridae*, reconheceu-se que, com base na morfologia dos OBs, haviam duas principais divisões ou gêneros, os nucleopoliedrovírus (NPVs) e os granulovírus (GVs). Os vírions, de ambos os grupos de baculovírus, são oclusos em uma matriz protéica permitindo a visualização dos OBs em microscópio de luz. Os OBs de NPVs são maiores e apresentam uma estrutura poliédrica de luz refratária (cristal de vários lados). Os OBs dos GVs aparecem como grânulos claros e são comparativamente mais difíceis de serem observados no microscópio de luz (Boucias e Pendland, 1998).

Os OBs dos NPVs são denominados poliedros, assim como, os OBs dos GVs são chamados de grânulos. Seguindo essa nomenclatura, o principal componente protéico de poliedros é a poliedrina e o principal componente protéico do grânulo é a granulina. A poliedrina e a granulina tem aproximadamente 30 kDa de massa molecular. Ambos formam uma rede cristalina que oclui os vírions. Dezenas de vírions são ocluídos em um poliedro e, de forma geral, apenas um único vírion é ocluído em um grânulo (Slack e Arif, 2007).

Os NPVs podem apresentar partículas virais contendo mais de um nucleocapsídeo envolvido por um envelope, denominados MNPV, ou ainda possuem

partículas virais contendo somente um nucleocapsídeo por envelope, denominados SNPV (Bilimoria *et al.*, 1991; Van Regenmortel *et al.*, 2000).

Os GVs ainda são pouco estudados, devido a limitações quanto à replicação viral em cultura de células, (Winstanley e Crook, 1993), e por possuírem uma restrita gama de hospedeiros (Dwyer e Granados, 1988; Funk e Consigli 1992; Winstanley e Crook 1993). Por sua vez, os NPVs são encontrados em mais de 700 espécies hospedeiras documentadas para esse tipo de vírus (Moscardi, 1999; Herniou e Jehle, 2007) e diferentes linhagens de células de inseto em cultura susceptíveis foram descritas (Miller, 1997).

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus uma nova classificação para os gêneros pertencentes aos baculovírus foi estabelecida: *Alphabaculovirus*, NPV infectando lepidópteros; *Betabaculovirus*, GV infectando lepidópteros; *Gammabaculovirus*, NPV infectando himenópteros; e *Deltabaculovirus*, NPV infectando dípteros (King *et al.*, 2012; Jelhe *et al.*, 2006; Cartens e Ball, 2009) (Figura 2).

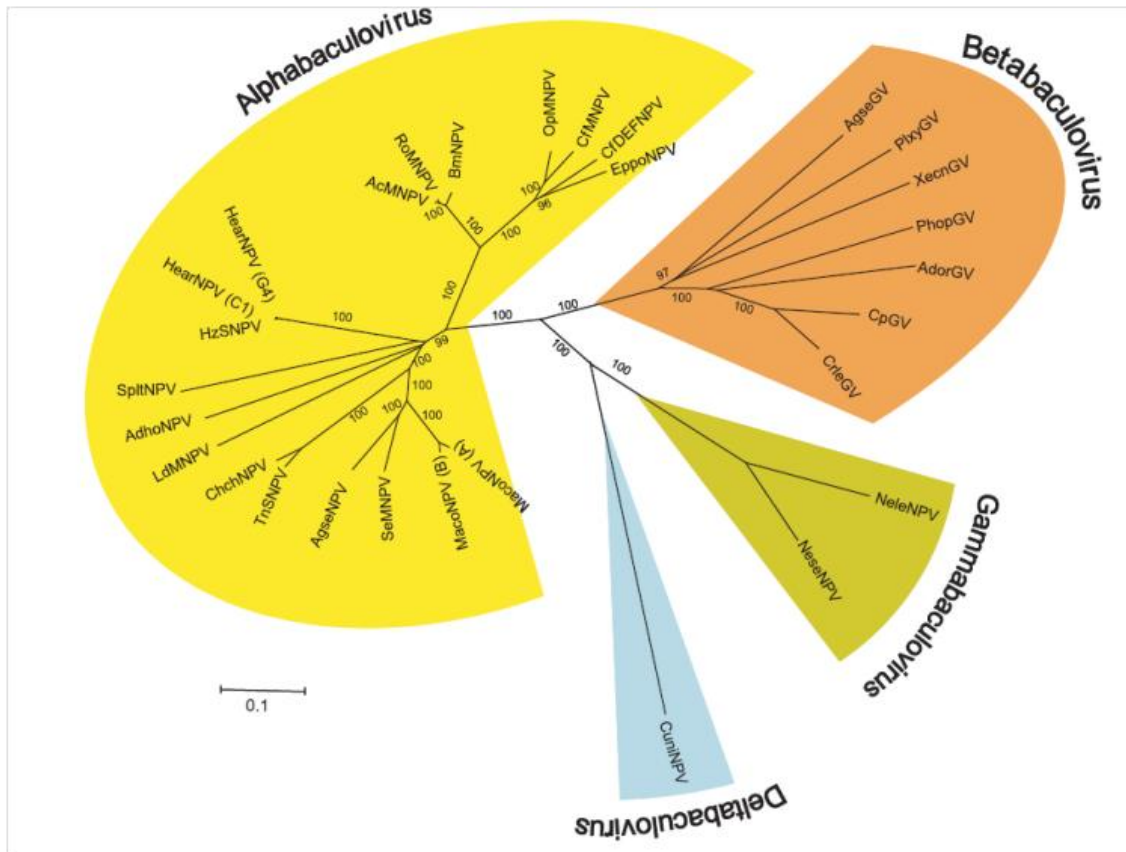


Figura 2: Taxonomia da família Baculoviridae. Árvore filogenética sugerida, baseada na sequência genômica de 29 espécies de baculovírus. (Jelhe *et al.*, 2006).

Uma peculiaridade dos baculovírus é a produção de dois tipos de vírus fenotipicamente distintos durante a infecção: os vírus extracelulares, também conhecidos como BV (*budded viruses*) (Figura 3) e os vírus derivados da oclusão, conhecidos como ODV (*occlusion derived virus*), (Murphy *et al.*, 1995) (Figura 4).

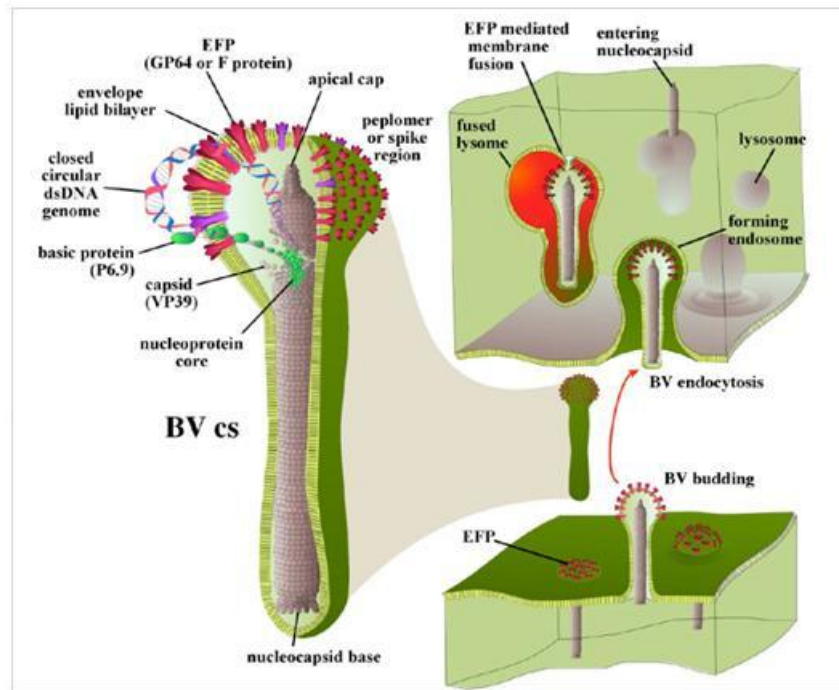


Figura 3: Estrutura de um vírus extracelular (BV) produzido por um baculovírus do grupo dos NPVs. As principais proteínas do envelope dos BVs são: proteínas de fusão (EFPs), GP64 e F-proteína. O lado inferior direito mostra o processo de saída do BV de uma célula infectada e o canto superior direito mostra a infecção BV de uma nova célula. Nucleocapsídeos se direcionam para fora da membrana da célula infectada, onde EFPs virais estão concentradas. Por brotamento, os vírions adquirem EFPs a partir da membrana celular. Os BVs se difundem através de uma nova célula, onde é levado para dentro da célula por endocitose mediada por receptores, e assim, ocorre a liberação do nucleocapsídeo dos BV no citosol. O nucleocapsídeo então é direcionado para o núcleo (Slack e Arif, 2007).

Os BVs são produzidos a partir de 12 a 24 h após a infecção (h p.i.), na fase precoce e a transmissão ocorre de forma sistêmica, ou seja, os BVs produzidos são responsáveis pela disseminação do vírus de célula a célula, dentro de um mesmo indivíduo. Esse fenótipo caracteriza-se pela presença de um nucleocapsídeo simples envolto por um envelope, derivado da membrana plasmática (Figura 3).

Já a forma oclusa do vírus (OB) é produzida no núcleo da célula na última fase da infecção, a partir de 36 h p.i. Os OBs conferem proteção às partículas virais no ambiente extracelular e a transmissão dos OBs ocorre horizontalmente, de inseto para inseto, por via oral (Volkman e Keddie, 1990).

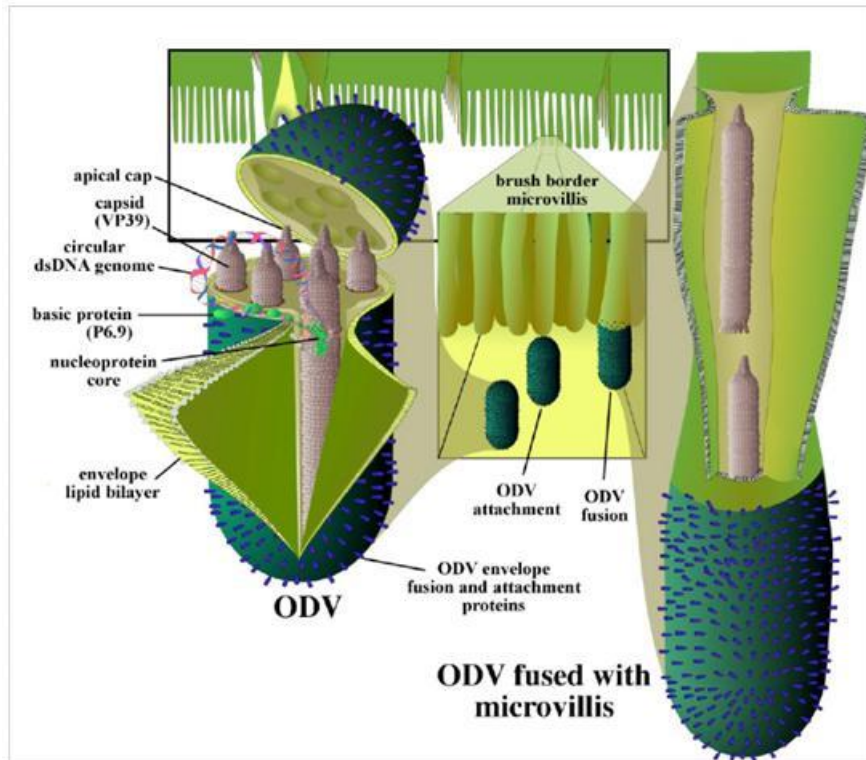


Figura 4: Estrutura de um vírus derivado da oclusão (ODV). A figura representa um ODV do MNPV e o processos de fusão do ODV nas microvilosidades das células do intestino médio do hospedeiro (Slack e Arif, 2007).

2.2 Citopatologia

A transmissão e a replicação de baculovírus ocorre exclusivamente na fase larval dos insetos. A transmissão ocorre por via oral quando os insetos ingerem o alimento contaminado com os OBs. Os OBs atravessam o intestino anterior e atingem o intestino médio (Figura 5). Lepidópteras têm o intestino médio alcalino (pH 10-11) (Terra e Ferreira, 1994) e os baculovírus evoluíram para tolerar e explorar este microambiente extremo. A alcalinidade do intestino médio do inseto provoca a dissolução dos OBs e a liberação de vírions no lúmen do intestino médio. Essas partículas virais oclusas são liberadas, e portanto, precisamente definidas como vírus derivados da oclusão ou ODVs.

A liberação dos ODVs ocorre em aproximadamente 12 min após a entrada dos OBs no intestino médio de insetos (Adams e McClintock, 1991) e uma vez liberado no intestino médio, os ODVs atravessam a membrana peritrófica (MP). A MP é uma rede de quitina produzida ao longo do comprimento do intestino médio de tal forma que ele forme um tubo oco para proteger o epitélio do intestino médio. A MP oferece uma defesa imunológica, restringindo a passagem de partículas maiores, tais como bactérias, fungos e vírus. Com o objetivo de atingir os tecidos do intestino médio, os ODVs atravessam a MP. Essas partículas darão início à infecção denominada primária, de maneira que, as partículas virais atravessam a membrana peritrófica e os nucleocapsídeos virais se fundem às membranas das microvilosidades das células colunares do intestino médio, mediada por receptores presentes no envelope lipoprotéico das células (Greenspan *et al.*, 1991; Hotchkin, 1981; Lepore *et al.*, 1996; Ohba e Tañada, 1983; Wang *et al.*, 1994) (Figura 5).

Infecção *per os* pelos Baculovírus:

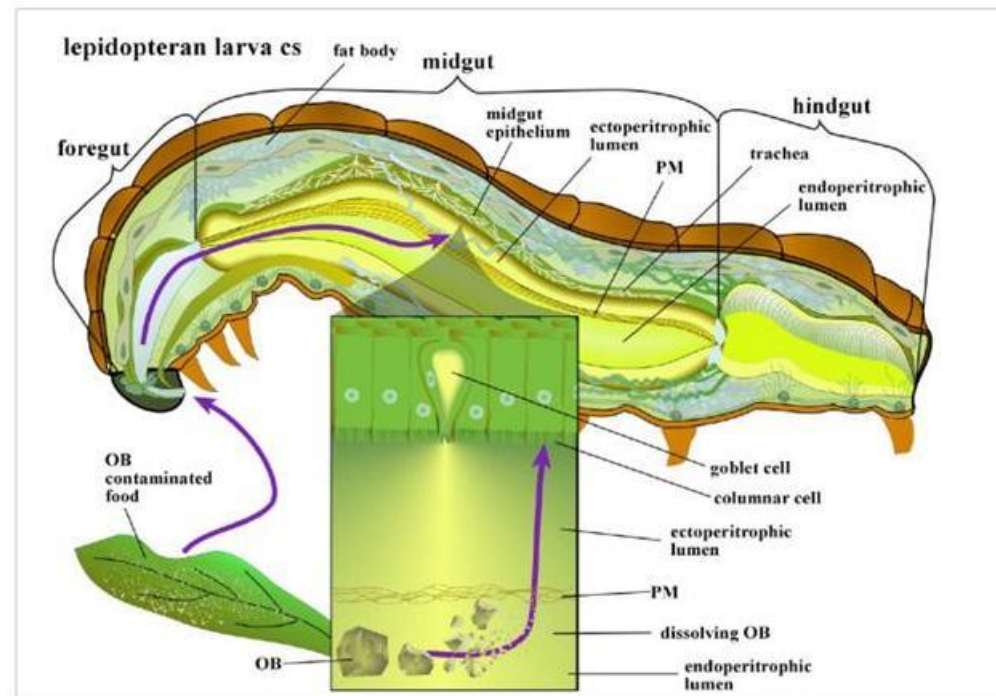


Figura 5: Ciclo de infecção do baculovírus em uma larva de lepidoptera. Os corpos de oclusão do baculovírus (OBs) entram pela via *per os* em alimentos contaminados. OBs passam pelo intestino anterior e atingem o intestino médio da larva onde são dissolvidos no lúmen do intestino médio alcalino liberando os vírus derivados da oclusão (ODVs). A figura também retrata a translocação de ODVs liberados após a membrana peritrófica (PM) para as células epiteliais colunares do intestino médio (Slack e Arif, 2007).

A infecção do epitélio no intestino médio começa após os ODVs entrarem nas células colunares do mesmo. As células colunares estão envolvidas na secreção de enzimas digestivas e na absorção de nutrientes (Adams e McClintock, 1991). Em seguida, o envelope dos ODVs que são compostos por uma bicamada lipídica se fundem diretamente com as membranas das células do intestino médio (Horton e Burand, 1993; Washburn e Volkman, 2003), resultando na liberação de nucleocapsídeos para o citosol (Figura 6). Estes nucleocapsídeos migram para o núcleo onde o DNA viral é liberado. Neste momento, genes virais são expressos, produtos de genes estruturais são sintetizados, a replicação do DNA é completada e as novas progênes virais são montadas e liberadas. Depois dos ODVs infectarem as células do intestino médio, os BVs que são produzidos posteriormente penetram na lâmina basal e infectam outros tecidos da larva (Figura 6).

Outra via alternativa é o transporte de partículas virais diretamente para as células do sistema traqueal e/ou hemolinfa. Essa disseminação para outros tecidos caracteriza a infecção secundária e as células epiteliais infectadas produzem o fenótipo BV, que irá infectar outras células por endocitose mediada por receptores. A expressão da proteína GP64, na fase precoce da infecção, permite que o vírus atravesse todo o citoplasma e brote do outro lado da célula para infectar outros tecidos sem se replicar na célula intestinal. Essa proteína presente no envelope do vírus é reconhecida por receptores celulares e após a endocitose, medeia a fusão da membrana viral com a membrana endocítica, culminando com a saída do vírus para o citoplasma a partir da célula infectada (Engelhard *et al.*, 1994) (Figura 6).

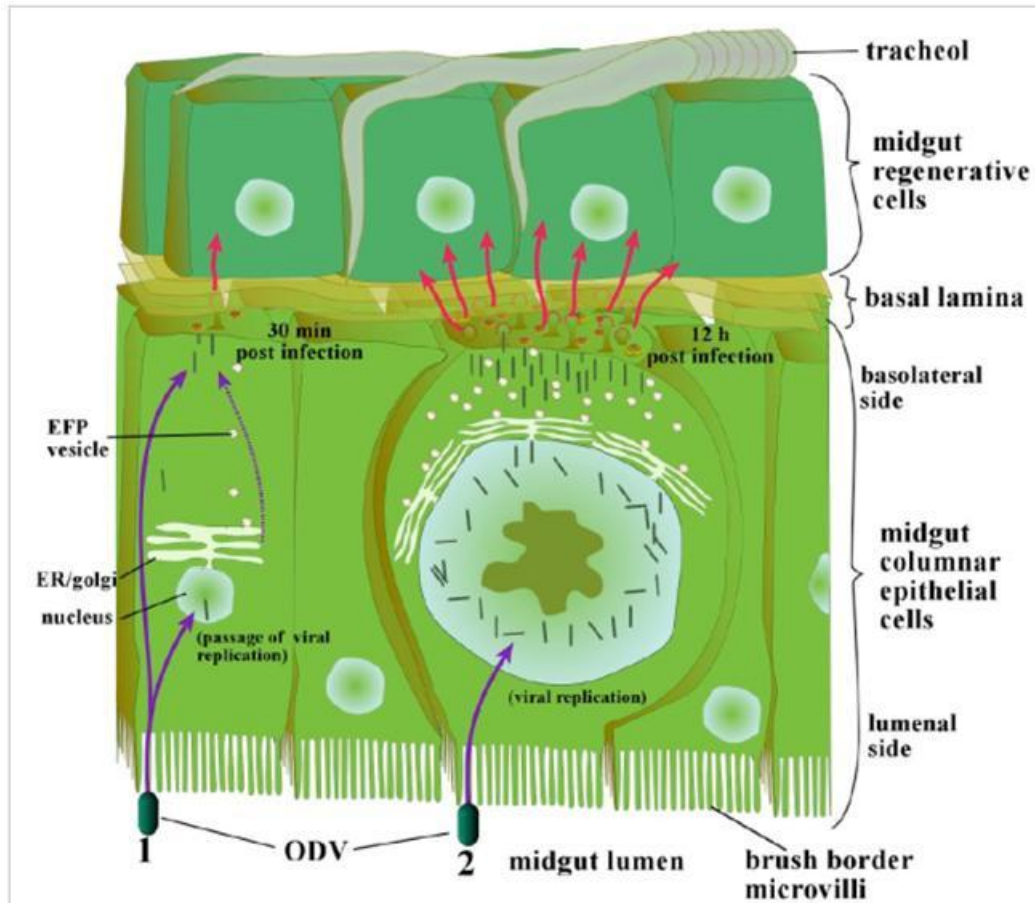


Figura 6: Entrada dos ODVs no epitélio do intestino médio de uma larva de lepidoptera. A maioria dos baculovírus usam as células do intestino médio apenas para produzir o primeiro fenótipo viral BV para infectar outros tecidos. Vírus derivados da oclusão (ODVs) que entram nas células do intestino médio podem driblar a replicação do vírus na célula do intestino médio pela expressão da GP64 (1), permitindo que o vírus atravesse o citoplasma e brote do outro lado da célula para infectar outros tecidos sem se replicar na célula intestinal ou (2) iniciar a replicação viral (Slack e Arif, 2007).

Durante a infecção, o inseto fica debilitado, perdendo sua capacidade motora e de alimentação, ocorre também o clareamento da epiderme devido ao acúmulo de vírus no núcleo das células epidermais e adiposas, além de afetar o desenvolvimento da larva interrompendo o seu crescimento (Federici, 1997). Quando a larva do inseto infectada pelo vírus morre, o seu tegumento se desintegra facilmente, liberando grande quantidade de OBs no meio ambiente, servindo de inóculo para infectar outros insetos hospedeiros (Volkman e Keddie, 1990). Estes processos são facilitados pela interação sinérgica entre as proteínas virais V-CATH (uma catepsina viral) e CHIA (uma quitinase viral) (Ohkawa *et al.*, 1994; Slack *et al.*, 1995). A figura 7, ilustra o processo

causado pela infecção do vírus em uma célula permissiva, seguindo uma sequência cronológica dos efeitos citopáticos.

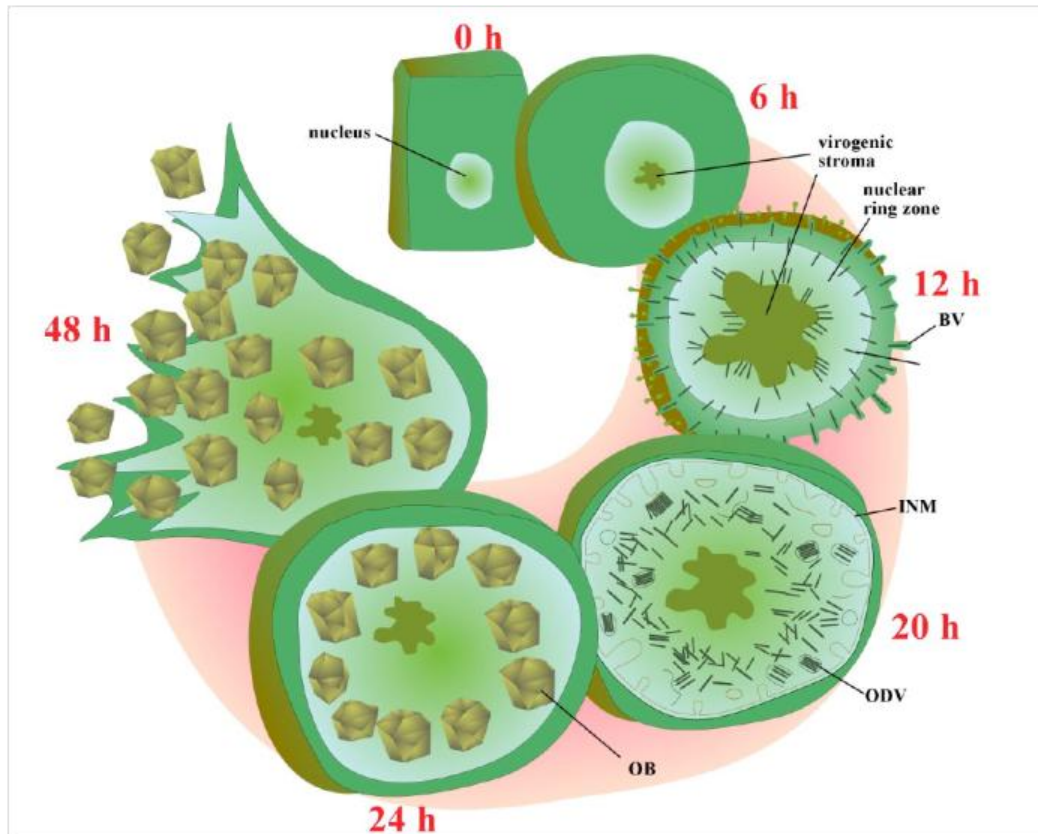


Figura 7: Efeitos citopáticos da infecção de um baculovírus em uma célula permissível. Diversas mudanças morfológicas durante as diferentes fases de replicação do vírus são ilustradas, começando com o arredondamento das células infectadas e terminando com a liberação de corpos de oclusão. Nucleocapsídeos são inicialmente translocados para a membrana celular para a produção de BV e mais tarde tornam-se retidos na zona nuclear para a produção de ODV. É a MNI (membrana nuclear interna) que forma o envelope do ODV (Slack e Arif, 2007).

2.3 Regulação da expressão gênica

Uma vez iniciado o processo de infecção, a expressão gênica ocorre, ordenadamente, em cascata (O'Reilly *et al.*, 1992), indicando um controle em nível transcricional, no qual os genes expressos em uma classe temporal regulam os genes expressos na fase subsequente (Blissard e Rohrmann, 1990). A expressão gênica viral se

dividi em: fase precoce imediata (*immediate early*, IE) que corresponde a genes expressos logo após a descapsidação viral, nas primeiras horas de infecção; fase precoce (fase *early*) caracterizada pelos eventos que precedem à replicação do DNA viral entre 30 min até 8 h p.i.; fase tardia (fase *late*), caracterizada pela expressão de genes após o início da replicação do DNA viral entre 8 e 18 h p. i., nessa fase o DNA viral começa a ser transcrito causando rearranjo do citoesqueleto e a dispersão da cromatina no núcleo da célula hospedeira, além de interromper a síntese de proteínas celulares (Lu e Miller, 1997). e a fase de expressão muito tardia (*very late*) de genes que são expressos de 18 h p.i. até o final da infecção e caracteriza-se pela produção da proteína poliedrina, principal proteína que compõe a matriz protéica do OB, durante a sua montagem que ocorre no núcleo e pela produção da proteína P10, que forma agregados fibrilares no núcleo e no citoplasma e está envolvida no processo de oclusão das partículas virais, assim como, na lise celular com aproximadamente 72 h p.i. (Blissard e Rohrmann, 1990; Xu *et al.*, 1995; Williams e Faulkner, 1997; Guarino *et al.*, 1998).

2.4 Sistema de expressão dos Baculovírus

Além de serem eficientes como bioinseticidas, os baculovírus são também utilizados como sistema de expressão, ou seja, podem expressar genes heterólogos com eficiência. O sistema baseia-se na introdução de genes exógenos no genoma de algum baculovírus de interesse no lugar de um gene não essencial para a replicação, sempre comandado por um promotor considerado forte.

Smith *et al.* (1983) e Pennock *et al.* (1984) publicaram os primeiros trabalhos utilizando o baculovírus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMPNV) como vetor de expressão para produzir β -interferon e β -galactosidase em cultura de células de *S. frugiperda* (IPLB SF-21 AE). Proteínas de importância em

diversas áreas, como por exemplo, na medicina e na agricultura, foram expressas em grande quantidade, em cultura de células de insetos usando os baculovírus como vetores de expressão (Ribeiro *et al.*, 1998).

Comparado com outros sistemas de expressão, as vantagens para utilização desses vetores são: potencial para expressão de proteínas heterólogas em altos níveis; alta especificidade dos baculovírus, tornando-se um sistema seguro para ser utilizado; existência de promotores fortemente ativos durante a fase tardia da infecção sem interferência no ciclo viral; capacidade para clonagem de grandes inserções; co-expressão de dois ou mais genes; ambiente eucariótico para expressão de proteínas complexas de eucariotos e simplicidade de manipulação (Ribeiro *et al.*, 1998).

O modelo mais simples desse sistema consiste na troca do gene da poliedrina por um gene heterólogo de interesse sob o comando do promotor da poliedrina (Smith *et al.*, 1983). A produção de um vírus capaz de replicar-se em células de inseto pela inativação do gene da poliedrina por deleção ou inserção de um novo gene impede a formação da poliedrina e conseqüentemente a formação dos corpos de oclusão (Possee, 1997). Da mesma maneira, a produção de vírus recombinantes construídos a partir da deleção de outros genes como o da quitinase (*chiA*) do baculovírus AcMNPV não afeta a replicação viral em cultura de células ou em insetos, porém perde a capacidade de liquefazer o corpo da larva (Hawtin *et al.*, 1997). Um efeito similar foi observado quando deletou-se o gene catepsina (*v-cath*) do genoma do baculovírus AcMNPV (Slack e Faulkner, 1995).

Existem vários métodos para construir um baculovírus recombinante, entre eles a inserção de genes heterólogos em baculovírus por recombinação homóloga que ocorre quando um vetor de transferência, contendo o gene de interesse, e sequências

flanqueando o gene homólogo à sequência é introduzido juntamente com um DNA viral dentro de células de inseto. Assim que são submetidos à co-transfecção em célula de inseto, ocorre uma troca de insertos, por recombinação homóloga, resultando na substituição do gene original no vírus pelo gene de interesse contido no plasmídeo. Nas células serão produzidos vírus selvagens e recombinantes sendo que esse último será isolado por purificação em diluição seriada em placas de 96 poços contendo células de inseto infectadas (Castro *et al.*, 1999).

Outro método muito utilizado para construir baculovírus recombinantes se dá pela transposição sítio específica de um cassete de expressão para o genoma do baculovírus, presente na forma de um grande plasmídeo (denominado bacmídeo) em células de *Escherichia coli* DH10BacTM (Invitrogen), que por sua vez possui além do genoma do baculovírus, um plasmídeo *helper* responsável pela codificação de uma transposase bacteriana que reconhece sequências repetidas invertidas que flanqueiam o gene exógeno no vetor de transferência (Luckow *et al.*, 1993). Este método consiste de um vetor de transferência (por exemplo, o pFastBac1TM da Invitrogen) que contém o gene de interesse sob o comando de um promotor específico do baculovírus e quando propagados em células de *Escherichia coli* DH10BacTM ocorre a transposição do cassete de expressão do gene heterólogo para o bacmídeo dentro da célula bacteriana.

3. Quitinases

A presença de quitina nos artrópodes em geral, assim como, em fungos e até moluscos apresenta uma função de barreira natural contra infecções por vírus e bactérias e confere rigidez às estruturas que a contém. Trata-se de um polissacarídeo abundante na natureza e estruturalmente caracteriza-se por ser um homopolímero de subunidades *N*-acetil-D-glicosamina (GlcNAc) unidas por ligações β -1,4 (Figura 8). De acordo com

a organização das cadeias de GlcNAc, as quitinas podem ser diferenciadas em quitina α e β (Seidl, 2008).

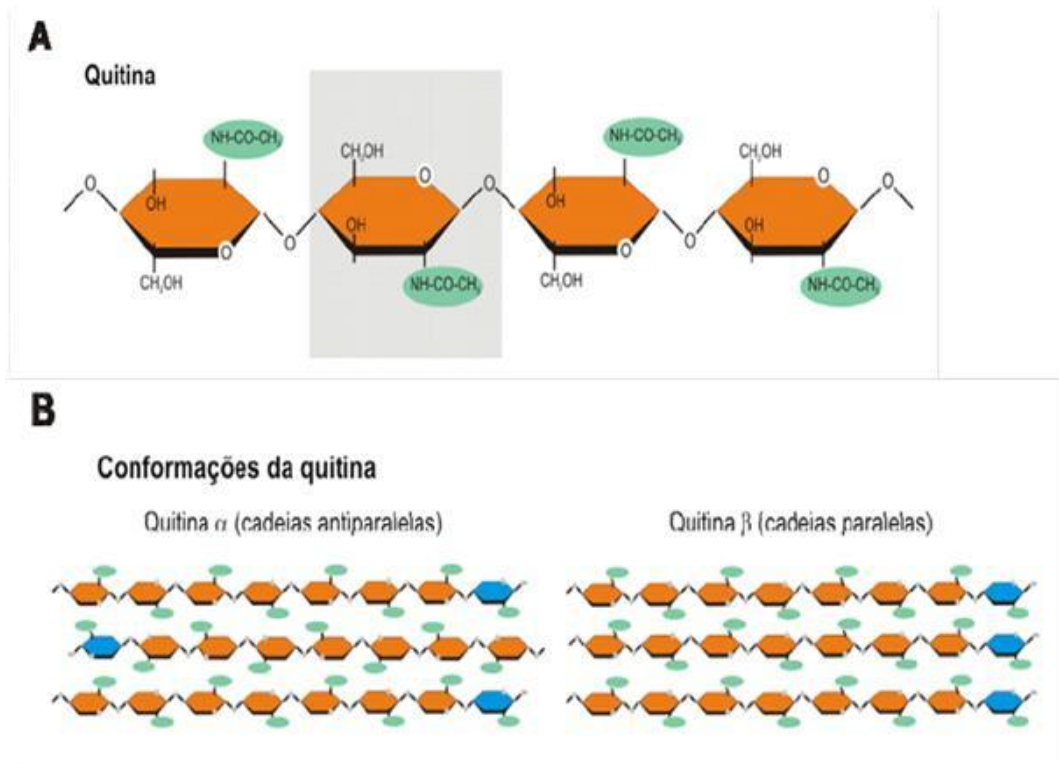


Figura 8: Molécula de quitina. (A) Estrutura química da quitina. A figura mostra a estrutura formada por *N*-acetil-D-glicosamina (GlcNAc) unidas por ligações β -1,4. (B) Conformação da quitina (cadeias α e β). (Boldo *et al.*, 2009).

As quitinases são enzimas que degradam a quitina por hidrólise das ligações β -1,4, liberando oligômeros, como a quitobiose, que posteriormente são degradados por acetilglicosaminidases a monômeros de GlcNAc. Estas moléculas podem ser utilizadas como fonte nutricional, quando no interior da célula são metabolizadas pelas quitinases, transformando-as em moléculas de *N*-acetil-D-glicosamina-6-fosfato. GlcNAc-6-P perde o radical acetil pela ação de acetilases produzindo Glicosamina-6-P.

A molécula Glicosamina-6-P é convertida, formando Frutose-6-P, que pode entrar diretamente na via glicolítica (Biswas *et al.*, 1979; Singh e Datta 1979a; Singh e

Satta 1979c; Singh e Datta 1979b). A utilização de GlcNAc como única fonte de carbono e nitrogênio é tão efetiva quanto a de glicose em *Candida albicans*, uma vez que GlcNAc é altamente solúvel e é rapidamente incorporada pela célula (Bhattacharya *et al.*, 1974a; Bhattacharya *et al.*, 1974b). Assim com o polímero de quitina, as quitinases ocorrem em vários organismos, incluindo vírus, bactérias, fungos, insetos, plantas, animais e humanos (Duo-Chuan 2006; Bhattacharya *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007).

As quitinases podem ser classificadas em duas classes de acordo com a posição do ataque hidrolítico à quitina: endoquitinases, que clivam a molécula aleatoriamente nos sítios internos gerando multímeros solúveis de GlcNAc, como quitotetraose, quitotriose e diacetilquitobiose; e exoquitinases, que ainda são divididas em quitobiosidases, catalisando a liberação gradual apenas de diacetilquitobiose a partir da extremidade não redutora das cadeias de quitina, e β -1,4-Nacetilglicosaminidases, que liberam monômeros de GlcNAc (Duo-Chuan, 2006).

São classificadas como glicosil hidrolases e, de acordo com este sistema de classificação baseado na similaridade da sequência de aminoácidos presentes nos domínios catalíticos, as quitinases foram distribuídas em três famílias: 18, 19 e 20 (Henrissat, 1999). A família 18 engloba as quitinases encontradas em bactérias, fungos, leveduras, vírus, plantas e animais, sendo a mais variada em termos evolutivos. A família 19 ocorre quase exclusivamente em plantas. As quitinases destas duas famílias não apresentam similaridade de aminoácidos entre si e têm estruturas tridimensionais e mecanismos moleculares de ação completamente distintos, sugerindo um ancestral comum diferente. A família 20 é constituída por β -Nacetilglicosaminidases de bactérias, fungos e humanos (Duo-Chuan, 2006; Seidl *et al.*, 2008).

Uma das características de quitinases presentes nos vírus e em fungos é a sua estrutura multi-domínios. Tipicamente, cinco domínios compõem as quitinases classificadas dentro desta família. Um peptídeo sinal precede a região N-terminal da quitinase madura. Este peptídeo sinal auxilia na secreção de enzimas e é clivado por sinal-peptidases assim que a enzima é transportada através da membrana. Quitinases sem peptídeo sinal são caracteristicamente intracelulares e participam de eventos de morfogênese (Takaya *et al.*, 1998b; Seidl *et al.*, 2005).

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

Quitinases de lepidópteros foram purificadas, de *Manduca sexta* e *Bombyx mori* (Kramer e Muthukrishnan, 1997; Merzendorfer e Zimoch, 2003). Esses genes, que codificam essas enzimas, foram clonados e isolados em espécies de lepidópteros (Kramer *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1998; Mikitani *et al.*, 2000; Shinoda *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2002). Zheng *et al.* (2003) observaram através de estudos imunohistoquímico da quitinase de *Choristoneura fumiferana*, que por sua vez é um ortólogo da quitinase de *M. sexta* e de *B. mori*, que essas quitinases estão envolvidas no processo de degradação da quitina durante o processo de muda dos insetos (Kramer e Muthukrishnan, 1997; Merzendorfer e Zimoch, 2003).

O fungo *Metarhizium anisopliae* é um patógeno de inseto utilizado em controle biológico de pragas, principalmente na China, Rússia e Brasil (Gillespie *et al.*, 1988) e provavelmente são importantes na degradação da cutícula do hospedeiro (St. Leger *et al.*, 1995b, 1996a). Além disso, este fungo utiliza-se de um processo multifatorial

envolvendo pressão mecânica e secreção de hidrolases. Dentre elas, destacam-se as quitinases, envolvidas tanto nos processos de morfogênese do próprio organismo quanto em processos de patogenia e nutrição.

Dentre a composição gênica do baculovírus AcMNPV, encontra-se um gene que codifica uma quitinase viral (*chiA*) (Hawtin *et al.*, 1995), que provavelmente está relacionado com a desintegração de inseto infectado por este vírus, juntamente com a ação de uma cisteína protease (catepsina viral). A vantagem desta desintegração permite que uma maior disseminação do vírus no ambiente ocorra (Saville *et al.*, 2004).

Contudo, quitinases são alvos de interesse para estudos de regulação e função, assim como, para o melhoramento de baculovírus recombinantes utilizados em programas de controle biológico, visando uma melhor disseminação no ambiente e aumento de um aumento de patogenicidade e virulência.

4. Cisteína-proteases

Proteases atuam catalisando a hidrólise de ligações peptídicas de macromoléculas protéicas, resultando em peptídeos menores ou até mesmo degradando-as. São enzimas degradativas capazes de catalisar a hidrólise total de proteínas. Essa hidrólise requer sítios ativos dessas proteases, com aminoácidos específicos no sítio ativo, sendo eles serina, cisteína, aspartato e histidina. A presença destas enzimas nos organismos varia desde vírus até vertebrados e constituem até 2% dos genes expressos, dependendo do organismo que as sintetizam. As proteases podem variar em tamanho, podendo atingir centenas de kDa quando a enzima é formada por um complexo multimérico ou simplesmente monômeros de 10 kDa (Sajid e Mickerrow, 2002; Mottram *et al.*, 2003; Rudenskaya e Pupov 2008).

Uma das funções das proteases é facilitar a invasão dos tecidos pelos vírus, e participar da replicação e diferenciação destes organismos, assim como, atuar metabolicamente regulando processos fisiológicos e patológicos (Rao *et al.*, 1998; Bressolier *et al.*, 1999; Rawlings *et al.*, 2002).

As proteases são geralmente sintetizadas como zimogênios ou pró-enzimas, que posteriormente são processadas para dar origem às formas maduras ou enzimaticamente ativas. De acordo com o tipo de reação catalisada, as proteases podem ser divididas em: exopeptidases, clivando as ligações peptídicas próximas das porções amino e carboxo-terminal, sendo classificadas como aminopeptidase ou carboxipeptidase respectivamente; ou endopeptidases, que clivam ligações peptídicas na região interna da cadeia polipeptídica e se dividem em quatro grupos principais de acordo com o sítio catalítico: serino-proteases, aspártico-proteases, metaloproteases e cisteíno-proteases (Klema e Goldberg, 2002; Vermelho *et al.*, 2007; Page e Di Cera, 2008).

A atividade das cisteíno-proteases envolve resíduos de cisteína e histidina e dependendo da ordem dos resíduos envolvidos na atividade catalítica, são classificadas em diversos clãs, sendo os principais clãs CA (Cys-His) e CD (His-Cys) (Mottram *et al.*, 2003; Rudenskaya e Pupov, 2008). Um dos primeiros relatos da caracterização de uma cisteíno-protease foi a catepsina-L, pertencente à família da papaína, caracterizada como uma protease lisossomal com pH ácido em torno de 5.0 (Homma *et al.*, 1994). A catepsina-L purificada e caracterizada como uma cisteíno protease de *B. mori*, possui tamanho de 39 kDa e sua pró-enzima, em torno de 47 kDa, e é muito semelhante a uma protease de mamífero (Takahashi *et al.*, 1993; Yarygin *et al.*, 2003).

A maioria dos Baculovírus que infectam lepdópteros codificam genes que sintetizam cisteíno proteases, como por exemplo, a catepsina viral (*v-cath*). Esta

enzima provavelmente atua em conjunto com uma quitinase viral para promover a liquefação do inseto hospedeiro. Sendo assim, estudar estas enzimas em baculovírus poderá elucidar e estabelecer melhor a função destas enzimas no processo de infecção viral.

CAPÍTULO I

“Efeito da expressão das proteínas heterólogas quitinase (ChiA) e catepsina (V-CATH) em larvas de *Anticarsia gemmatalis* infectadas por baculovírus *Anticarsia gemmatalis* MNPV recombinantes”

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de soja no Brasil é considerado um dos principais produtos rentáveis do País (Ferraz, 2001). Atualmente, o Brasil é considerado o segundo produtor mundial do grão de soja. Diferentes pragas atacam as culturas de soja durante o seu ciclo vegetativo e reprodutivo, principalmente em seu estágio larval, podendo reduzir a produção de soja, caso as pragas não sejam controladas (Turnipseed e Kogan, 1987).

O controle de insetos praga tem sido feito predominantemente com uso de inseticidas químicos. Entretanto, estes produtos químicos são geralmente inespecíficos, e geram o aparecimento de insetos resistentes aos princípios ativos, além das fortes pressões sociais para a conservação ambiental (Moscardi e Sousa, 2002). O custo para o desenvolvimento de inseticidas químicos é alto e a tendência ao longo dos anos é estar sempre aumentando, devido à necessidade de novas formulações mais adequadas às pragas, que se tornam mais resistentes ao seu uso. Diante de tais limitações, o interesse pela pesquisa de inseticidas alternativos tem crescido, como por exemplo, os bioinseticidas (Almeida e Batista Filho, 2001).

A larva de *Anticarsia gemmatalis* Hübner 1818 (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida como lagarta da soja (Figura 9), é considerada uma praga-chave da sojicultura, podendo causar diminuição significativa na produção de soja, tornando-se

economicamente importante (Gallo *et al.*, 2002). O programa de controle utilizando baculovírus, desenvolvido pela Embrapa Soja (Londrina-PR) utiliza o baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) (Moscardi *et al.* 1999).



Figura 9: Larvas de *Anticarsia gemmatalis* (4°/5° ínstar) (<http://www.hotsites.sct.embrapa.br>).

Após o sequenciamento completo do genoma do baculovírus AgMNPV, a sua análise inicial revelou que um dos fatores interessantes do genoma deste vírus está na ausência dos genes quitinase (*chiA*) e catepsina (*v-cath*), que por sua vez estão presentes no genomas dos baculovírus CfDefNPV e AcMNPV, entre outros (Oliveira *et al.*, 2006). Os genomas dos baculovírus codificam genes auxiliares que não são essenciais para a replicação, porém conferem vantagem seletiva ao vírus, uma vez que os baculovírus replicam seu genoma dentro do núcleo das células do hospedeiro, eles estão susceptíveis a adquirir sequências de nucleotídeos a partir do hospedeiro.

Dentre os genes auxiliares que conferem uma vantagem seletiva para os baculovírus estão os genes quitinase (*chiA*) e catepsina (*v-cath*) (Daimon *et al.*, 2006), encontrados na sequência genômica dos baculovírus *Epiphyas postvittana nucleopolyhedrovirus* (EppoNPV), *Orgyia pseudotsugata multiple*

nucleopolyhedrovirus (OpMNPV), *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), *Rachiplusia multiple nucleopolyhedrovirus* (RaouMNPV), *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV), *Choristoneura fumiferana nucleopolyhedrovirus* (CfMNPV), *Hyphantria cunea nucleopolyhedrovirus* (HycuNPV), *Choristoneura fumiferana DEF multiple nucleopolyhedrovirus* (CfDefNPV) e *Antheraea pernyi nucleopolyhedrovirus* (AnpeNPV), que por sua vez, estão agrupados no gênero *Alphabaculovirus*, assim como, o baculovírus *AgMNPV*, que como exceção, apresenta no seu genoma a ausência de uma região com cerca de 3.000 pares bases (pb) conservada a montante (*downstream*) ao gene *gp64* (Slack *et al.*, 2004), provavelmente referente a região aonde deveriam estar os genes *chiA* e *v-cath*.

A expressão do gene quitinase de AcMNPV ocorre na fase tardia da replicação do vírus e em conjunto com a catepsina viral promove a liquefação do corpo do hospedeiro nos estágios tardios da infecção (Hawtin *et al.*, 1997). Sendo assim, a ausência dos genes *chiA* e *v-cath* no genoma do baculovírus *AgMNPV* pode ser responsável pela larva infectada com o baculovírus *AgMNPV* não apresentar a característica de liquefação do corpo da larva logo após sua morte. Contudo, analisar o efeito da expressão das proteínas heterólogas quitinase (*ChiA*) e catepsina (*V-CATH*) em larvas de *Anticarsia gemmatalis*, infectadas por baculovírus *Anticarsia gemmatalis* MNPV recombinantes, pode contribuir para os estudos pertinentes a interação e função desses genes em baculovírus.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Levando em consideração a ausência dos genes *v-cath* e *chiA* no genoma do baculovírus *AgMNPV* e a ação das proteínas *ChiA* e *V-CATH* na liquefação e melanização do corpo de insetos infectados por diferentes baculovírus, o presente trabalho propõe-se analisar o efeito da expressão dessas proteínas em insetos infectados com *AgMNPV* recombinantes contendo esses genes derivados de outros dois baculovírus (*CfDefNPV* e *AcMNPV*).

2.2 Objetivos Específicos

- ❖ Construir *AgMNPV* recombinante contendo os genes *v-cath* e *chiA* do baculovírus *AcMNPV*
- ❖ Analisar a transcrição dos genes *v-cath* e *chiA* dos *AgMNPV* recombinantes em células de inseto via PCR em tempo real
- ❖ Analisar os efeitos causados pelos *AgMNPV* recombinantes em larvas de *A. gemmatalis* com base na determinação de parâmetros de mortalidade (bioensaios)
- ❖ Avaliar as atividades enzimáticas das enzimas *V-CATH* e da *ChiA* em células de inseto e insetos infectados pelos *AgMNPV* recombinantes
- ❖ Expressar as proteínas *V-CATH* e *ChiA* em *E. coli* usando o Sistema Gateway (Invitrogen)
- ❖ Produzir antisoro em camundongos contra as proteínas *V-CATH* e *ChiA*, para analisar a expressão durante a infecção em células de inseto dos vírus recombinantes por *western blot*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens celulares de inseto, vírus e larvas de insetos utilizadas:

As linhagens celulares, derivadas de insetos, utilizadas no presente trabalho foram: células provenientes de *Anticarsia gemmatalis* (UFL-AG-286) (Sieburth e Maruniak, 1988) e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (SF-9 ATCC® CRL-1711). As respectivas linhagens foram utilizadas para infecção com vírus selvagens e recombinantes. As células foram mantidas em meio TC-100 (aminoácidos, vitaminas, sais inorgânicos, dextrose, tryptose) (GIBCO-BRL), suplementado com 10% de soro fetal bovino a 27°C.

Larvas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) foram utilizadas para produção e amplificação da forma oclusa (OBs) dos vírus selvagens e recombinantes. As larvas foram gentilmente cedidas pela Dra. Maria Elita Batista de Castro (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEN).

Os vírus utilizados no presente trabalho foram AgMNPV-2D (Johnson e Maruniak, 1989), AgMNPV-LDB80 (um isolado de AgMNPV pertencente a Embrapa Soja, Londrina, Brasil) e AcMNPV L-1 (Lee e Miller, 1978). O vírus recombinante vAgGalA2, é um vírus derivado do AgMNPV-2D e possui o gene reporter *lac-Z* derivado de *E. coli* no locus do gene da poliedrina (*polh*) sob o comando do promotor *polh* (Ribeiro *et al.*, 2001).

3.2 Plasmídeos com genes de baculovírus utilizados:

Todos os plasmídeos utilizados neste capítulo estão listados na tabela 1, assim como, suas principais características.

Tabela1: Lista dos plasmídeos utilizados no Capítulo I.

Plasmídeos	Construção/Composição	Utilização
P2100Cf.chiA/v-cath	O plasmídeo p2100 linker <i>HindIII</i> (Lima, 2008) foi digerido com a enzima de restrição <i>HindIII</i> , linearizando o plasmídeo para que fosse inserido os genes <i>chiA</i> e <i>v-cath</i> , provenientes do baculovírus CfDefNPV, gerando assim, um plasmídeo com o promotor e o gene da poliedrina do AgMNPV, os genes <i>chiA</i> e <i>v-cath</i> do CfDefNPV sob o comando de seus promotores nativos, além de, regiões homólogas ao genoma do AgMNPV utilizadas no evento de recombinação homóloga durante a construção do baculovírus AgMNPV recombinante - vAgp2100Cf.chiA/v-cath (Lima, 2008).	Construir baculovírus AgMNPV recombinante
P2100Ac.chiA/v-cath	O plasmídeo p2100 linker <i>BglII</i> (Hallwass, 2005) foi digerido com a enzima de restrição <i>BglII</i> , linearizando o plasmídeo para que fosse inserido os genes <i>chiA</i> e <i>v-cath</i> , provenientes do baculovírus AcMNPV (Lima, 2008), gerando assim, um plasmídeo com o promotor e o gene da poliedrina do AgMNPV, os genes <i>chiA</i> e <i>v-cath</i> do AcMNPV sob o comando de seus promotores nativos, além de, regiões homólogas ao genoma do AgMNPV utilizadas no evento de recombinação homóloga durante a construção do baculovírus AgMNPV recombinante - vAgp2100Ac.chiA/v-cath	Construir baculovírus AgMNPV recombinante
p2100Cf.chiA.Av-cath	O plasmídeo p2100 (Hallwass, 2005) foi digerido com a enzima de restrição <i>EcoRV</i> linearizando o plasmídeo, aonde foi clonado o fragmento amplificado por PCR contendo o gene <i>v-cath</i> interrompido.	Analisar a expressão individual dos genes <i>chiA</i> e <i>v-cath</i> de CfDefNPV em células e larvas de <i>A. gemmatalis</i>
p2100Cf.v-cath.AchiA	O plasmídeo p2100 (Hallwass, 2005) foi digerido com a enzima de restrição <i>EcoRV</i> linearizando o plasmídeo, aonde foi clonado o fragmento amplificado por PCR contendo o gene <i>chiA</i> interrompido.	Analisar a expressão individual dos genes <i>chiA</i> e <i>v-cath</i> de CfDefNPV em células e larvas de <i>A. gemmatalis</i>
pDONR™ 207 attP	Vetor comercial (Sistema Gateway - Invitrogen) contendo principalmente a região <i>attP</i> de recombinação.	Construção de plasmídeos responsáveis pela

		expressão das proteínas recombinantes CHIA e V-CATH.
pDONRCf.chiA	Um fragmento correspondente ao gene <i>chiA</i> foi amplificado por PCR e submetido a uma reação de recombinação homóloga com o vetor pDONR TM 207 <i>attP</i> utilizando uma enzima específica.	Auxiliar na construção do segundo plasmídeo de recombinação.
pDONRCf.v-cath	Um fragmento correspondente ao gene <i>v-cath</i> foi amplificado por PCR e submetido a uma reação de recombinação homóloga com o vetor pDONR TM 207 <i>attP</i> utilizando uma enzima específica.	Auxiliar na construção do segundo plasmídeo de recombinação
pDESTTM17 attR	Vetor comercial (Sistema Gateway - Invitrogen) contendo principalmente a região <i>attR</i> de recombinação.	Construção de plasmídeos responsáveis pela expressão das proteínas recombinantes CHIA e V-CATH.
pDESTCf.chiA	Uma segunda reação de recombinação homóloga entre o vetor pDEST TM 17 <i>attR</i> e o plasmídeo pDONRCf.chiA foi feita utilizando uma enzima específica.	Expressar a proteína CHIA em um sistema procarioto.
pDESTCf.v-cath	Uma segunda reação de recombinação homóloga entre o vetor pDEST TM 17 <i>attR</i> e o plasmídeo pDONRCf.v-cath foi feita utilizando uma enzima específica.	Expressar a proteína V-CATH em um sistema procarioto.

3.2.1 Construção e confirmação dos plasmídeos p2100Cf.chiA.Δv-cath e p2100Cf.v-cath.ΔchiA contendo deleções nos genes *chiA* e *v-cath*:

Para analisar a expressão individual dos genes *chiA* e *v-cath* de CfDefNPV em células e larvas de *A. gemmatalis*, plasmídeos foram construídos com a deleção de cada gene, a partir do plasmídeo previamente construído, p2100Cf.chiA/v-cath. Sendo assim, oligonucleotídeos foram desenhados para excluir ou o gene *chiA* ou *v-cath*.

O par de oligonucleotídeos Cath-Quit(del) F e Cath-Quit(del) R (Tabela 2), desenhados para excluir o gene quitinase e amplificar apenas a catepsina, se anelam a montante do promotor da catepsina e a jusante da ORF *Lef-9*, como mostra a figura 10. Ambos oligonucleotídeos possuem em suas extremidades um sítio de restrição *EcoRI*. A

reação de amplificação em cadia pela polimerase foi feita utilizando a enzima LongAmp™Taq DNA polimerase (Biolabs) seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. As condições da reação foram: 5 µL de LongAmp Taq reaction Buffer 5X, 0,75 µL de dNTP 10 mM, 1,0 µL oligonucleotídeo Foward 10 µM, 1,0 µL oligonucleotídeo Reverso 10 µM, 1,0 µL DNA template, 1,0 µL LongAmp Taq DNA Polymerase para 25,0 µL de água. O programa utilizado para amplificar o fragmento foi 94°C por 2 min, 30 ciclos de 94°C por 30 s, 54°C por 1 min, 65°C por 9 min, e uma extensão final de 65°C por 10 min.

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados nas PCR para deleção dos genes quitinase e catepsina

Gene/baculovírus	Oligonucleotídeos	Sequência de nucleotídeos (5'→3')	Utilização
<i>chiA</i> CfDefNPV	Quit-ΔCath Cf F	GGAAGGAATTCGGATCA ATAGTTGCGGCTGCGGTTG	Construção do <i>cassete</i> de deleção do gene <i>v-cath</i>
	Quit-ΔCath Cf R	CCTTCCGAATTCGGGGCAA CGACAAGCCGGTGTAC	Construção do <i>cassete</i> de deleção do gene <i>v-cath</i>
<i>v-cath</i> CfDefNPV	Cath-ΔQuit Cf F	GGAAGGGAATTCCTGTCCG CTTTTGGACACGACAACC	Construção do <i>cassete</i> de deleção do gene <i>chiA</i>
	Cath-ΔQuit Cf R	GGAAGGGAATTCGCGGTC AGCGCCAACCTCGTCTTTC AGG	Construção do <i>cassete</i> de deleção do gene <i>chiA</i>

Após amplificação por PCR, o fragmento foi digerido com a enzima de restrição *EcoR* I (Promega) em uma reação com volume total de 32 µL: 25 µL do produto de PCR amplificado, 3,0 µL de tampão reação H 10X, 3,0 µL de BSA 10X (10 µg/µl) e 1 U/µl da enzima *EcoR* I (Promega). Após digestão, foi feita uma reação de ligação com a enzima T4 DNA Ligase (400,00 U/µl, BioLabs), de acordo com o recomendado pelo fabricante, do próprio fragmento para ligar as extremidades previamente digerida com *EcoR* I, e assim, obter um plasmídeo fechado p2100Cf.v-cath.Δ*chiA*, apenas com o gene *v-cath* inteiro e o gene *chiA* interrompido (Figura 10). Esse plasmídeo foi

transformado pelo método de transformação por choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989).

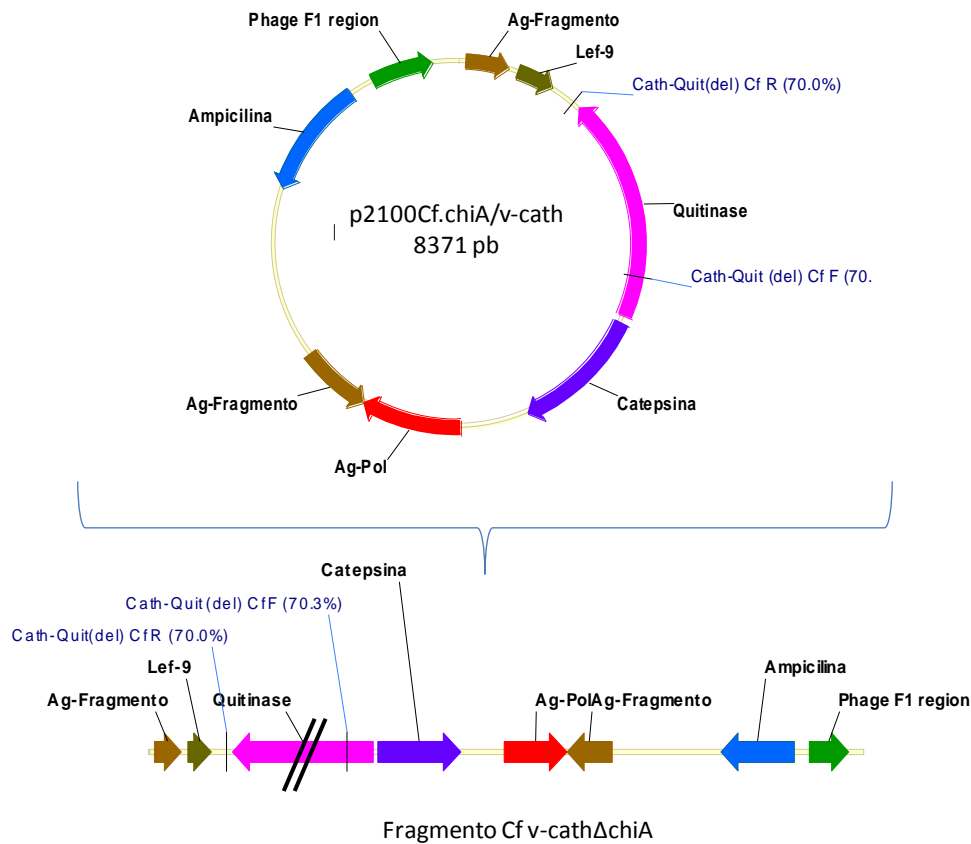


Figura 10: Fragmento amplificado por PCR, a partir do plasmídeo p2100Cf.chiA/v-cath, para construir o plasmídeo p2100Cf.v-cath.ΔchiA. O esquema mostra a região amplificada pelos oligonucleotídeos Cath-Quit (del) F e Cath-Quit (del) R, na região a montante ao promotor da catepsina e na região a jusante a ORF do gene *lef-9*, respectivamente (acima). O plasmídeo linearizado (abaixo) apresenta o gene catepsina com a sua região promotora, assim como o gene da poliedrina do AgMNPV, e as regiões de recombinação homóloga que serão utilizadas na construção do vírus do recombinante.

A mesma estratégia e condições foi utilizada para construir o plasmídeo p2100Cf.chiA.Δv-cath, amplificando o gene *chiA* e excluindo o gene *v-cath*, utilizando os oligonucleotídeos específicos, Quit-Cath (del) F e Quit-Cath (del) R (Tabela 2). O anelamento dos oligonucleotídeos ocorreu a montante do gene da poliedrina e a jusante do promotor da quitinase, de acordo com a figura 11 indicada abaixo.

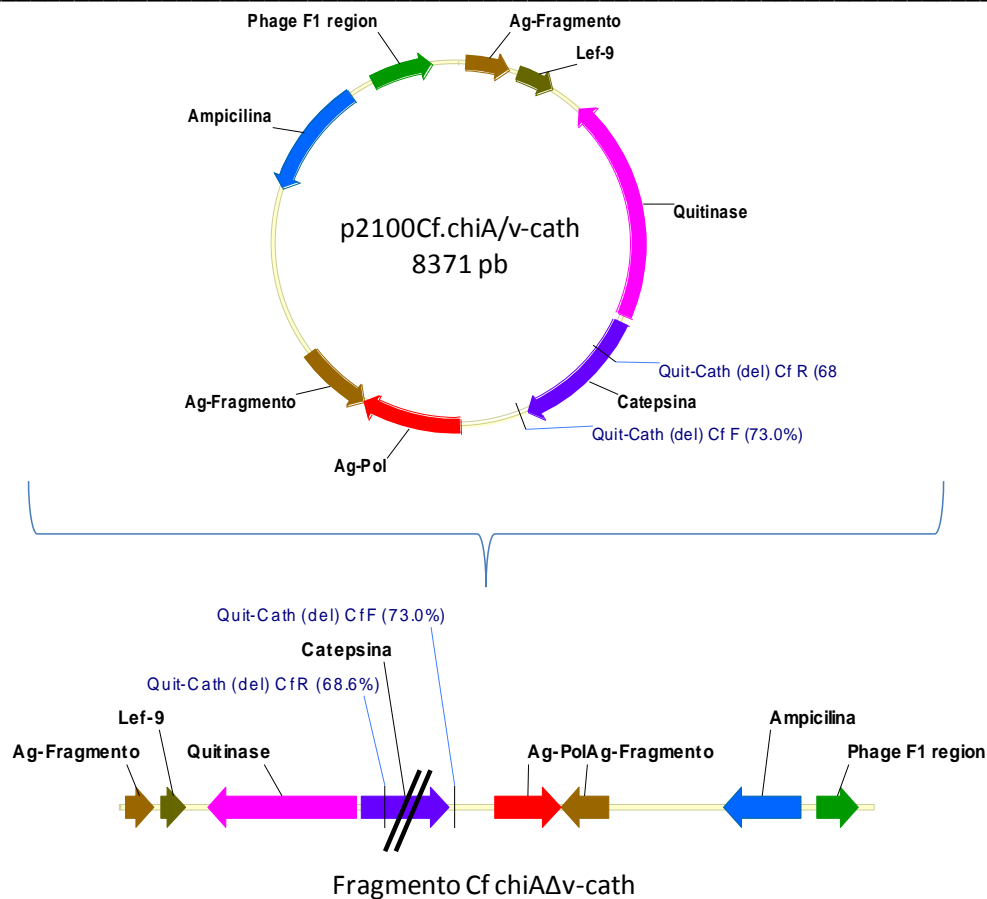


Figura 11: Fragmento amplificado por PCR a partir do plasmídeo p2100Cf.chiA/v-cath para construir o plasmídeo p2100Cf.chiAΔv-cath. O esquema mostra a região amplificada pelos oligonucleotídeos Quit-Cath (del) F e Quit-Cath (del) R, na região anterior ao gene da poliedrina e posterior ao promotor da quitinase, respectivamente (acima). O plasmídeo linearizado apresenta o gene quitinase com a sua região promotora, o sítio de restrição *EcoRI* nas extremidades, assim como, o gene da poliedrina do *AgMNPV*, e as regiões de recombinação homóloga que serão utilizadas na construção do vírus recombinante.

3.3 Construção do baculovírus recombinante vAgp2100Ac.chiA/v-cath:

Após clonagem dos genes, o vírus recombinante vAgp2100Ac.chiA/v-cath foi construído de maneira que o plasmídeo p2100Ac.chiA/v-cath foi co-transfectado com o vírus recombinante vAgGalA2 em cultura de células UFL-AG-286 com 1 µg de DNA dos plasmídeos e 0,5 µg do DNA do vírus recombinante vAgGalA2 utilizando uma solução de lipossomos (Cellfectin, Invitrogen). Uma placa de 35 mm de diâmetro foi previamente preparada com células UFL-AG-286 (1×10^6 células) e incubada por 1 h,

para aderência das células. Em seguida, os DNAs plasmidial e viral foram diluídos em 250 µL de meio TC-100 sem soro em uma placa de poliestireno.

Dez microlitros de lipossomos foram diluídos em 250 µL de meio TC-100 sem soro, misturados à solução contendo o DNA e incubados por 15 min à temperatura ambiente. O meio de cultura de células foi substituído pela mistura de DNA/lipossomos e a placa incubada a temperatura ambiente por 5h. Após esse período, a mistura foi trocada por meio TC-100 novo, contendo 10% de soro fetal bovino e as células foram incubadas a 27°C. Sete dias após a co-transfecção, o sobrenadante das células transfectadas foi usado para isolar o baculovírus AgMNPV recombinante (vAgp2100Ac.chiA/v-cath) pelo método de diluição seriada em placa de 96 poços, como descrito por O'Reilly *et al.* (1992). Sete ciclos de isolamento em placa de 96 poços foram necessários para o isolamento do vírus recombinante vAgp2100Ac.chiA/v-cath (Figura 12).

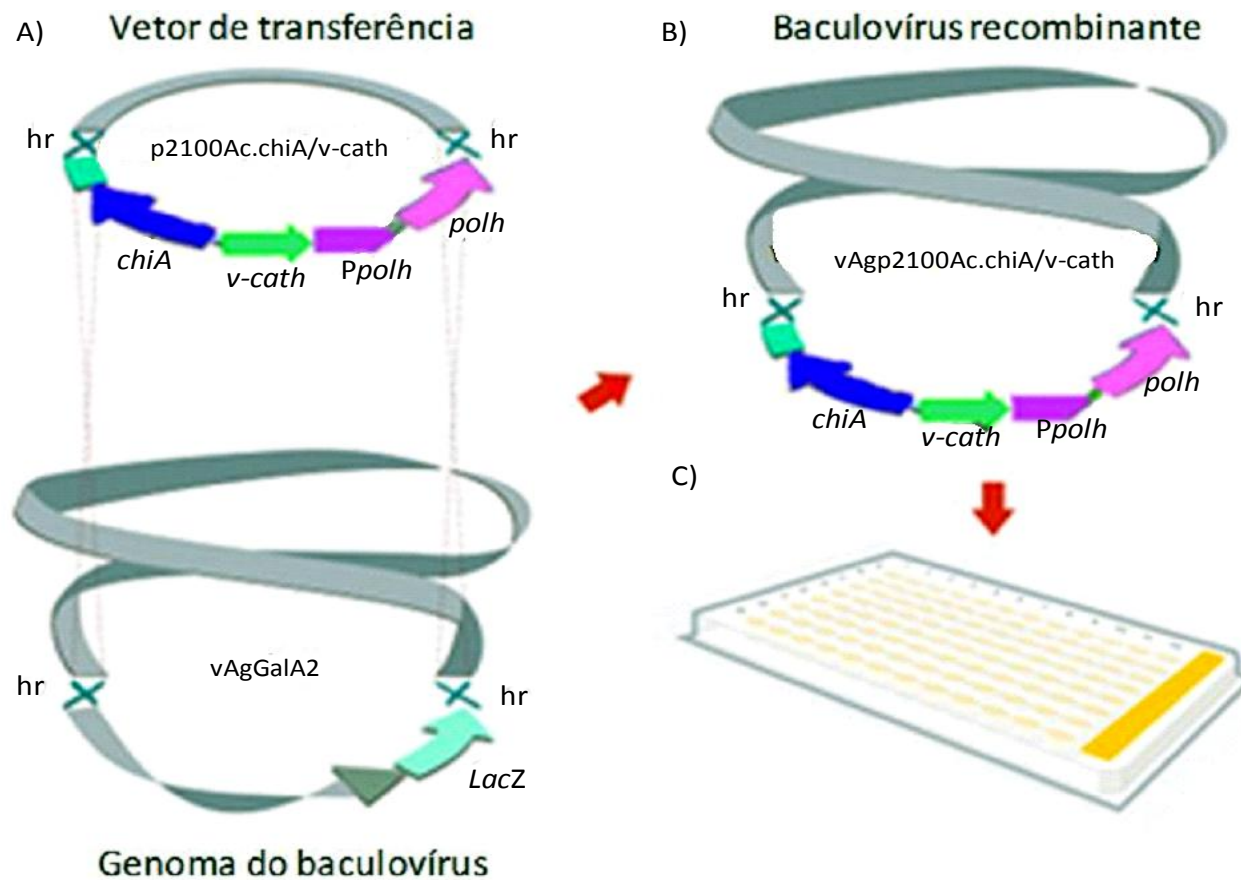


Figura 12: Esquema ilustrativo da construção e do isolamento do baculovírus recombinante vAgp2100Ac.chiA/v-cath pelo método de recombinação homóloga. A figura A apresenta o evento que ocorre entre as regiões flangeadoras do *cassete* de expressão dos genes exógenos, no caso *chiA* e *v-cath*, no vetor de transferência, e regiões homólogas no genoma de vírus vAgGalA2. Dessa forma o vírus adquire o *cassete* contendo o gene de interesse (figura B). Em seguida, na figura C, o vírus construído vAgp2100Ac.chiA/v-cath é isolado em diluições seriadas em placa de 96 poços (Adaptado de: Corrêa, 2007).

3.3.1 Confirmação da introdução dos genes *chiA* e *v-cath* no DNA do vírus recombinante:

Para confirmar a construção do baculovírus recombinante vAgp2100Ac.chiA/v-cath foi preparada a reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando oligonucleotídeos específicos para os genes. A técnica de PCR foi usada para identificação dos genes *chiA* e *v-cath* presentes no DNA genômico do vírus recombinante construído. Para detecção dos genes foram utilizados pares de oligonucleotídeos, desenhados a partir da sequência dos genes *chiA* e *v-cath*, depositados no banco de dados (NCBI - GenBank - Nº de acesso: NC_001623.1).

Os pares de oligonucleotídeos QUITAc F/QUITAc R e CATHAc F/CATHAc R, foram utilizados na amplificação de cada gene (Tabela 3). As reações de amplificação consistiram de um volume final de 25 µl, contendo 16,2 µl de água milli-Q, 2,5 µl de tampão de reação 10X (Invitrogen), 1,5 µl de dNTP 10 mM (Invitrogen), 1,0 µl de cada oligonucleotídeo (10 mM) da Integrated DNA Technologies (IDT), 0,3 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 1 µl do DNA (20 ηg/µl). As amplificações foram efetuadas em termociclador Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400) programado para 30 ciclos, cada um constituído pela seguinte sequência: Desnaturação inicial a 95°C por 5 min; ciclo de amplificação: desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 56°C por 1 min e 30 s, extensão a 72°C por 1 min e 30 s, extensão final a 72°C por 7 min.

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados nas PCR para detecção dos genes *chiA* e *v-cath* do AcMNPV no DNA do vírus recombinante construído.

Gene/baculovírus	Oligonucleotídeos	Sequência de nucleotídeos (5'→3')	Utilização
Quitinase AcMNPV	Quit Ac F	<i>AGATCTATGTTGTACAAATTGT</i> <i>TAAACGTTTTGTGG</i>	Confirmação da região codante do gene <i>chiA</i>
	Quit Ac R	<i>GGATCCAAATACTGCAGAATC</i> <i>GTG</i>	Confirmação da região codante do gene <i>chiA</i>
Catepsina AcMNPV	Cath Ac F	<i>AGATCTATGAACAAAATTTTG</i> <i>TTTTATTTGTTTGTGTACGGCG</i>	Confirmação da região codante do gene <i>v-cath</i>
	Cath Ac R	<i>GGATCCAAATAGCGAGTGTGT</i> <i>TGAGATT</i>	Confirmação da região codante do gene <i>v-cath</i>

*As sequências grifadas, em itálico, correspondem aos sítios de restrição adicionados na extremidade 5' de cada oligonucleotídeo.

3.3.2 Análise do efeito causado pelo vírus recombinante vAgp2100Ac.chiA/v-cath em larvas de *A. gemmatalis*:

Cinquenta larvas de *A. gemmatalis* (3^o/4^o instar) foram infectadas via microinjeção com cerca de 5 - 50 µL do estoque de BV (10⁸ pfu/mL) do vírus selvagem AgMNPV e do vírus recombinante vAgp2100Ac.chiA/v-cath, com um auxílio de uma seringa de 1 mL. As larvas foram mantidas em copos plásticos e alimentadas com uma dieta sólida artificial (Greene *et al.*, 1976). As larvas foram analisadas diariamente quanto ao efeito fenotípico provocado pela infecção viral.

3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real:

Uma das análises de quantificação da expressão temporal recomendada para validar os resultados é pela técnica de PCR em tempo real (Hess *et al.*, 2001), que é um método que se baseia na técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), permitindo a amplificação de fragmentos de DNA, além da precisão no monitoramento dos produtos de PCR gerados.

O primeiro passo para analisar a expressão temporal dos genes *chiA* e *v-cath* do vírus recombinante vAgp2100Cf.chiA/v-cath, foi verificar a titulação viral em cultura de células Sf-9 e UFL-AG tanto do vírus selvagem AcMPNV (o qual possui naturalmente em seu genoma os genes *chiA* e *v-cath*) quanto do vírus recombinante vAgp2100Cf.chiA/v-cath, respectivamente. O título foi determinado pelo método de TCID₅₀ (Reed e Muench, 1938), sendo possível observar após sete dias a formação dos corpos de oclusão. Os procedimentos descritos a seguir foram realizados em colaboração com o Laboratório de Evolução Molecular e Bioinformática - Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo – USP), juntamente com a Dra. Juliana Velasco de Castro Oliveira.

Os oligonucleotídeos específicos para os genes *chiA* e *v-cath* foram desenhados para amplificar fragmentos correspondentes aos genes (Tabela 4). Cada reação foi realizada em volume final de 50 µL utilizando cerca de 2 µL (5 ng/µL) de DNA viral, 20 pmol de cada oligonucleotídeos, 0,4 mM de dNTP, tampão de reação 1X, 2,0 mM de MgCl₂, 1,5 U de Taq polimerase (Invitrogen). O ciclo inicial utilizado foi 95°C por 2 min e 35 ciclos de 95°C por 30 s, 53°C por 30 s e 72°C por 50 s, com uma extensão final de 72°C por 10 min. As amostras foram visualizadas em gel de agarose 2%.

Tabela 4: Sequência de oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR em Tempo Real do vírus selvagem AcMNPV e do recombinante AgMNPV

Oligonucleotídeos	Sequência de nucleotídeos (5'→3')	Tm	GC%
AcQuit	CTG TTC CGT GAG CGA T	62,2	56,2
AcQuit	CGT ACA CAC CCC ACT C	59,0	62,5
AcCat	ACT GGC GTC GTC TCA AC	64,1	58,8
AcCat	GAT CAT TTG CTG CTC CG	64,7	52,9
CfQuit	GTC AAG GTG TGC GAT G	57,1	62,5
CfQuit	AAC AAA TGT GAG AGG T	64,1	56,2
CfCat	CTT CCT GTC GCC ATA GA	61,4	52,9
CfCat	AAC CCT GTT CTC CCC AG	64,3	58,8

Após titulação viral, fez-se uma cinética de infecção viral em cultura de células UFL-AG-286 e SF-9. As amostras foram coletadas em diferentes tempos após a infecção (0, 6, 12, 24, 48 e 72 h p.i.) e utilizadas para extrair o RNA proveniente da cinética de infecção viral, com o Kit RNeasy Plus (Qiagen).

A partir da extração do RNA total das células de inseto infectadas, o cDNA foi sintetizado e submetido a análise da PCR em tempo real de cada gene. As análises de PCR em tempo real foram realizadas utilizando o fluoróforo IQTMSYBR® Green Supermix (Bio-Rad), em equipamento ROTOR-GeneTM 3000 (Corbett Research) e o programa Rotor-Gene versão 6.1 (Corbett Research). As reações foram feitas seguindo um padrão, onde utilizou-se 1,0 µL de cDNA, 0,5 volume de 2X IQTMSYBR® Green Supermix (Bio-Rad) e 5 pmol de cada oligonucleotídeo específico, para um volume final de 15 µL. O programa utilizado foi de 96°C por 2 min, seguida de 40 ciclos de 96°C por 30 s, 53°C (dependendo da T_m ideal) por 30 s e 72°C por 40 s.

3.5 Bioensaios:

Trinta larvas neonatas de *A. gemmatalis* foram inoculadas oralmente com os diferentes concentrações (10², 10¹, 1.0, 0.1, 0.01 OB/nL) de corpos de oclusão dos vírus AgMNPV e recombinante segundo a metodologia do *droplet feeding* descrita por Hughes & Wood (1981). Como controle negativo, as larvas foram incubadas com phenol red 2%. A mortalidade dos insetos foi anotada a cada 8 h durante 10 dias. Os dados foram analisados utilizando o programa Polo Plus para CL₅₀ (LeOra Software) e os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes. Larvas de *A. gemmatalis* também foram avaliadas pelo método de incorporação na dieta de acordo com os procedimentos descritos em Morales e Moscardi (1993). Seis diluições foram preparadas em diferentes concentrações: 48600, 16000, 5400, 1800, 600 e 200 OB/mL a partir dos

corpos de oclusão dos vírus vAgp2100Cf.chiA/v-cath, AgMNPV-2D e AgMNPV-LDB80 (isolado padrão do AgMNPV utilizado pela Embrapa Soja, Londrina, Brazil). A dieta artificial foi preparada (Greene *et al*, 1976), sem formaldeído, e resfriada para 50°C. Ainda no estado líquido, 10 mL da suspensão do vírus foi misturada com 90 mL de dieta artificial. Em seguida, cada mistura é vertida em 10 copos plásticos de 50 mL (cerca de 10 mL/copo) até atingir a temperatura ambiente. Como controle foi utilizado dieta artificial misturada apenas com água destilada estéril. A dieta foi dividida, onde foram colocadas três lagartas de *A. gemmatilis* do terceiro ínstar por copo, utilizando-se 20 copos (60 larvas/concentração) para cada amostra em avaliação, o vírus padrão e o controle. Os tratamentos foram colocados em estufas incubadoras B.O.D., a 26°C e fotoperíodo de 14 horas, sendo a mortalidade registrada diariamente. Os dados foram analisados pelo programa Polo Plus (LeOra Software) para doses utilizadas versus probabilidade de mortalidade, que permite determinar a concentração letal média do vírus (CL₅₀).

As larvas testadas nos bioensaios, em diferentes concentrações (48600, 16000, 5400, 1800, 600 e 200 OB/mL), foram coletadas para analisar a quantidade de corpos de oclusão (OB) por grama de larvas produzidas pelos vírus vAgp2100Cf.chiA/v-cath, AgMNPV-2D e AgMNPV-LDB80. As larvas coletadas foram homogeneizadas com 8 mL de tampão de homogeneização (ácido ascórbico 1 %; SDS 2 %; Tris 0,01 M pH 8.0; EDTA 0,001 M) e a suspensão dissolvida em água “milli-Q”, para então, fazer a contagem utilizando a Câmara de Neubauer em microscópio de contraste de fases. A contagem foi realizada em triplicata.

3.6 Análise da atividade quitinolítica:

Testou-se a atividade da quitinase presente nos poliedros purificados dos vírus AgMNPV e vAgp2100Cf.chiA/v-cath, assim como, no extrato de células UFL-AG-286 (1×10^7) infectadas com os respectivos vírus (10^8 pfu/mL), utilizando dois tipos de substratos: quitina regenerada (Molano *et al.*, 1977) e 4-methylumbelliferyl- β -D-N,N'-diacetylchitobioside [4MU-(GlcNAc)₂] (Sigma). Antes de iniciar o ensaio quitinolítico, fez-se a dosagem de proteínas presentes no estoque de poliedros e no extrato de células UFL-AG-286, onde as concentrações de proteínas nas amostras enzimáticas foram determinadas pelo método colorimétrico descrito por Bradford (1976). Os ensaios enzimáticos foram conduzidos em triplicatas utilizando 100 μ g de proteínas.

Para determinação da atividade quitinolítica foi utilizada a quantificação de açúcar redutor, pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), usando quitina como substrato. Cerca de 100 μ g de proteínas presentes nos OB do AgMNPV e do vAgp2100Cf.chiA/v-cath foram acrescentados em uma solução contendo 500 μ L de quitina regenerada 0,5%, 250 μ L de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2 completando a reação para 1 mL com o tampão acetato de sódio. As amostras foram incubadas a 37°C por 16 h em um agitador a 200 rpm. Após esse período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 10000 x g por 5 min e 250 μ L do sobrenadante foi coletado e transferido para um novo microtubo, e então, foi adicionado 750 μ L de DNS. Em seguida, as amostras foram fervidas por 10 min e a quantidade de açúcar redutor formado foi estimada espectrofotometricamente (SpectraMax, Molecular Devices Corporation, USA) a 550 nm. Quitina regenerada e água destilada (sem enzima) foram utilizadas como controle.

Na análise de quitina glicol, a atividade quitinolítica foi mensurada utilizando uma versão modificada do método de Trudel e Asselin (1989). As células infectadas com os vírus *AgMNPV* e *vAgp2100Cf.chiA/v-cath* foram coletadas a 72 h p.i. e o extrato total de células foi coletado e centrifugado a 3000 x g por 10 min. O sobrenadante foi removido e o sedimento celular foi lavado duas vezes com tampão PBS 1x (NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KCl 2.7 mM, e um pH 7.4), em seguida, ressuspendido em 500 µL de tampão PBS 1x e armazenado a -80°C. Sendo assim, a partir da dosagem estabelecida de proteínas totais, 100 µg das proteínas presentes no extrato de células UFL-AG-286 (1x10⁷) infectadas com os vírus e de células não infectadas (mock) foram submetidos à análise. Cada amostra foi misturada em 350 µL de tampão fosfato de sódio 10 mM pH 6,0 e 100 µL de substrato (5 mM 4MU-(GlcNAc)₂ em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 5,0). Após o período de incubação por 1 h a 37°C, a reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de Na₂CO₃ 0,25 M seguindo-se a leitura no comprimento de 550 nm. Substrato em água (sem enzima) foi utilizado como controle. Os valores obtidos nos ensaios proteolíticos foram comparados pelo teste de Student's, utilizando o programa R i386 2.25.2 (Team 2012), valores de p<0,05 foram considerados significativos.

3.6.1 Detecção da atividade da quitinase após PAGE em condições nativas:

Células de inseto UFL-AG-286 (1x10⁶) foram infectadas com os vírus *AgMNPV* e *vAgp2100Cf.chiA/v-cath* (10 pfu/célula) e coletadas com 48 e 72 h p.i., lavadas 3 vezes com tampão PBS 1x (NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KCl 2.7 mM, pH 7.4) e armazenadas a -80°C. A eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições nativas, foi feita de acordo com Laemmli (1970) com algumas modificações. Preparou-se um gel de separação de 7,5% contendo 0,2 mL de quitina glicol 1%, onde foram

acrescentados os extratos celulares em presença de azul de bromofenol e glicerol sem ferver. O volume referente ao valor fixo de 25 µg de proteína, de cada amostra, foi adicionado aos poços do gel. Após eletroforese, o gel foi lavado uma vez com Triton X-100 1%, em seguida, o gel foi incubado por 24 h a 37°C com tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0 acrescido de Triton X-100 1%. Após incubação, o gel foi submergido por 10 min em solução reveladora recém-preparada de calcoflúor branco m²R (Sigma) 0.01% em tampão Tris-HCl 0,5M pH 8,0. A solução reveladora foi retirada e o gel incubado por 1 h em água destilada à temperatura ambiente. Por fim, o gel foi exposto à luz UV para revelação da atividade lítica da enzima quitinase e fotografado. Perfis eletroforéticos foram apresentados em forma negativa, com atividade lítica em bandas escuras (Trudel e Asselin, 1989).

3.7 Análise da atividade proteolítica:

Para os ensaios proteolíticos foram utilizados a hemolinfa de larvas *A. gemmatalis* infectadas, o extrato total de células UFL-AG-286 (1×10^8) infectadas com os vírus AgMNPV e vAgp2100Cf.chiA/v-cath (10 pfu/célula), assim como, os poliedros purificados dos respectivos vírus. A partir da dosagem de proteínas presentes na hemolinfa, no extrato de células UFL-AG-286, e no estoque de poliedros foi determinada a concentração das proteínas pelo método colorimétrico descrito por Bradford (1976).

Dois tipos de substratos foram aplicados para mensurar a atividade de cisteíno protease. Para os ensaios proteolíticos com a hemolinfa e com os poliedros foi utilizado o substrato queratina azulada (Keratin Azure, Sigma) de maneira que após 96 h p.i., a hemolinfa de 25 larvas de cada tratamento (infectadas e não infectadas) foi coletada através de um pequeno orifício feito no segundo par de patas das lagartas. A hemolinfa

coletada foi homogeneizada em um tampão anticoagulante (NaOH 98 mM; NaCl 186 mM; EDTA 1,7 mM; ácido cítrico 41 mM, pH 4.5) para evitar melanização e então armazenada a -80°C, até o momento de uso. O ensaio foi conduzido em triplicata utilizando 100 µg de proteínas presente em cada amostra, tanto na hemolinfa quanto nos poliedros. Na reação, as amostras foram incubadas com 500 µL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7.0 e MgCl₂ 0,1 M e 50 µg de substrato queratina azulada (Keratin Azure, Sigma) durante 3 h a 37°C. Após a incubação, a reação foi interrompida com 100 µL de TCA 10% (ácido tricloroacético, Sigma) e estocada no gelo por 1 h. Em seguida, centrifugou-se a 10.000 x g por 5 min, onde 500 µL do sobrenadante foram coletados e transferidos para um novo microtubo. Fez-se a leitura das amostras em um espectrofotômetro (SpectraMax, Molecular Devices Corporation, USA) a uma absorbância de 595 nm. Queratina azulada e água destilada foram utilizadas como controle.

A partir do extrato total de células infectadas com os vírus *AgMNPV* e *vAgp2100Cf.chiA/v-cath* detectou-se a atividade proteolítica utilizando o substrato Azocasein (Sigma). Células UFL-AG-286 (1×10^8) foram infectadas com os vírus (10 pfu/célula) e após 40 h p.i. o extrato total de células foi coletado e centrifugado a 3000 x g por 10 min. O sobrenadante foi removido e o sedimento celular foi lavado duas vezes com tampão PBS 1x. Em seguida, as células foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio pH 6.8 e centrifugado novamente a 10000 x g por 20 min. Após centrifugação, 250 µL do sobrenadante foi misturado com 400 µL de Azocasein (6 mg/mL em 100 mM de ácido succinic-NaOH, pH 4.1). As amostras foram incubadas por 5 h a 37°C a 200 rpm. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de TCA 100 %. Os tubos foram centrifugados a 12000 x g por 5 min sendo a absorbância do sobrenadante determinada a 280 nm. As amostras foram analisadas na presença e ausência de inibidor

de protease E-64 (2.8×10^{-4} M) (Sigma). Amostra incubada sem substrato foi utilizada como controle. Os valores obtidos nos ensaios proteolíticos foram comparados pelo teste de Student's, utilizando o programa R i386 2.25.2 (Team, 2012), valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3.8 Produção de antisoro para analisar a expressão das proteínas recombinantes

3.8.1 Construção dos plasmídeos responsáveis pela expressão das proteínas recombinantes:

A técnica utilizando o sistema Gateway baseia-se no sistema de recombinação específica no sítio do bacteriófago Lambda, facilitando a introdução do genoma viral no do cromossomo da *E. coli* e subsequente ativação das vias lítica e lisogênica (Ptashne, 1992). A recombinação lambda ocorre entre os sítios específicos de ligação (*attachment*): *attB* no cromossomo da *E.coli* e *attP* no cromossomo Lambda. Duas reações de recombinação foram necessárias para construir os plasmídeos responsáveis pela expressão das proteínas recombinantes ChiA e V-CATH, onde a segunda reação depende da primeira, como mostra o esquema na figura 13.

1ª recombinação**2ª recombinação**

Figura 13: Esquema dos eventos de recombinação baseado no sistema Gateway. (Fonte: Gateway® Technology Invitrogen, 2003).

Para isso, utilizamos enzimas e vetores específicos em cada reação a partir do kit *E.coli* Expression System with Gateway® Technology (Invitrogen). Sendo assim, a primeira reação de recombinação, denominada Gateway® BP Clonase™ (Invitrogen), foi feita entre um fragmento de PCR amplificado, a partir de oligonucleotídeos específicos que apresentam em sua extremidade o fragmento *attB*, especificamente nos genes *chiA* e *v-cath* do CfDefNPV (Tabela 5), e o vetor pDONR™ 207 que contém o fragmento *attP* (Figura 14).

As reações preparadas para a amplificação dos produtos da PCR foram de 36,0 µL de água milli-Q, 5,0 µL de tampão de reação 10X (Invitrogen), 5,0 µL de MgCl₂ 25 mM (Invitrogen), 1,5 µL de dNTP (10mM), 1,0 µL de cada oligonucleotídeo (10 mM) (Tabela 5), 0,3 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 1 µL do DNA (20 ng/µL). O programa da reação de PCR utilizado foi 95°C por 5 min e 35 ciclos de 95°C por 2 min, 54°C por 1 min e 30 s e 72°C por 1 min e 30 s, com uma extensão final de 72°C por 7 min.

Tabela 5: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos genes quitinase e catepsina que deram origem aos vetores de expressão das proteínas recombinantes.

Gene/baculovírus	Oligonucleotídeos	Sequência de nucleotídeos (5'→3')	Utilização
Quitinase CfDefNPV	<i>attB</i> Quit F	GGGGACAAGTTTGTACAAA AAAGCAGGCTTCATGGTGCA CTATTTTGGTAAAG	Amplificação da região codante do gene <i>chiA</i> para expressão em <i>E. coli</i>
	<i>attB</i> Quit R	GGGGACCACTTTGTACAAGA AAGCTGGGTCTTAAAGTTCG TCTTTTATTTTAAAG	Amplificação da região codante do gene <i>chiA</i> para expressão em <i>E. coli</i>
Catepsina CfDefNPV	<i>attB</i> Cath F	GGGGACAAGTTTGTACAAA AAAGCAGGCTTCATGAACA AAATTGTGTGTGTATTG	Amplificação da região codante do gene <i>v-cath</i> para expressão em <i>E. coli</i>
	<i>attB</i> Cath R	GGGGACCACTTTGTACAAGA AAGCTGGGTCTTAATAGATT TCCGCGCTTGAAGG	Amplificação da região codante do gene <i>v-cath</i> para expressão em <i>E. coli</i>

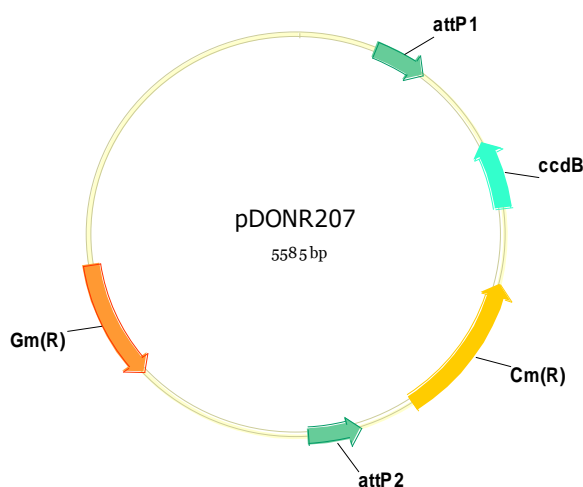


Figura 13: Mapa do plasmídeo pDONRTM207 (Invitrogen). A figura mostra a região *attP1* e *attP2*, o gene *ccdB* seguido do gene que confere resistência ao clorafenicol (Cm^R), além do gene que conferem resistência a gentamicina (Gm^R).

Essa primeira recombinação resultou em um clone de entrada. Em um tubo de microcentrífuga (1,5 mL) foi adicionado 5 µL (cerca de 500 ng/µL) do fragmento de PCR *attB* do gene *chiA*, 2 µL (300 ng/µL) do vetor pDONRTM 207 *attP* (Invitrogen), 2

μL tampão 5X da enzima BP Clonase™ e 1 μL da enzima Gateway® BP Clonase™. A reação foi incubada a temperatura ambiente por 16 horas. Em seguida, adicionou-se 2 μL de proteinase K (2 μg/μL) incubando por 10 min a 37°C. Após esse período foi feita a transformação do plasmídeo na linhagem de *E. coli* competente TOP 10 pelo método de choque térmico. O clone de entrada resultante foi denominado pDONRCf.*chiA* (Figura 15).

A confirmação do pDONRCf.*chiA* foi feita utilizando a enzimas de restrição *EcoRV* (Promega) em um sistema de digestão com 10 μL de H₂O milli-Q, 2 μL do tampão RE D 10X, 2 μL BSA (10 μg/μL), 10 μL do DNA plasmidial (1 μg/μL) e 1μL da enzima de restrição *EcoRV* (1U/μL) (Promega).

Da mesma forma foi construído o clone de entrada, contendo o gene *v-cath*, porém outras composições foram adicionadas na reação de recombinação. Adicionou-se em tubo de microcentrífuga (1,5 mL): 8 μL (cerca de 500 ηg/μL) do fragmento de PCR *attB* do gene *v-cath*, 3 μL (cerca de 150 ηg/μL); pDONR™ 207 *attP*, 2 μL tampão 5X enzima BP Clonase™, 1 μL enzima Gateway® BP Clonase™. O plasmídeo resultante foi denominado pDONRCf.*v-cath* (Figura 15) e a confirmação do pDONRCf.*v-cath* foi feita utilizando a enzima de restrição *ApaI* em um sistema de digestão com 10 μL de H₂O milli-Q, 2 μL do tampão RE A 10X, 2 μL BSA (10 μg/μL), 10 μL do DNA plasmidial (1 μg/μL) e 1μL da enzima de restrição (1U/μL) *ApaI* (Promega).

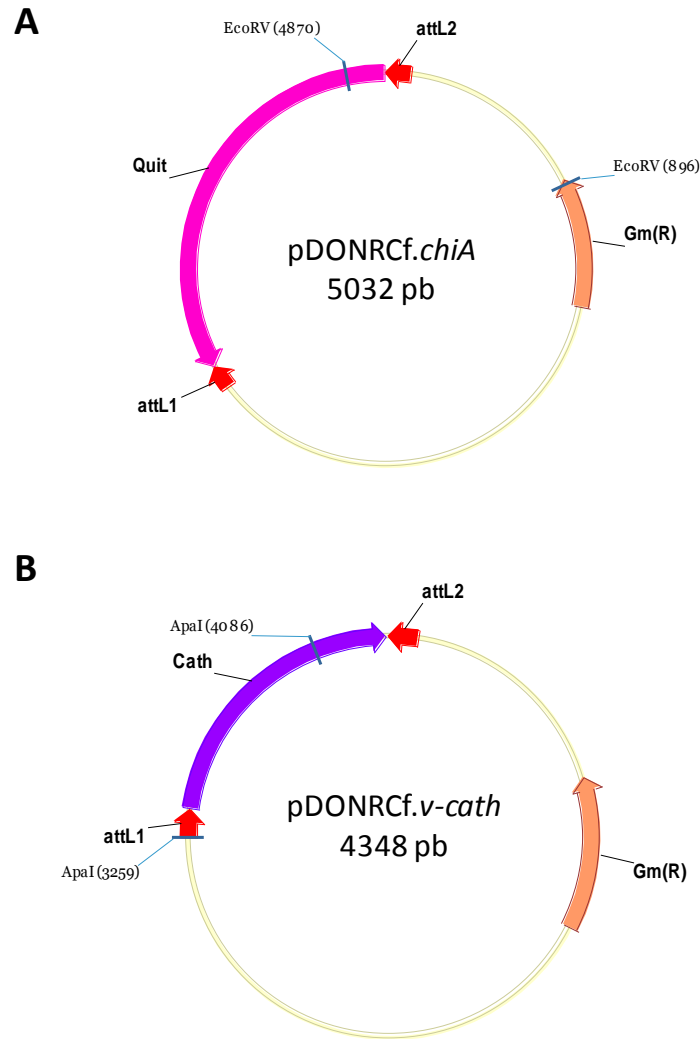


Figura 15: Mapas do plasmídeos pDONRCf.chiA e pDONRCf.v-cath. (A e B) Mapa dos pDONRCf.chiA e pDONRCf.v-cath indicando a orientação dos genes quitinase (A) e catepsina (B) flanqueados pelas regiões attL1 e 2, além do gene que confere resistência à gentamicina. Os mapas indicam o sítio de restrição das enzimas *EcoRV* (pDONRCf.chiA) e *ApaI* (pDONRCf.v-cath) utilizado na confirmação da construção dos plasmídeos.

A partir dos plasmídeos construídos, pDONRCf.chiA e pDONRCf.v-cath, uma segunda reação de recombinação foi feita, utilizando a enzima Gateway® LR Clonase™ II. Entretanto, para essa reação utilizamos o vetor pDEST™ 17 attR (Invitrogen) capaz de produzir uma proteína de fusão com cauda de histidina (Figura 16).

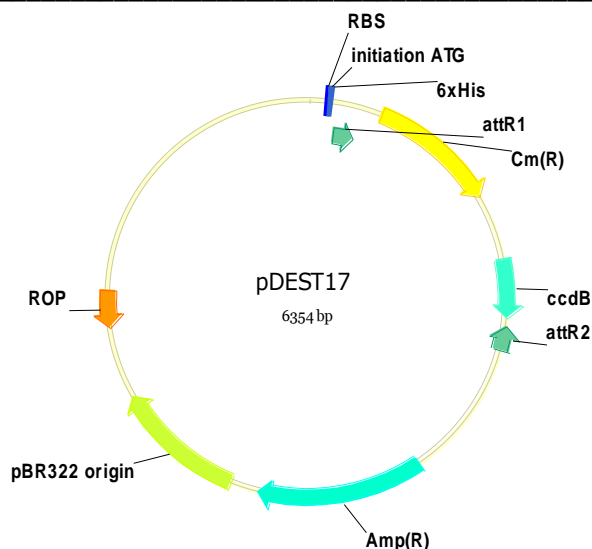


Figura 16: Mapa do plasmídeo pDESTTM17 (Invitrogen). A figura mostra os sítios de recombinação *attR1* e *attR2*, um promotor T7, um sítio de ligação do ribossomo (RBS), uma região com sequência de seis histidinas (6xHis tag), um gene *ccdB*, região de terminação da transcrição T7, além do gene de resistência à ampicilina (Amp^R).

Em um tubo de microcentrífuga (1,5 mL) foi adicionado 6 μ L (500 η g/ μ L) do fragmento de PCR *attL* do gene quitinase, 4 μ L (300 η g/ μ L) do vetor pDESTTM17 *attR* (Invitrogen), 2 μ L tampão 5X da enzima LR ClonaseTM II e 1 μ L da enzima Gateway[®] LR ClonaseTM II. A reação foi incubada à temperatura ambiente por 16 horas. Em seguida, adicionou-se 2 μ L de proteinase K (2 μ g/ μ L) incubando por 10 min a 37°C. Após esse período foi feita a transformação do plasmídeo na linhagem de *E. coli* competente DH5 α pelo método de choque térmico.

O clone de expressão resultante foi denominado pDESTCf.*chiA* (Figura 17). A confirmação pDESTCf.*chiA* foi feita utilizando duas enzimas de restrição *ApaI* (Fermentas) e *BglIII* (Fermentas). Primeiramente, o DNA plasmidial foi utilizado em um sistema de digestão com a enzima *ApaI*, nas seguintes condições: 12 μ L de H₂O milli-Q, 2 μ L do tampão FastDigest[®] 10X, 1 μ g/ μ L do DNA plasmidial e 1 μ L da enzima de restrição FastDigest[®]enzyme *ApaI* (1 U/ μ L) (Fermentas). A reação foi incubada por 3 h

a 37°C. Após esse período, a reação foi precipitada com isopropanol para remover os vestígios do tampão e da enzima utilizada anteriormente. Sendo assim, um segunda reação de digestão foi feita utilizando a enzima de restrição *Bgl*III (Fermentas) nas condições: 12 µL de H₂O milli-Q, 2 µL do tampão FastDigest® 10X, 10 µL do DNA plasmidial (1 µg/µL) e 1 U/µL da enzima de restrição FastDigest®enzyme *Bgl*III (1 U/µL) (Fermentas).

Da mesma forma foi construído o clone de expressão da proteína contendo o gene *v-cath*, porém outras composições foram adicionadas na reação de recombinação. Adicionou-se em tubo de microcentrífuga 1,5 mL: 4 µL (cerca de 500 ng) Fragmento PCR *att*L do gene catepsina, 3 µL (150 ng/µL) pDEST™ 17 *att*R, 2 µL tampão 5X enzima LR Clonase™ II, 1 µL enzima Gateway® LR Clonase™ II. O plasmídeo resultante foi denominado pDESTCf.*v-cath* (Figura 17). A confirmação do pDESTCf.*v-cath* foi feita utilizando duas enzimas de restrição *Apa*I (Fermentas) e *Bgl*III (Fermentas), nas mesmas condições do sistema de digestão feito anteriormente para a confirmação do pDESTCf.*chi*A.

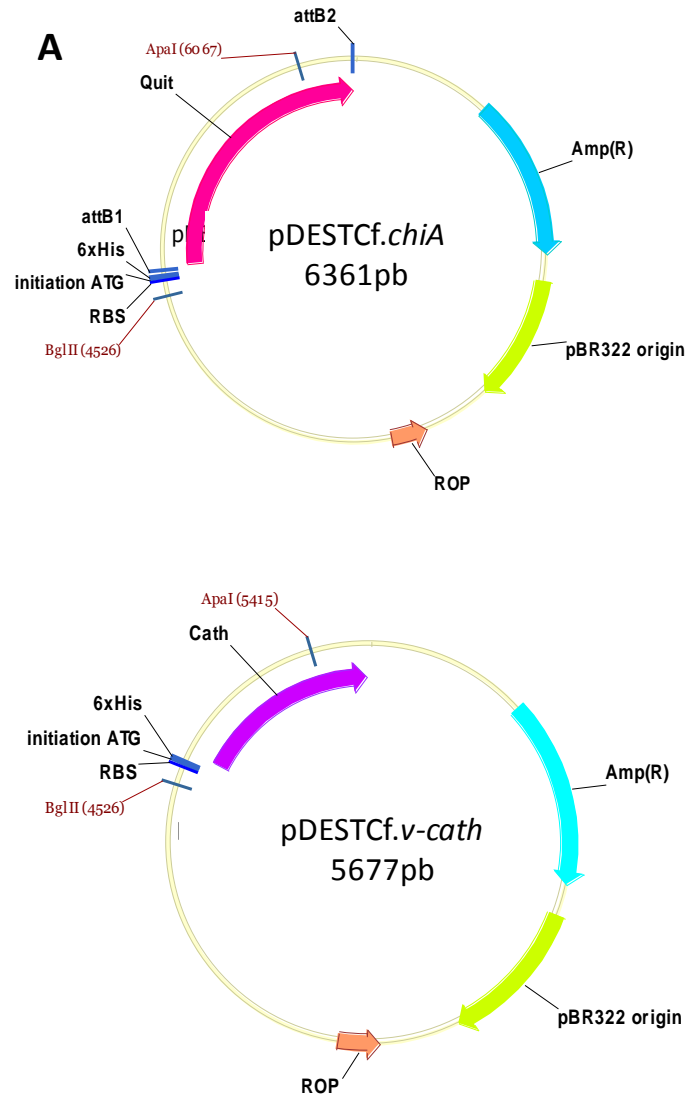


Figura 17: Mapa dos plasmídeos pDESTCf.chiA e pDESTCf.v-cath. (A) Mapa do pDESTCf.chiA indicando a orientação do gene quitinase, assim como, o gene que confere resistência à ampicilina. (B) Mapa do pDESTCf.v-cath indicando a orientação do gene catepsina, além do gene que confere resistência à ampicilina.

3.8.2 Análise da expressão das proteínas ChiA e V-CATH em *E. coli* por SDS-PAGE e detecção por *western blotting*

Os plasmídeos recombinantes, pDESTCf.chiA e pDESTCf.v-cath, foram usados para transformar células de *E. coli* BL21-AI™. As proteínas recombinantes foram expressas pela indução com L-Arabinose. O promotor araBAD é usado para controlar a expressão da RNA T7 polimerase em células de *E. coli* BL21-AI™ sendo tanto

positivamente como negativamente regulado pelo produto do gene *AraC*, que por sua vez é um regulador transcricional formando um complexo com L-arabinose. Sendo assim, as proteínas totais de *E.coli* foram extraídas e a purificação das proteínas recombinantes foi realizada por cromatografia de afinidade em colunas Ni-NTA (Quiagen), conforme instruções do fabricante.

Após indução das proteínas ChiA e V-CATH, em uma alíquota de 20 µL de cada amostra foi adicionado tampão de amostra de proteína (Tris.Cl 0,5 M pH 6,8, SDS 2%, glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol 0,005%, Beta-mercaptoetanol 5%, volume final 50 mL) e esse material foi incubado a 95°C por 5 min. Em seguida, procedeu-se uma eletroforese em gel SDS-PAGE a 12% na cuba Mini Trans Blot® Cells (BioRad), para analisar o perfil das amostras preparadas.

Para a análise de cada proteína foram feito dois géis desnaturantes, sendo que um deles foi corado e fixado em solução de 40% de metanol e 10% de ácido acético e Coomassie blue 0,1% por 3 h, seguido de 4 h submerso em solução descorante (40% de metanol e 10% de ácido acético). O outro gel foi utilizado para a transferência das proteínas para uma membrana de Nitrocelulose (Gibco BRL – Life Technologies), utilizando o aparato de transferência da Bio-Rad (Trans-Blot® SD – Semi Dry Transfer Cell), a uma corrente constante de 350 mA por 1 h em tampão de transferência (Tris-HCl 48 mM; Glicina 39 mM; 20 % metanol (v/v), pH 9,2). A eficiência da transferência foi confirmada pela marcação da membrana com um reagente Ponceau (corante vermelho) e após revelação foi rapidamente lavada com água destilada para remover o corante sem que tenha interferência nos outros procedimentos.

Confirmada a transferência das proteínas para a membrana de Nitrocelulose, procedeu-se com a imunodeteção, sendo que o primeiro passo foi bloquear a membrana

em solução PBS 1X com 3% de leite em pó desnatado por 16 h. Em seguida, três lavagens da membrana foram feitas com solução PBS Tween 0,05% para retirar toda a solução bloqueadora. O próximo passo foi incubar a membrana com o anticorpo primário policlonal anti-His de camundongo (Ge Healthcare) em solução PBS/albumina bovina (BSA) 0,5%, por 1 h, a diluição utilizada foi 1:2000. Essa solução foi então descartada e novas lavagens da membrana foram feitas em solução PBS Tween 0,05%, sob agitação.

A seguir a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina (Sigma) por 2 h sob suave agitação, com uma diluição de 1:5000. Esta solução foi retirada e então novamente lavada com PBS Tween 0,05% por três vezes. Para finalizar a marcação, a membrana foi revelada em 10 mL de tampão da enzima fosfatase alcalina por 5 min, juntamente com 1 mL de cada substrato NBT/BCIP (Zymed - Invitrogen), para a ação da fosfatase alcalina. A reação enzimática acontece devido à enzima fosfatase estar conjugada ao anticorpo secundário, que por sua vez, se ligou ao anticorpo primário e esse à proteína de interesse presente na membrana, ocorrendo assim à metabolização desse substrato aparentemente com uma cor roxa de baixa intensidade, marcando assim a membrana.

4 RESULTADOS

4.1 Análise dos genes *chiA* e *v-cath*, dos baculovírus *AcMNPV* e *CfDefNPV*:

Os plasmídeos p2100Cf.chiA/v-cath e p2100Ac.chiA/v-cath foram confirmados por digestão, como descrito por Lima (2008). Apresentaram um tamanho com cerca de 8.336 pb e 8.406 pb, respectivamente, contendo o promotor e o gene da poliedrina do baculovírus *AgMNPV*, assim como os genes *chiA* e *v-cath* dos respectivos baculovírus, *CfDefNPV* e *AcMNPV*. O plasmídeo p2100Ac.chiA/v-cath foi utilizado na construção de vírus recombinante, pelo método de recombinação homóloga.

4.1.1 Construção dos plasmídeos contendo a deleção dos genes *chiA* e *v-cath* do *CfDefNPV*:

A partir dos oligonucleotídeos específicos desenhados para que ocorresse a deleção de um dos genes, ou *chiA* ou *v-cath*, foram amplificados fragmentos que apresentaram um tamanho de 7.634 pb (*chiA* Δ *v-cath*) e 6.995 pb (*v-cath* Δ *chiA*) (Figura 19). Os produtos de PCR amplificados possuem o promotor e o gene da poliedrina do *AgMNPV*, assim como, o gene *chiA* ou *v-cath* com seu promotores nativos (Figura 18).

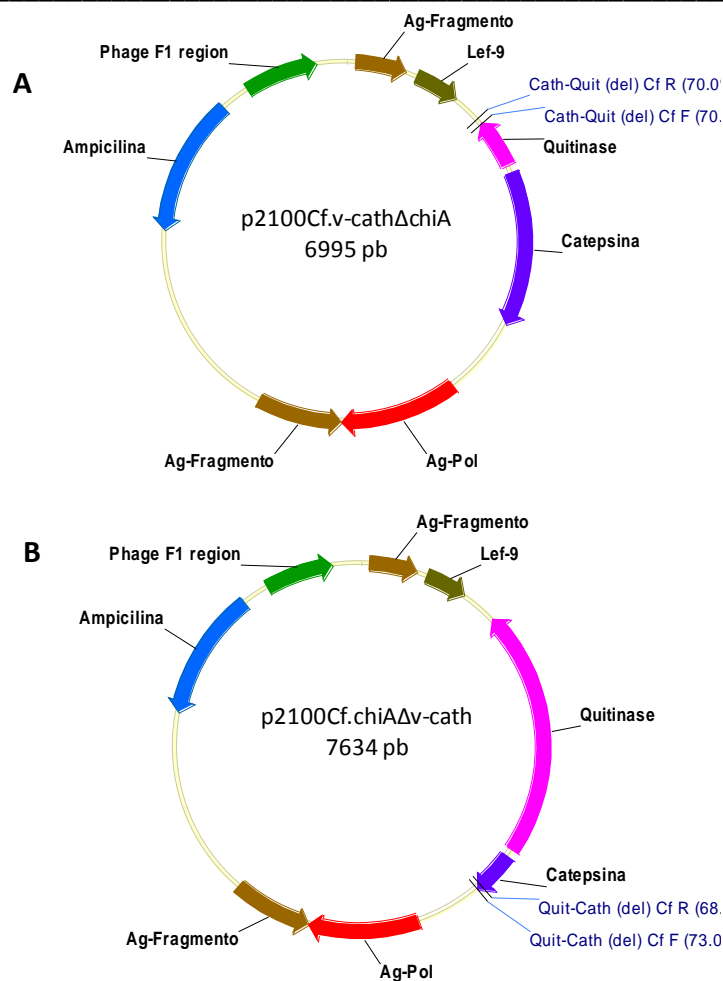


Figura 18: Mapa dos plasmídeos amplificados com a deleção dos genes *chiA* e *v-cath*. As figuras indicam a posição dos pares de oligonucleotídeos específicos para a deleção de cada um dos genes, a partir do plasmídeos p2100Cf.chiA/v-cath.

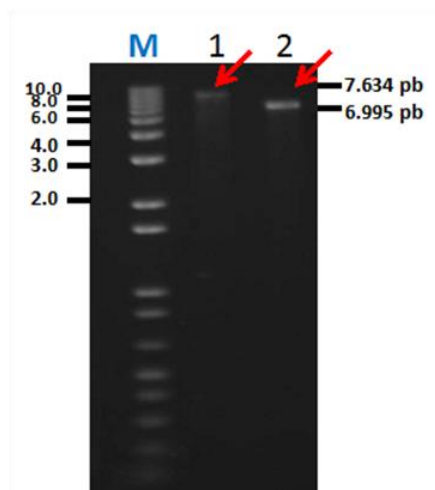


Figura 19: Gel de agarose (0,8%) mostrando os produtos de PCR amplificados a partir de oligonucleotídeos específicos para a deleção dos genes *chiA* e *v-cath*. M – marcador de massa molecular 1 Kb DNA Plus (Invitrogen). 1 – A seta indica o fragmento de 7.634 pb amplificado, a partir do DNA do p2100Cf.chiA/v-cath, correspondente ao gene *chiA* juntamente com o promotor e o gene da poliedrina do *AgMNPV*. 2 – fragmento de 6.995 pb amplificado, a partir do DNA do p2100Cf.chiA/v-cath, correspondente ao gene *v-cath* juntamente com o promotor e o gene da poliedrina do *AgMNPV*.

O fragmento de 7.634 pb correspondente ao gene *chiA* com o gene *v-cath* deletado foi extraído e purificado do gel de agarose e o mesmo procedimento aplicou-se para o fragmento de 6.995 pb, correspondente ao gene *v-cath* com o gene *chiA* deletado. Em ambos fragmentos, a presença do promotor e do gene da poliedrina do baculovírus *AgMNPV* será relevante para a futura construção dos vírus recombinantes contendo a deleção dos genes. Nos oligonucleotídeos sintetizados para tal finalidade foi acrescentado as suas extremidades o sítio de restrição *EcoRI*. Sendo assim, após purificação dos fragmentos de PCR e de uma reação de digestão utilizando a enzima de restrição *EcoRI*, as extremidades tornaram-se coesivas, linearizando o fragmento de 7.634 pb e 6.995 pb. Futuramente, estes fragmentos serão utilizados na construção dos vírus recombinantes contendo as deleções.

4.2 Construção e confirmação dos vírus recombinantes *AgMNPV*:

A construção e a confirmação do vírus *vAgp2100Cf.chiA/v-cath* foi descrita por Lima (2008) e após o isolamento do vírus recombinante em placas de diluição seriada, a confirmação da inserção gênica, no genoma do baculovírus *AgMNPV*, foi realizada por PCR. No presente trabalho, a construção e a confirmação do vírus recombinante *vAgp2100Ac.chiA/v-cath* seguiu a mesma estratégia utilizada anteriormente. O plasmídeo *p2100Ac.chiA/v-cath* foi co-transfectado com o DNA do baculovírus recombinante *vAgGalA2* em células de inseto UFL-AG-286, dando origem ao vírus recombinante *vAgp2100Ac.chiA/v-cath*. No interior das células de inseto, ocorreu o evento da recombinação homóloga entre as regiões do vetor e do genoma viral, havendo a troca de regiões homólogas entre os dois DNAs. O vetor de transferência *p2100Ac.chiA/v-cath* possui além do gene de interesse (*chiA* e *v-cath*), o gene da poliedrina, conferindo ao vírus recombinante (*vAgp2100Ac.chiA/v-cath*) a capacidade

de expressar poliedrina e produzir OB em células de inseto infectadas (Figura 12 e 21). Após o isolamento em placas de diluição seriada (O'Reilly *et al*, 1992), a confirmação da inserção gênica, no genoma do baculovírus *AgMNPV*, foi realizada por PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos e foi possível observar a amplificação de um fragmento de 1.004 pb correspondente ao gene *v-cath* e 1796 pb referente ao gene *chiA* (Figura 20).

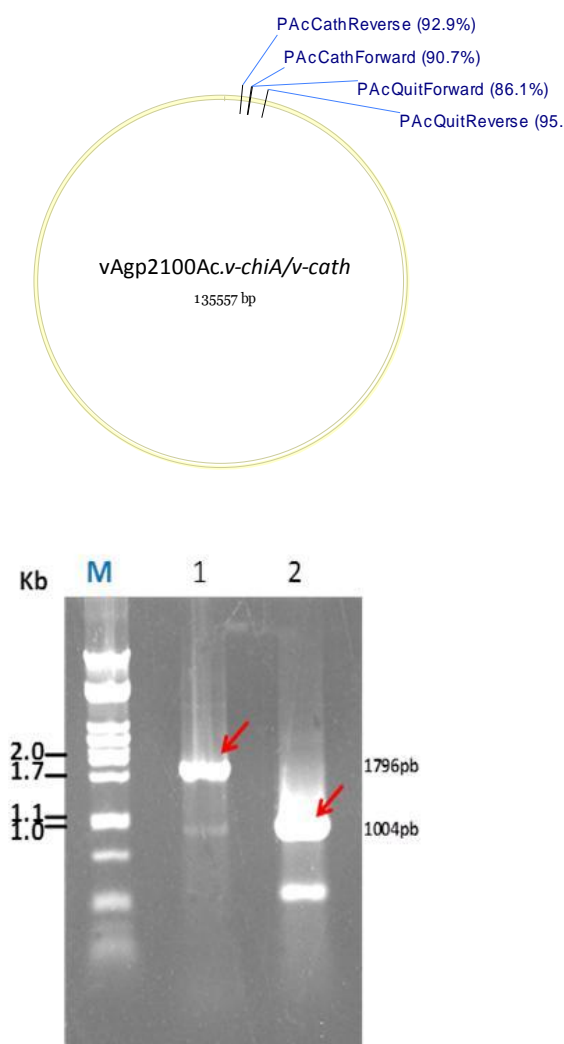


Figura 20: Confirmação da inserção dos genes *chiA* and *v-cath* de *AcMNPV* no genoma do *AgMNPV*. Gel de agarose 0.8% mostrando os produtos de PCR amplificado a partir de oligonucleotídeos específicos para os genes *chiA* e *v-cath*. M – marcador de massa molecular 1 Kb DNA Plus (Invitrogen). 1 – Fragmento de 1.796 pb amplificado, a partir do DNA do vAgp2100Ac.chiA/v-cath, por PCR com oligonucleotídeos específicos para o gene *chiA*. 2 – A seta indica o fragmento de 1.004 pb amplificado, a partir do DNA do vAgp2100Ac.chiA/v-cath, correspondente ao gene *v-cath*.

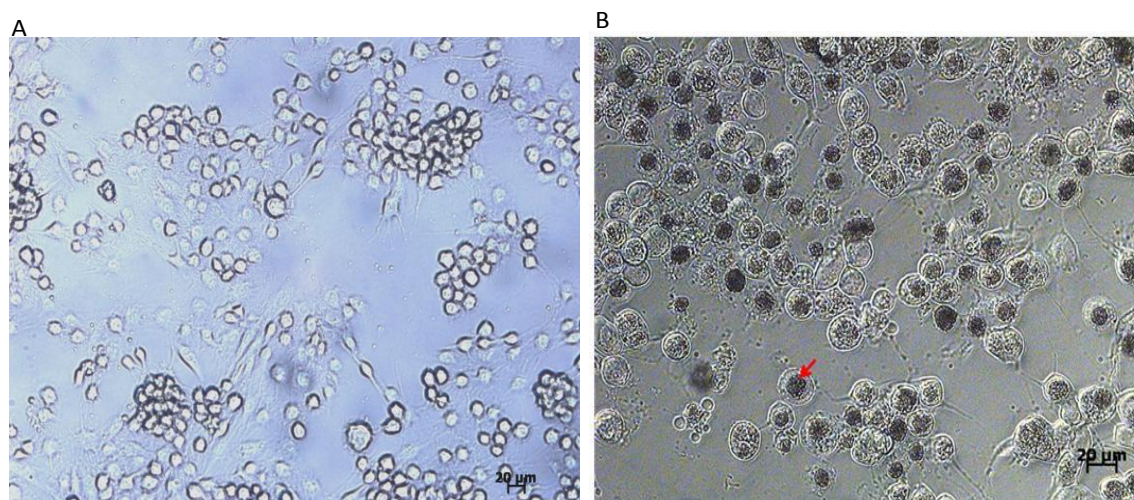


Figura 21: Análise estrutural da infecção de células UFL-AG-286 pelo vAgp2100Ac.chiA/v-cath. (A) Células UFL-AG-286 não infectadas. (B) Células UFL-AG-286 infectadas com o vírus recombinante vAgp2100Ac.chiA/v-cath, com 168 h p.i. e a seta indica os poliedros no núcleo de uma célula infectada.

4.3 Análise do efeito causado pelo vírus recombinante vAgp2100Ac.chiA/v-cath em larvas de *Anticarsia gemmatalis*:

Quando larvas de *A. gemmatalis* foram inoculadas, com o vírus selvagem AgMNPV-2D e os recombinantes vAgp2100Cf.chiA/v-cath e vAgp2100Ac.chiA/v-cath foi possível observar o efeito causado pela inserção dos genes *chiA* e *v-cath*. Todas as larvas mortas pelo vírus vAgp2100Cf.chiA/v-cath apresentaram no final da infecção a degradação da cutícula do seu corpo, caracterizados por uma massa líquida viscosa e pela melanização da cutícula das larvas caracterizada por uma coloração preta (Lima, 2008). Para analisar se a ausência de melanização e liquefação em larvas de *A. gemmatalis* ao final da infecção está associada com a ausência dos genes *chiA* e *v-cath* no genoma do baculovírus AgMNPV, larvas de *A. gemmatalis* foram infectadas com o vírus vAgp2100Ac.chiA/v-cath, ou seja, com um baculovírus AgMNPV recombinante contendo os genes *chiA* e *v-cath* provenientes do AcMNPV, entretanto não apresentaram o efeito esperado pela melanização e liquefação do inseto hospedeiro (Figura 22). O corpo das larvas permaneceu intacto com relação ao efeito provocado

pelo vírus vAgp2100Cf.chiA/v-cath. As larvas infectadas com o vírus selvagem AgMNPV-2D também não apresentaram melanização e degradação da cutícula do corpo da larva no final da infecção, como o esperado, já que o baculovírus AgMNPV-2D não possui em seu genoma estes dois genes. Contudo, devemos levar em consideração a distância filogenética entre os baculovírus AgMNPV e AcMNPV os quais encontram-se classificados no gênero Alphabaculovirus porém em grupos diferentes, em relação a distância filogenética entre o AgMNPV e CfDefNPV, que por sua vez, encontram-se no gênero Alphabaculovirus e estão agrupados no mesmo grupo, além de, compartilharem uma maior porcentagem de similaridade genética.



Figura 22: Análise estrutural de larvas de *A. gemmatalis* infectadas com o vírus selvagem e o vírus recombinante. (A) Análise estrutural de larvas de *A. gemmatalis* infectada com o vírus AgMNPV-2D e com o vírus recombinante vAgp2100Ac.chiA/v-cath a 168 h p.i., apresentando a ausência de liquefação e melanização no corpo da larva. (B) Larva de *A. gemmatalis* infectada com vAgp2100Cf.chiA/v-cath a 168 h p.i., apresentando o corpo liquefeito e a cutícula melanizada e larva infectada como vírus selvagem a 168 h p.i.

4.4 Análise da expressão temporal dos genes *chiA* e *v-cath* do CfDefNPV em células de inseto:

Os genes *chiA* e *v-cath*, do AcMNPV e do vírus recombinante vAgp2100Cf.chiA/v-cath, foram amplificados por PCR com os pares de oligonucleotídeos sintetizados (Figura 23), para então construir uma curva padrão para quantificação do DNA. Os produtos de PCR foram, então, purificados, quantificados e diluídos em série onde curvas padrão para cada gene foram feitas em duplicata, pela técnica de PCR em tempo real.

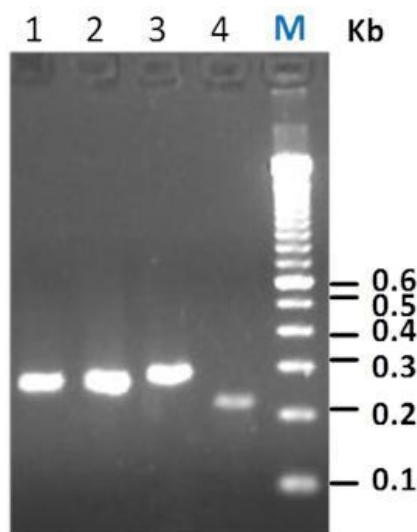


Figura 23: Amplificação dos genes *chiA* e *v-cath* com os oligonucleotídeos específicos para PCR em tempo real. Gel de Agarose 2% mostrando a amplificação dos genes *v-cath* do AcMNPV (poço1), *chiA* do AcMNPV (poço2), *v-cath* do AgMNPV recombinante, vAgp2100Cf.chiA/v-cath (poço 3) e *chiA* do AgMNPV recombinante, vAgp2100Cf.chiA/v-cath (poço 4). M - 100 bp DNA Ladder.

A partir da diluição seriada foi construída a curva padrão de cada gene, analisando o coeficiente de correlação da curva (R^2), que indica a concentração de DNA em cada amostra e a eficiência de amplificação indicando a ocorrência da duplicação da amplificação dos produtos em cada ciclo. Após verificar que os padrões estavam de acordo com o esperado as PCRs em tempo real foram analisadas para cada gene.

Células UFL-AG-286 infectadas com o vírus recombinante vAgp2100Cf.chiA/v-cath foram coletadas em diferentes tempos após a infecção (0, 6, 12, 24, 48 e 72 h p.i.). O mesmo procedeu para células SF-9 infectadas com o vírus selvagem AcMNPV. Utilizamos como controle positivo o baculovírus AcMNPV ao invés do baculovírus selvagem CfDefNPV devido a indisponibilidade deste vírus no Laboratório de Virologia (Instituto de Ciências Biológicas – UnB), assim como, por se tratar de um vírus defeituoso, o qual seria necessário a presença de um outro vírus (no caso o CfMNPV) para auxiliar e completar a sua infecção, dificultando assim a análise.

Os cDNAs produzidos a partir de cada gene, em diferentes tempos após a infecção foram utilizados nas PCRs em tempo real para a *chiA* e a *v-cath* tanto do vírus selvagem quanto de recombinante vAgp2100Cf.chiA/v-cath. Os dados gerados foram transformados em cópias de genes/μg de RNA por escala logarítmica de base 10 (\log_{10}), gerando um gráfico da expressão temporal dos genes *chiA* e *v-cath* que foram analisados entre os vírus (Figura 24 e 25).

Em relação ao nível de expressão temporal apresentado pelos genes *chiA* e *v-cath*, presentes no genoma do baculovírus AgMNPV, foi maior na linhagem UFL-AG na maioria dos pontos amostrados quando comparado com a expressão temporal dos genes *chiA* e *v-cath* presentes naturalmente no genoma do baculovírus selvagem AcMNPV e infectadas na linhagem SF-9. Devido à alta sensibilidade da técnica foi possível detectar a expressão nas horas iniciais

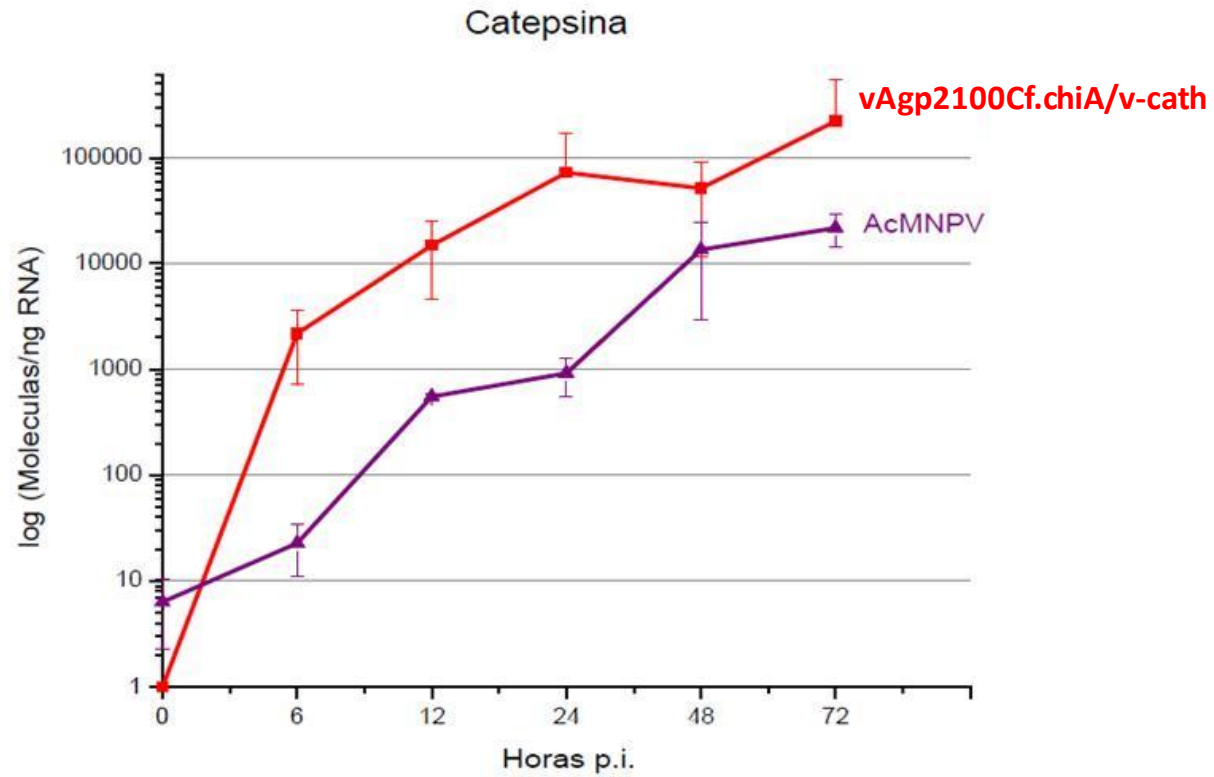


Figura 14: Média da expressão temporal do gene *v-cath*. O gráfico mostra a expressão logarítmica do gene *v-cath* (eixo Y) em células infectadas com os vírus selvagens AcMNPV e recombinante, analisadas em diferentes horas após a infecção (eixo X). As barras representam o desvio padrão.

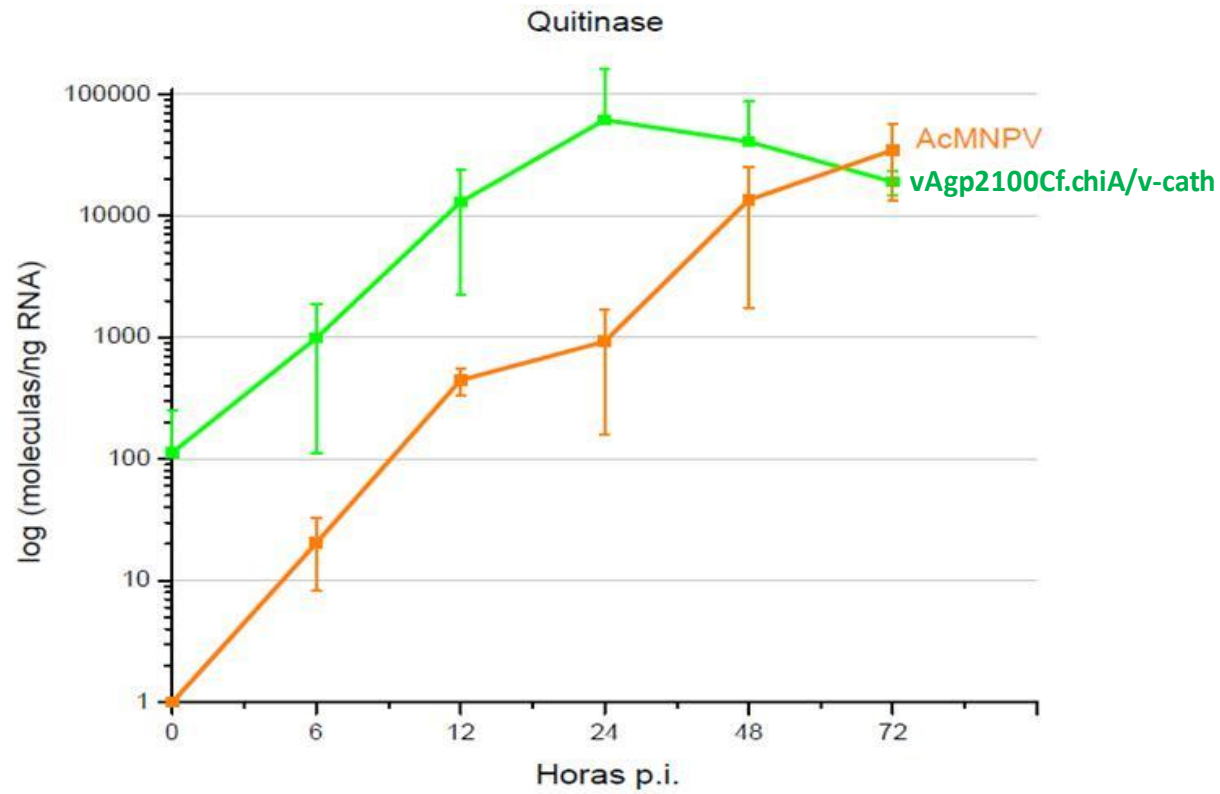


Figura 15: Média da expressão temporal da *chiA*. O gráfico mostra a expressão logarítmica da *chiA* (eixo Y) em células infectadas com os vírus selvagens AcMNPV e recombinante, analisadas em diferentes horas após a infecção (eixo X). As barras representam o desvio padrão.

4.5 Bioensaios:

Os valores obtidos na CL_{50} para o vírus recombinante vAgp2100Cf.chiA/v-cath e para o vírus selvagem AgMNPV foram 0,145 e 0,610 OB/nL, respectivamente (Tabela 6). Apesar do resultado mostrar que a concentração necessária para o vírus recombinante matar 50% das larvas testadas foi aproximadamente 3 vezes menor que a CL_{50} do vírus selvagem, os limites fiduciais se sobrepõem, logo não existe diferença significativa nos valores de CL_{50} para larvas neonatas. Entretanto, a CL_{50} para o vírus recombinante vAgp2100Cf.chiA/v-cath em larvas de 3º estágio de desenvolvimento foi 2.7 a 2.8 vezes menor quando comparado com os vírus selvagens AgMNPV-2D e AgMNPV (LDB80), respectivamente (Tabela 7).

Tabela 6: Concentração letal média (CL_{50}) para larvas neonatas de *A. gemmatilis* infectadas oralmente com poliedros dos vírus AgMNPV e vAgp2100Cf.v-chiA/v-cath. Método de Probit.

Vírus	CL_{50} (OB/nl)	FL (95%)	Slope \pm (SE)	χ^2
		(lower – upper)		
vAgp2100Cf.chiA/v-cath	0,145	0,0065-2,694	3,61	1,09
AgMNPV-2D	0,610	0,035-3,231	3,32	3,80

CL_{50} Concentração letal média de poliedros (OB/nl) necessária para matar 50% da população de insetos em teste.

FL: limites fiduciais

SE: erro padrão

χ^2 : qui-square

Tabela 7: Concentração letal média (CL₅₀) para larvas no 3º instar de *A. gemmatalis* infectadas oralmente com poliedros dos vírus *AgMNPV* e *vAgp2100Cf.v-chiA/v-cath*. Método de Probit.

Vírus	Total no. of insect	LC ₅₀ (OB/ml) FL (95%)	Slope ± (SE)	χ ²
<i>vAgp2100Cf.chiA/v-cath</i>	873	723,65 (521,96-1034,51)	1,314 ± 0,085	5,72
<i>AgMNPV-2D</i>	865	1942,49 (1249,10-3500,30)	0,947 ± 0,076	4,82
<i>AgMNPV (LDB80)</i>	876	2023,22 (1556,56-2756,87)	1,087 ± 0,083	2,99

CL₅₀ Concentração letal média de poliedros (OB/ml) necessária para matar 50% da população de insetos em teste.

FL: limites fiduciais

SE: erro padrão

χ²: qui-square

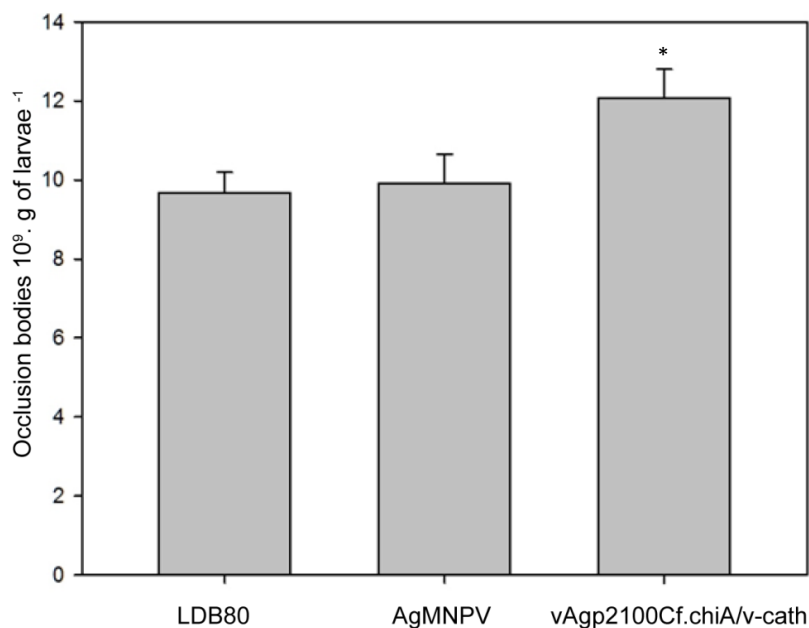


Figura 26: Produção de corpos de oclusão em larvas de *A. gemmatalis* infectadas com os vírus selvagens e o recombinante. A análise foi feita a partir da média das concentrações citadas na tabela IV.1. No gráfico as linhas são de desvio padrão. * $P < 0.05$ (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks).

A quantidade de corpos de oclusão produzidos nas larvas de *A. gemmatalis* foi analisado estatisticamente (produção de corpos de oclusão x 10⁹ por g de lagarta). A análise resultou em diferenças significativas, com maior produção de corpos de oclusão do vírus recombinante vAgp2100Cf.chiA/v-cath em relação aos vírus selvagem AgMNPV-LDB80 e AgMNPV), com probabilidade p=0,023 (Figura 26 e Tabela IV.1). Provavelmente, a presença dos genes *chiA* e *v-cath* no genoma do baculovírus recombinante AgMNPV facilitou a propagação deste vírus em larvas de *A. gemmatalis* devido a uma ação de sinergismo apresentada por estes dois genes ao longo da infecção, provocando o rompimento de barreiras e assim aumentando a virulência deste vírus.

4.6 Análise enzimática:

A atividade quitinolítica analisada a partir dos poliedros purificados dos vírus AgMNPV e vAgp2100Cf.chiA/v-cath, utilizando o método DNS (Miller, 1959) apresentou pouca diferença entre os vírus testados (Figura 27A). No extrato total de células UFL-AG-286 infectadas e coletadas após 72 h de infecção foi observado os níveis de atividade quitinolítica, onde a atividade lítica encontrada nas células infectadas com o vírus vAgp2100Cf.chiA/v-cath foi maior ($A_{595} = 8.23 \pm 1.823$) quando comparado com o extrato de células infectadas com o vírus AgMNPV ($A_{595} = 5.86 \pm 0.689$) e em células não infectadas ($A_{595} = 5.83 \pm 0.526$) (Figura 27B) ($P < 0.05$). O alto nível de detecção de atividade quitinolítica em células não infectadas pode ser atribuído à atividade endógena de quitinases celulares. O gel de poliacrilamida em condição nativa detectou a atividade quitinolítica na presença de quitina glicol 1% (Figura 27C).

Os extratos de células não infectadas e infectadas com o vírus selvagem e recombinante a 48 e 72 h p.i., apresentaram no gel de poliacrilamida bandas marcadas

referentes à região lítica onde a quitina foi degradada pela enzima quitinase, como mostrado pela fluorescência induzida pelo calcofluor (Figura 27C). Os resultados indicam a correta integridade do gene *chiA* no vírus recombinante vAgp2100Cf.chiA/v-cath.

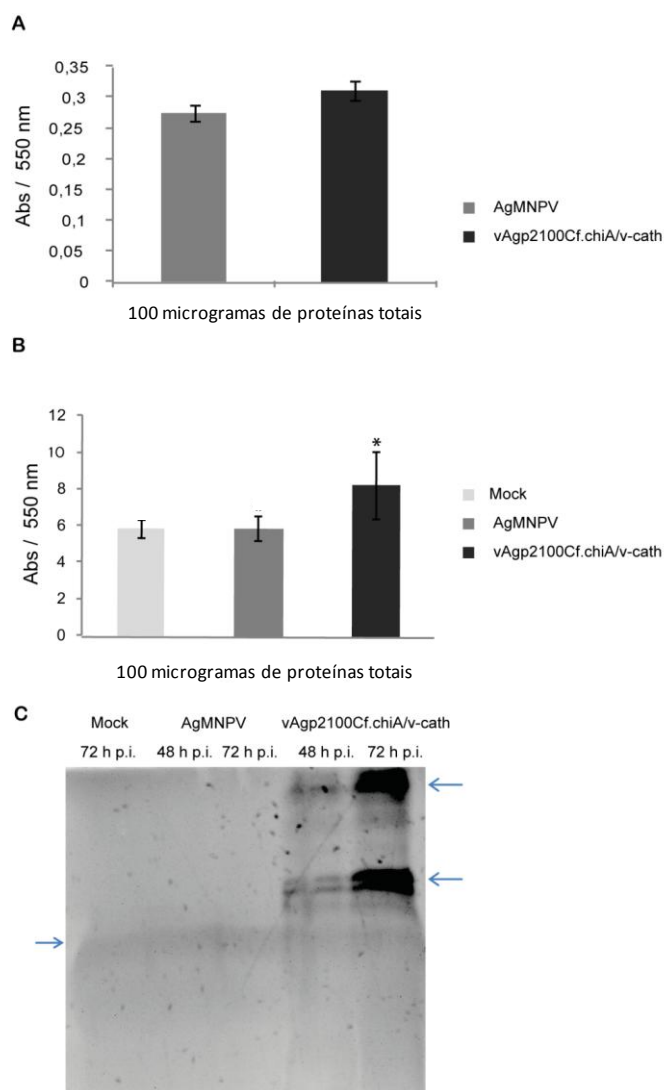


Figura 27: Análise da atividade quitinolítica. (A) Atividade quitinolítica detectada nos poliedros produzido pelo AgMNPV e vAgp2100Cf.chiA/v-cath utilizando o método de DNS (Miller, 1959). (B e C) Atividade quitinolítica detectada a partir do extrato total de células UFL-AG-286 infectadas com os vírus recombinante e com o selvagem (B) e após eletroforese em gel de poliácridamida em condições nativas (C). Em ambos os ensaios, o extrato de células de inseto infectadas com o vírus recombinante apresentou maior atividade de quitinase, quando comparado com o selvagem e com extratos de células de insetos não infectadas. É possível ver uma banda fraca em todos os poços do gel mostrado em C, o que poderia explicar a atividade de quitinase endógena detectado em extrato de células não infectadas e em extrato de células de inseto infectadas com o vírus selvagem. As setas mostram a atividade de quitinase detectada apenas no extrato de células de inseto infectadas com o vírus recombinante. Os ensaios foram feitos em triplicata. * $P < 0.05$ (test-t Student's).

A atividade proteolítica detectada na hemolinfa de larvas não infectadas e larvas infectadas com os vírus AgMNPV e vAgp2100Cf.chiA/v-cath foram mensuradas. Poliedros purificados a partir dos vírus AgMNPV e vAgp2100Cf.chiA/v-cath foram também analisados, utilizando o substrato queratina azulada para detectar a atividade proteolítica. Os resultados apresentados na figura 28(A) mostram que a atividade enzimática detectada na hemolinfa de larvas infectadas com o vAgp2100Cf.chiA/v-cath foi significativamente maior com $P < 0.05$ ($A_{595} = 0.29 \pm 0.011$) quando comparado com a atividade detectada na hemolinfa de larvas não infectadas ($A_{595} = 0.12 \pm 0.004$) e infectadas com o vírus AgMNPV ($A_{595} = 0.18 \pm 0.039$) (Figura 28A). A atividade proteolítica detectada nos poliedros do vírus vAgp2100Cf.chiA/v-cath ($A_{595} = 0.31 \pm 0.007 - P < 0.05$) também foi maior comparado com os poliedros purificados dos vírus selvagem ($A_{595} = 0.19 \pm 0.011$) (Figura 28B).

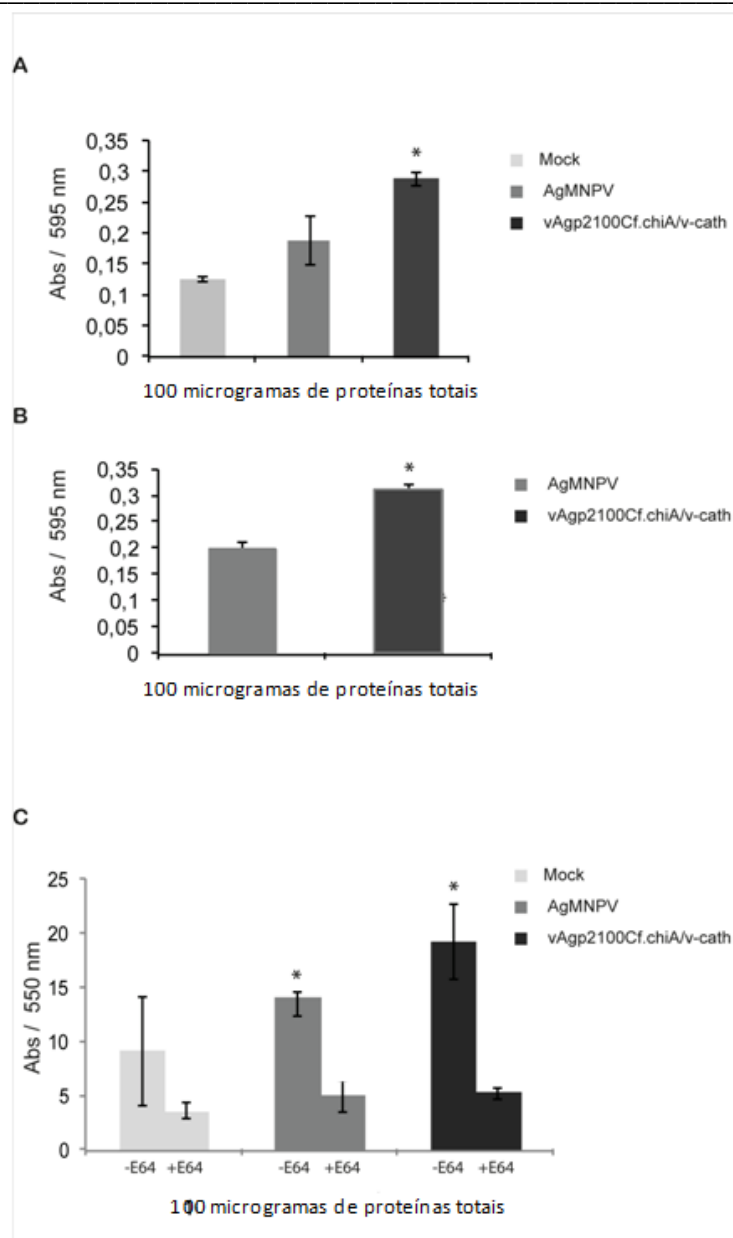


Figura 28: Atividade proteolítica a partir dos poliedros e da hemolinfa produzidos pelos vírus recombinante e selvagem, assim como, do extrato de células de inseto. (A) Atividade proteolítica detectada na hemolinfa extraída de larvas infectadas pelo vírus AgMNPV e vAgp2100Cf.chiA/v-cath usando o substrato queratina azulada. A hemolinfa de larvas infectadas com o vírus recombinante mostrou um aumento da atividade proteolítica quando comparada com células não infectadas e infectadas com o vírus selvagem. (B) Atividade proteolítica detectada nos poliedros produzidos pelo vírus AgMNPV e vAgp2100Cf.chiA/v-cath usando como substrato queratina azulada. A atividade proteolítica nos poliedros do vírus recombinante apresentou um aumento quando comparado com o vírus selvagem (C) Poliedros do vAgp2100Cf.chiA/v-cath mostraram aumento na atividade proteolítica comparado com os AgMNPV poliedros (C) A especificidade da atividade de cisteíno-protease utilizando azocaseína e um inibidor de cisteíno-protease. Foi analisada a atividade de cisteíno-protease no extrato de células de inseto UFL-AG-286 não infectadas e infectadas com os vírus AgMNPV e vAgp2100Cf.chiA/v-cath (40 h p.i.) e foram mensurados na ausência e na presença de um inibidor de protease de cisteína (E-64). Todos os extratos mostraram uma redução no nível de atividade de protease, o que indica a presença de cisteíno-protease em todas as amostras. No entanto, o nível de atividade na ausência de E-64 foi significativamente maior nos extratos de células UFL-AG-286 infectadas com vAgp2100Cf.chiA/v-cath quando comparado com extratos de células UFL-AG-286 infectadas com o AgMNPV. Os ensaios foram feitos em triplicata. * $P < 0,05$ (teste-t de Student).

Células infectadas com os vírus *AgMNPV* e *vAgp2100Cf.chiA/v-cath* foram analisadas pela atividade de cisteíno protease, assim como, células não infectadas a 40 h p.i. As amostras foram analisadas na presença e na ausência de inibidor específico para cisteíno protease, E-64. Foi possível observar uma maior atividade proteolítica nas células infectadas com o vírus recombinante ($A_{280} = 19.25 \pm 1.43$) comparado às células infectadas com o vírus selvagem ($A_{280} = 13.51 \pm 1.15$) e células não infectadas ($A_{280} = 9.12 \pm 1.05$), na ausência do inibidor E-64 (Figura 28C). Todas as amostras apresentaram diminuição nos níveis de atividade proteolítica quando foram analisadas na presença do inibidor de cisteíno protease E-64 (Figura 28C) ($P < 0.05$).

4.7 Construção dos plasmídeos para expressão das proteínas *chiA* e *v-cath* em *E. coli*

A partir da sequência genômica dos genes *chiA* e *v-cath* do vírus CfDefNPV, oligonucleotídeos específicos foram desenhados para a construção dos plasmídeos pDONRCf.*chiA* e pDONRCf.*v-cath* visando a expressão das proteínas heterólogas *chiA* (QUIT) e *v-cath* (CATH) em *E. coli*.

O fragmento amplificado por PCR, a partir do plasmídeo p2100Cf.chiA/v-cath, com os oligonucleotídeos *attBQuit F* e *attBQuit R*, apresentou tamanho de 1.720 pb (Figura 29) correspondente a amplificação do gene *chiA* do CfDefNPV contendo em suas extremidades as regiões *attB*, importante para o primeiro evento de recombinação utilizando o Sistema Gateway, descrito anteriormente.

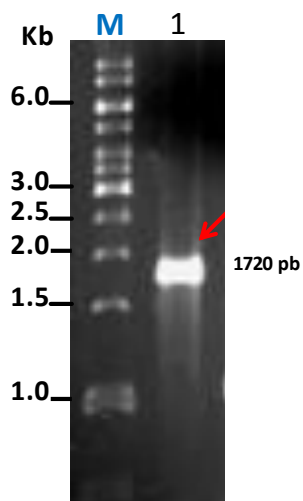


Figura 29: Amplificação do gene *chiA* a partir do plasmídeo p2100Cf.*chiA*/v-cath utilizando oligonucleotídeos attBQuit F e attBQuit R. Gel de agarose (0,8%) mostrando em M - Marcador DNA ladder 1 Kb (Fermentas). Poço 1 – fragmento amplificado de 1.720 pb referente ao gene *chiA* do baculovírus CfDefNPV.

O gene *chiA* amplificado de 1.720 pb foi utilizado para reagir com o plasmídeo pDONR™ 207, no evento de recombinação homóloga, pela ação da enzima BP Clonase™ como mostra o esquema abaixo (Figura 30).

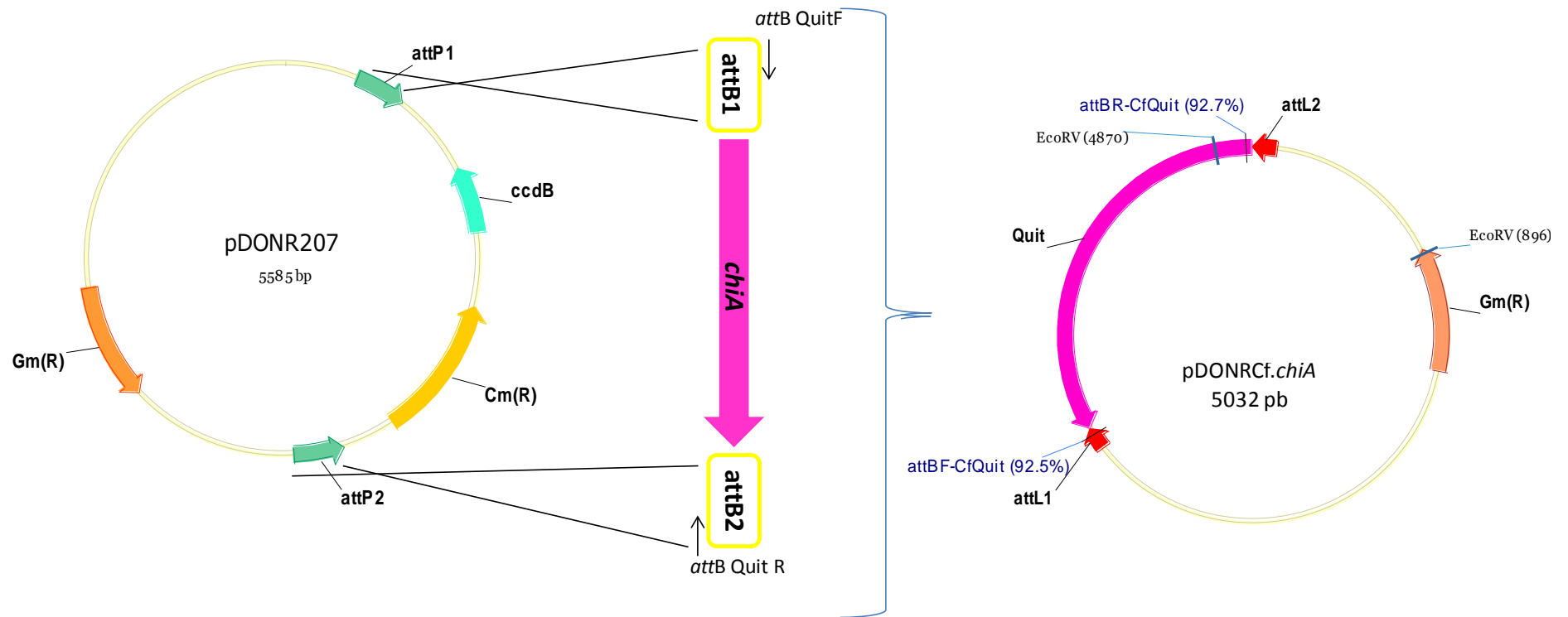


Figura 30: Esquema ilustrativo da construção do plasmídeo pDONRCf.chiA pelo método de recombinação homóloga. A figura apresenta o evento que ocorre entre as regiões *attB* originado a partir do fragmento de PCR e *attP* existente no vetor pDONRTM207(Invitrogen).

O plasmídeo pDONRCf.*chiA* construído apresentou tamanho de 5.032 pb e a sua confirmação foi feita pela digestão com a enzima de restrição *EcoRV* liberando dois fragmentos um de 3.974 pb e outro de 1.058 pb (Figura 31).

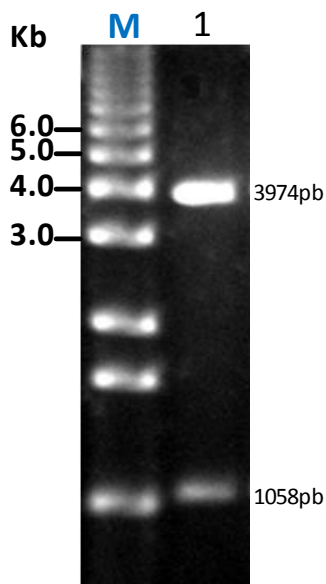


Figura 31: Confirmação da construção do plasmídeo pDONRCf.*chiA*. Gel da agarose (0,8%) mostrando a digestão do pDONRCf.*chiA* com a enzima de restrição *EcoRV*, liberando fragmentos de 3.974 pb e 1058 pb. M - Marcador DNA ladder 1 Kb Plus (Invitrogen).

A construção do plasmídeo pDONRCf.*v-cath* iniciou-se com a amplificação de um fragmento de 1.036 pb, gerado a partir do DNA do p2100Cf.*chiA/v-cath* e dos oligonucleotídeos *attBCath F* e *attBCath R* (Figura 32). O fragmento de PCR, correspondente ao gene *v-cath*, foi utilizado na primeira reação de recombinação homóloga como plasmídeo pDONR™ 207 pela ação da enzima BP Clonase™, gerando um plasmídeo de 4.348 pb (Figura 33).

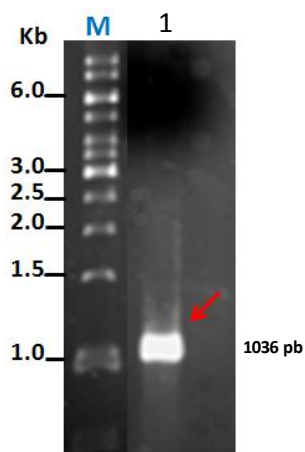


Figura 32: Amplificação do gene *v-cath* a partir do p2100Cf.chiA/*v-cath* utilizando oligonucleotídeos attBCath F e attBCath R. Gel de agarose (0,8%) mostrando em M - Marcador DNA ladder 1 Kb (Fermentas). Poço 1 – fragmento amplificado de 1.036 pb referente ao gene *v-cath* do baculovírus CfDefNPV.

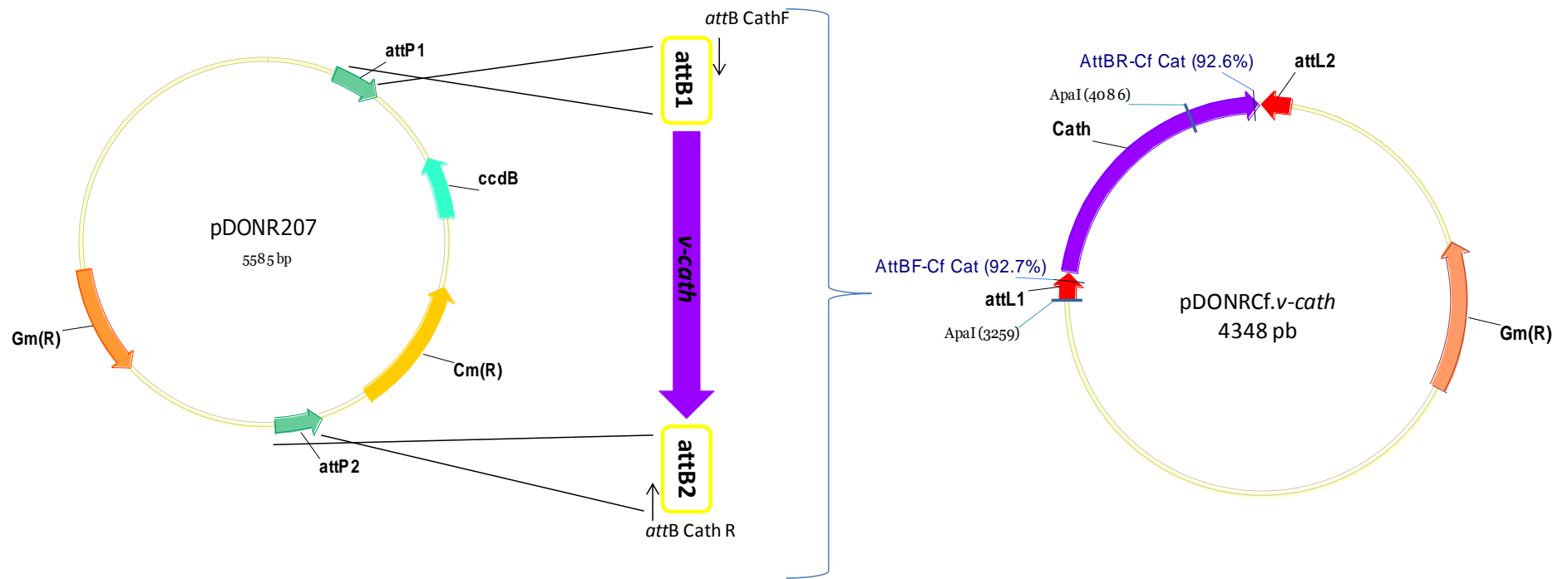


Figura 33: Esquema ilustrativo da construção do plasmídeo pDONRCf.v-cath pelo método de recombinação homóloga. A figura apresenta o evento que ocorre entre as regiões attB originado a partir do fragmento de PCR e attP existente no vetor pDONRTM207.

A confirmação do pDONRCf.v-*cath* foi feita pela digestão com a enzima de restrição *Apa*I apresentando um perfil de restrição com a liberação de dois fragmentos de 3521 pb e 827 pb. (Figura 34).

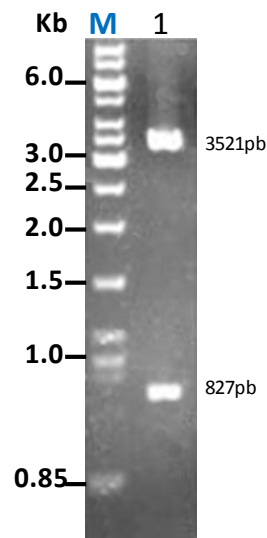


Figura 34: Confirmação da construção do plasmídeo pDONRCf.v-*cath*. Gel de agarose (0,8%) mostrando em (A) poço 1, digestão do pDONRCf.v-*cath* com a enzima de restrição *Apa*I, liberando fragmentos de 3521 pb e 827 pb . M - Marcador DNA ladder 1 Kb (Fermentas).

Uma segunda reação de recombinação foi realizada entre o plasmídeo circular pDONRCf.*chiA* e o vetor pDEST™ 17 pela ação da enzima LR Clonase™ II. O vetor de expressão pDESTCf.*chiA*, contendo o gene *chiA* fusionado com uma cauda de histidina, foi construído apresentando um tamanho de 6.361 pb (Figura 35). A confirmação feita pela digestão do vetor de expressão com as enzimas de restrição *Apa*I e *Bgl*III apresentou um perfil de restrição com a presença de dois fragmentos de 4.800 pb e 1.541 pb (Figura 37).

A mesma estratégia foi utilizada para a recombinação entre o pDONRCf.v-*cath* e o vetor pDEST™ 17, pela ação da enzima LR Clonase™ II. O vetor de expressão pDESTCf.v-*cath* apresentou tamanho esperado de 5.677 pb (Figura 36). A confirmação foi feita pela digestão do vetor de expressão com as enzimas de restrição *Apa*I e *Bgl*III,

confirmando assim, o perfil de restrição com a presença de dois fragmentos de 4.788 pb e 889 pb (Figura 37).

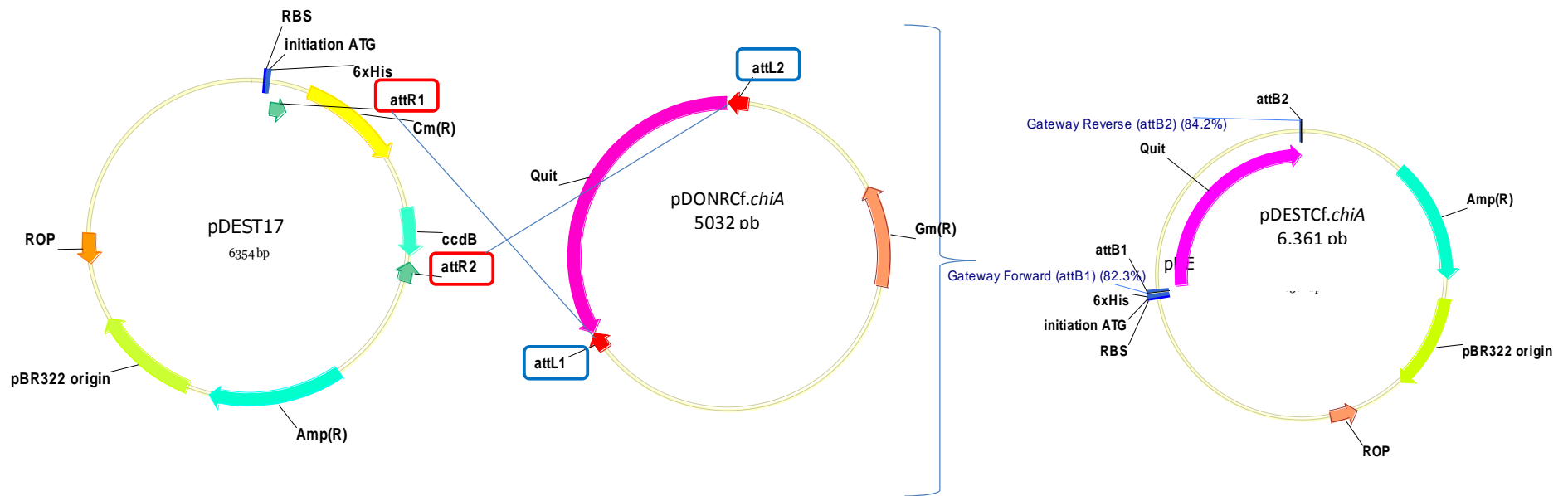


Figura 35: Esquema ilustrativo da construção do plasmídeo pDESTCf.chiA pela reação de recombinação LR. A figura apresenta o evento que ocorre entre as regiões attL originado a partir do fragmento de PCR e attR existente no vetor pDESTTM17.

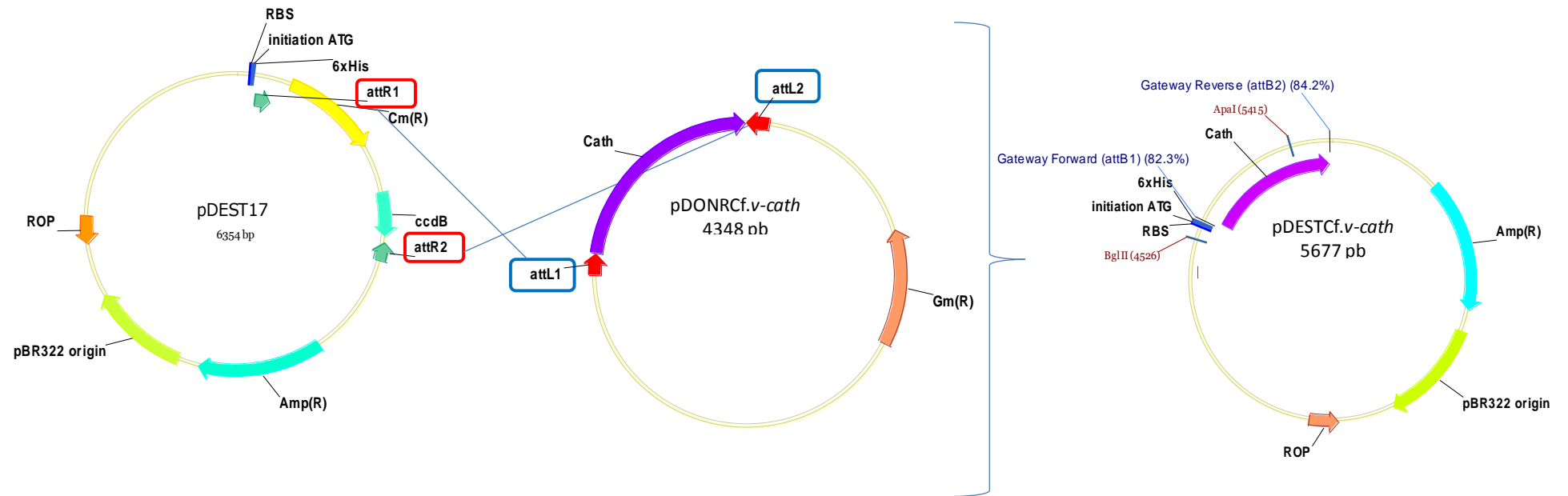


Figura 36: Esquema ilustrativo da construção do plasmídeo pDESTCf.v-cath pela reação de recombinação LR. A figura apresenta o evento que ocorre entre as regiões *attL* originado a partir do fragmento de PCR e *attR* existente no vetor pDESTTM17.

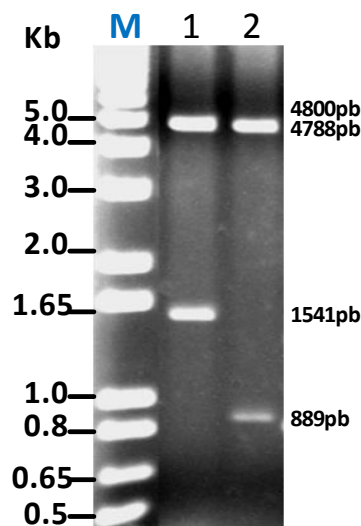


Figura 37: Confirmação da construção dos plasmídeos pDESTCf.chiA e pDESTCf.v-cath pelo perfil de restrição. Gel de agarose (0,8%) mostrando no poço 1 - Digestão do pDESTCf.chiA com as enzimas de restrição *ApaI* e *BglII*, liberando fragmentos de 4.800 pb e 1.541 pb. Poço 2 - Digestão do pDESTCf.v-cath com a enzima de restrição *ApaI* e *BglII*, liberando fragmentos de 4.788 pb e 889 pb. M - Marcador DNA ladder 1 Kb Plus (Invitrogen).

4.8 Análise da expressão das proteínas ChiA e V-CATH em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e imuno-deteção

Os plasmídeos construídos pDESTCf.chiA e pDESTCf.v-cath, baseados no Sistema Gateway, tem por finalidade expressar as proteínas heterólogas em sistema procaríoto. Após confirmação da construção desses plasmídeos foi analisado o perfil da expressão do extrato total de células da linhagem de *E. coli* BL21-AI previamente transformadas com os respectivos plasmídeos e seguido da indução pela adição da L-arabinose para expressar as proteínas ChiA e V-CATH.

Os DNAs dos plasmídeos pDESTCf.chiA e pDESTCf.v-cath, foram transformados em *E. coli* BL21-AI e a indução das proteínas ChiA e V-CATH foi feita pela adição da L-arabinose no meio de cultura. Após 4h de indução das proteínas V-CATH e ChiA, o perfil da expressão do extrato total das células apresentou, no gel SDS-PAGE, o aparecimento de peptídeos com tamanhos esperado de 39 kDa e 37 kDa,

respectivamente, correspondente às proteínas V-CATH e ChiA fusionadas a uma cauda de 6 histidinas no N-terminal (Figura 38A). Entretanto o tamanho do peptídeo esperado para a ChiA deveria ser de 66 kDa, porém análise do sequenciamento do plasmídeo pDESTCf.chiA revelou a deleção de uma base, na posição 342 na sequência de aminoácidos, responsável pela formação de um códon de terminação, produzindo então, uma proteína de 37 kDa (Anexo III). A identidade das proteínas foi confirmada por Western-blot usando um anticorpo anti-His que foi capaz de detectar os respectivos polipeptídeos (Figura 38B).

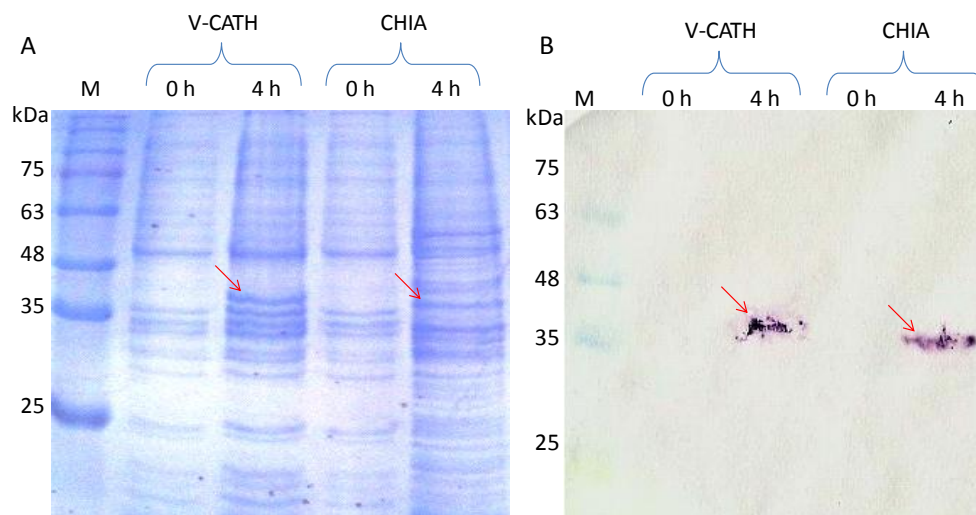


Figura 38: Análise da expressão das proteínas ChiA e V-CATH em *E. coli*. (A) SDS-PAGE 12% do extrato total de células de *E.coli* BL21-AI induzidas para expressar as proteínas heterólogas V-CATH e ChiA. M: Marcador BlueRay Prestained protein Marker (Jena Bioscience). V-CATH: Extrato total de células de *E.coli* não induzidas com a adição da L-arabinose (0 h) e extrato total de células de *E.coli* induzidas por 4 h pela adição da L-arabinose, indicando a expressão de um polipeptídeo com o tamanho esperado de 39 kDa, como indica a seta vermelha. ChiA: Extrato total de células de *E.coli* não induzidas com a adição da L-arabinose (0 h) e extrato total de células de *E.coli* induzidas por 4 h pela adição da L-arabinose, indicando a expressão de um polipeptídeo com o tamanho de 37 kDa, como indica a seta vermelha (B) Imuno-marcação das proteínas heterólogas V-CATH e ChiA com cauda de histidina utilizando o anticorpo anti-His.

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho propôs testar a hipótese relacionada com a introdução dos genes quitinase (*chiA*) e catepsina (*v-cath*), provenientes dos baculovírus CfDefNPV e AcMNPV, no genoma do baculovírus AgMNPV, e sua habilidade em liquefazer e melanizar após a morte o corpo de larvas de *A. gemmatalis*. Esses genes estão presentes em diferentes genomas de baculovírus em uma região altamente conservada dentre as espécies pertencentes ao grupo I dos Alphabaculovírus (Ayes *et al.*, 1994; Lauzon *et al.*, 2005). O gene *v-cath* foi identificado pela primeira vez no genoma do baculovírus AcMNPV durante a análise da sequência de nucleótidos da região a montante do gene de *gp67* (também denominado *gp64*) (Ayes *et al.*, 1994). A proteína codificada por este gene apresenta homologia com uma cisteíno-protease pertencente à família papaína (catepsina), denominada V-CATH (Slack *et al.*, 1995). Lauzon *et al.* (2005), também identificaram o gene *v-cath* no genoma do baculovírus CfDefNPV codificando uma proteína com 76,2% de identidade com a sequência de aminoácidos da V-CATH encontrada no baculovírus AcMNPV, e 88,6% de identidade na sequência de aminoácidos para a V-CATH do baculovírus CfMNPV.

Hawtin *et al.* (1995) detectaram uma ORF no genoma do baculovírus (AcMNPV), que codifica uma proteína homóloga a quitinases de organismos diferentes, em particular a uma quitinase de *Serratia marcescens*, uma bactéria gram-negativa de solo (60,5% de identidade), sugerindo a hipótese de transferência horizontal desse gene a partir da bactéria para o genoma dos baculovírus, além da presença de um ancestral comum para esse gene. Segundo Lauzon *et al.* (2005), após a organização e o sequenciamento do genoma do baculovírus CfDefNPV o gene *chiA*, presente neste genoma, possui 79.3% de identidade com o gene *chiA* do baculovírus AcMNPV.

Antes da conclusão do sequenciamento do genoma do AgMNPV, estudos anteriores indicaram a ausência destes dois genes próximo do locus do gene *gp64*, no genoma deste baculovírus (Slack *et al.*, 2004). No entanto, só após a sequenciamento completo do genoma AgMNPV, foi possível confirmar a ausência destes dois genes (Oliveira *et al.*, 2006). Alguns estudos mostraram que a atividade de V-CATH depende da expressão da ChiA, de maneira que, na ausência do gene *chiA* do AcMNPV, a forma precursora da V-CATH, denominada proV-CATH não é processada em sua forma madura, formando agregados insolúveis dentro de células infectadas (Hawtin *et al.* 1997; Hom e Volkman, 2000). Genes de quitinases de baculovírus são considerados genes virais tardios que codificam uma proteína pertencente à família glicosil hidrolases 18 (Seidl *et al.*, 2008). Saville *et al.* (2004), demonstraram que a deleção do motivo de retenção (KDEL) presente na região terminal-C da ChiA foi suficiente para alterar a sua localização na célula, a partir do citoplasma para a fracção extracelular durante a infecção. Enquanto Slack *et al.* (1995) demonstraram a expressão temporal da proteína V-CATH e confirmaram a sua localização intracelular e a sua expressão tardia.

Alguns estudos demonstraram que a expressão dos genes *chiA* e *v-cath* do baculovírus AcMNPV estão envolvidos no processo de liquefação do corpo do inseto nos estágios finais da infecção, sendo reduzido a uma massa fluida e viscosa (Volkman e Keddie, 1990; Hom *et al.*, 2000). A cutícula do inseto é degradada neste processo sendo que ela serve para proteger o inseto de infecções por patógenos e possível dissecação (Hawtin *et al.*, 1997). Baculovírus mutantes com o gene *v-cath* deletado não apresentaram liquefação do corpo de inseto hospedeiro (Slack *et al.*, 1995; Hawtin, *et al.*, 1997).

A ausência de ambos os genes pode ser responsável pela não degradação da cutícula e melanização da cutícula de *A. gemmatalis*, após a morte, quando infectadas com o baculovírus selvagem *AgMNPV* (Oliveira *et al.*, 2006). Os principais sintomas observados em larvas infectadas por baculovírus são a flacidez do corpo e a cutícula extremamente frágil. Nos tecidos internos, ocorre à degradação dos componentes protéicos da membrana basal e em alguns casos, dependendo do patógeno, ocorre à melanização e a degradação da cutícula (Hom *et al.*, 2000).

A construção de baculovírus recombinantes pela inserção de genes heterólogos tem sido realizada com o objetivo de aumentar a virulência desses vírus contra seus insetos hospedeiros, além de expressar proteínas heterólogas em cultura de células de insetos (Hammock *et al.*, 1990; Jarvis *et al.*, 1997; Moscardi, 1998; Castro *et al.*, 1999). A fim de observar os possíveis efeitos, como a degradação e a melanização da cutícula das larvas de *A. gemmatalis*, foi construído no presente trabalho o vírus recombinante *vAgp2100Ac.chiA/v-cath*, que contém os genes *v-cath* e *chiA* do baculovírus *AcMNPV*. A análise do efeito causado pelos genes *chiA* e *v-cath* do baculovírus *CfDEfNPV* quando introduzidos no genoma do baculovírus *AgMNPV* foi observado com a construção do vírus *vAgp2100Cf.chiA/v-cath* (Lima, 2008), apresentando o efeito esperado da liquefação e melanização do corpo das larvas de *A. gemmatalis* após a morte. A estratégia utilizadas, no presente trabalho, para confirmar a inserção desses dois genes no genoma do baculovírus *AgMNPV* por PCR apresentou a amplificação dos fragmentos correspondentes aos genes *chiA* e *v-cath* no genoma viral.

O gene *chiA* pertencente aos baculovírus são considerados genes virais tardios que codificam proteínas de aproximadamente 58 kDa (Saville *et al.*, 2002 e 2004). Slack e colaboradores (1995) mostraram a expressão temporal da proteína V-CATH onde

análise por *Western blot* confirmou a ausência da detecção da enzima antes de 22 h p.i., indicando que a expressão da *v-cath* é tardia e por isso, a catepsina pode contribuir com o processo de liquefação do tecido observado na patogênese durante a infecção. As análises transcricionais dos genes *chiA* e *v-cath* por PCR em tempo real apresentaram um nível de expressão maior na linhagem UFL-AG-286 pouco antes de 6 h p.i., para os dois genes analisados, quando comparado com a infecção do AcMNPV selvagem em células SF-9. Estes resultados indicam que genes estão sendo expressos desde as primeiras horas após a infecção, porém, apresentaram um nível maior da expressão entre 24 e 48 h p.i., ou seja, na fase muito tardia (“very late”) da infecção de células UFL-AG-286.

Neste trabalho, larvas foram observadas quando infectadas, via microinjeção, com os vírus AgMNPV e vAgp2100Ac.chiA/v-cath. Anteriormente foi possível analisar a melanização e a degradação da cutícula com o vírus recombinante vAgp2100Cf.chiA/v-cath a 168 h p.i. (Lima, 2008), porém, não foi observado em larvas infectadas com o vírus vAgp2100Ac.chiA/v-cath e com o vírus selvagem AgMNPV, a 168 h p.i. Estes resultados sugerem que a ação sinérgica existente entre os genes *chiA* e *v-cath* não foi suficiente para promover os sintomas necessários de degradar e melanização no corpo das larvas de *A. gemmatalis*. Daimon *et al.* (2006) demonstraram que em larvas de *B. mori* infectadas por BmNPV com o gene *chiA* deletado, a liquefação do corpo das larvas e a ativação de cisteíno-proteases, codificado pelo baculovírus, não foram observadas.

O fato de não termos obtido sucesso na construção do vírus vAgp2100Ac.chiA/v-cath, deve ser avaliada, levando em consideração a dificuldade de se construir um vírus recombinante pelo método de recombinação homóloga uma vez

que a proporção de vírus recombinantes produzidos após a co-transfecção é por volta de 0,1 a 1% com relação ao vírus parental (Kitts *et al.*, 1990). Além da própria metodologia que pode ter falhado. Portanto, novas estratégias para construção do vírus *AgMNPV* recombinante contendo os genes *chiA* e *v-cath* proveniente do *AcMNPV* serão testadas

Como relatado anteriormente, esses genes são considerados genes auxiliares, ou seja, apresentam alguma vantagem seletiva ao vírus, porém não são necessários para a replicação viral em culturas de células ou insetos (Slack, *et al.*, 1995). Entretanto, a deleção de um desses genes pode comprometer o sintoma característico da presença dos dois genes, a liquefação e melanização do corpo do inseto hospedeiro (Slack, *et al.*, 1995; Hawtin *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2006).

Hodgson *et al.* (2007) demonstraram por hibridação, utilizando a técnica Northern blot, o RNA dos genes *chiA* e *v-cath* do baculovírus *AcMNPV* que foram melhor expressos entre 9-48 h p.i. em células de inseto (Sf21), e o acúmulo de quitinase intracelular durante a infecção por *AcMNPV* seguiu o mesmo padrão observado para a transcrição do gene *chiA*, porém com um atraso de 6 h (de 15 a 48 h p.i.). Embora a técnica de amplificação em cadeia pela polimerase seja mais sensível que a técnica de Northern blot, os estudos estão de acordo com os nossos resultados de qRT-PCR que demonstraram a presença de transcritos específicos de *chiA* e *v-cath* desde o início até a fase tardia da infecção,

A inserção de genes quitinase e protease heterólogas no genoma do baculovírus *AcMNPV* com o objetivo de melhorar a sua atividade inseticida já foi descrita em diferentes trabalhos (Harrison e Bonning, 2001; Gopalakrishnan *et al.*, 1995; Gramkow *et al.* 2010). Assim, Hodgson *et al.* (2007) sugeriram que o perfil de expressão modificado do gene *chiA* durante uma infecção viral, seria possível aumentar a sua

virulência. De acordo com Hawtin *et al.* (1997), a deleção dos genes *chiA* e *v-cath* no genoma do baculovírus AcMNPV não teve nenhum efeito significativo na LD₅₀ e no tempo de sobrevivência (TS₅₀) contra larvas de *Tricoplusia ni* no segundo ínstar. Neste trabalho, o vírus recombinante vAgp2100Cf.chiA/v-cath, contendo os genes *v-cath* e *chiA* sob o controle de seus promotores nativos, foi capaz de diminuir cerca de 3 vezes o valor da CL₅₀ para larvas *A. gemmatalis* quando comparada com o vírus selvagem (Tabelas 6 e 7). O resultado sugere que a expressão desses genes em larvas infectadas pode facilitar a propagação da infecção viral no organismo hospedeiro, e, conseqüentemente, é necessário uma concentração mais baixa do vírus recombinante para matar o inseto.

Vieira *et al.* (2012), caracterizaram um isolado de SfMNPV que não causou a liquefação do tegumento do hospedeiro, denominado SfMNPV-6nd, onde análise de sequenciamento revelou uma mutação no gene *chiA* modificando o tamanho da enzima produzida. Para avaliar o potencial biopesticida deste isolado bioensaios foram feitos e comparado com outro isolado altamente virulento, SfMNPV-19. A CL₅₀ dos dois isolados não foi significativamente diferente, porém SfMNPV-6nd apresentou maior período de tempo (16,9 h) para matar larvas de *S. frugiperda* no 2º instar do que SfMNPV-19, sugerindo então que a ausência de expressão da quitinase faz com que o tempo de sobrevivência da lagarta fosse maior, além da manipulação das larvas infectadas que foi facilitada devido à manutenção da integridade do tegumento das larvas. Estes resultados estão de acordo com o que foi observado por Daimon *et al.* (2007) onde uma mutação no sítio ativo da CHIA de BmNPV resultou na perda completa de atividade quitinolítica, além de larvas *Bombyx mori* infectadas com o vírus mutante (103ChiAmut) sobreviveram mais tempo do que larvas infectadas com o tipo selvagem BmNPV e não sofreu liquefação do terminal após a morte.

Daimon *et al.* (2006) demonstraram que a atividade de cisteíno-proteases foi baixa em extratos de células de inseto BmN infectadas com vírus recombinante contendo a quitinase deletada, BMNPV(chiA-), e na hemolinfa de larvas de *Bombyx mori* infectado com um BmNPV recombinante contendo o gene *chiA* deletado. Eles também demonstraram que a atividade de cisteíno-proteases foi recuperada pelo gene *chiA* BmNPV quando dirigido pelo promotor da poliedrina.

No presente estudo, verificamos uma maior atividade proteolítica específica para catepsina a partir dos poliedros, extrato de células UFL-Ag-286 e da hemolinfa de larvas de *A. gemmatalis* infectadas com o vírus vAgp2100Cf.chiA/v-cath quando comparado aos poliedros do vírus AgMNPV, extratos de células UFL-Ag-286 e hemolinfa de larvas infectadas pelo AgMNPV. Nossos resultados sugerem que a atividade proteolítica nas análises feitas com o vírus selvagem AgMNPV pode ter sido detectada, ainda que em baixos níveis, provavelmente devido a presença de proteases celulares, que são essenciais para as diferentes vias metabólicas (Kramer *et al.*, 1997) ou pela existência de algum homólogo funcional da *v-cath*, como por exemplo, uma metaloproteinase (Hashimoto *et al.*, 2000).

A atividade quitinolítica detectada a partir dos poliedros purificados dos vírus AgMNPV e vAgp2100Cf.chiA/v-cath demonstrou que não houve diferença significativa. Entretanto, a atividade quitinolítica foi maior nos extratos de células UFL-AG-286 infectadas com o vírus recombinante (72 h p.i.) quando comparado ao vírus selvagem e células não infectadas. O fato do vírus selvagem, que atuou como controle negativo neste trabalho, detectar atividade quitinolítica a partir dos poliedros purificados de larvas infectadas com o vírus selvagem pode ser explicado devido à presença de quitinases produzidas pelas larvas hospedeiras (Kramer *et al.*, 1997). A detecção da

atividade da quitinase após PAGE em condições nativas, a partir do extrato de células UFL-AG-286 infectadas com o vírus vAgp2100Cf.chiA/v-cath e coletadas a 48 e 72 h p.i., pode ser atribuída a presença da enzima quitinase introduzida no genoma do baculovírus recombinante construído.

Visando um estudo mais detalhado com relação à funcionalidade e expressão dos genes *chiA* e *v-cath* separadamente foram também construídos neste trabalho os plasmídeos p2100Cf.chiA. Δ v-cath e p2100Cf.v-cath. Δ chiA, uma vez que vários relatos na literatura indicam que esse dois genes atuam em conjunto quando o objetivo é liquefazer o corpo dos insetos hospedeiros. Entretanto, ainda não foi possível construir os vírus recombinantes a partir desses plasmídeos.

A construção de baculovírus recombinantes com a inserção dos genes *chiA* e *v-cath* no genoma do baculovírus *AgMNPV* confirma o envolvimento desses genes na liquefação e melanização do corpo de larvas de lepidópteros infectados por baculovírus, assim como, a capacidade destes genes em interferir na virulência desse vírus.

Por tanto, estudos envolvendo a construção de baculovírus recombinantes visando o aumento da patogenicidade e da virulência, pela expressão de genes que atuam nos processos de degradação do hospedeiro, assim como, elucidar as funções destes genes é de grande importância para estudos de base que visam futuras aplicações no campo, e assim, contribuir para o controle de insetos praga de plantações de interesse econômico.

CAPÍTULO II

“Análise da ação de quitinases do fungo entomopatogênico

Metarhizium anisopliae, como inseticida contra larvas de *Spodoptera frugiperda* infectadas por baculovírus recombinante”

1 INTRODUÇÃO

Larvas de *S. frugiperda* também são consideradas importante praga de interesse econômico, sendo considerada a uma das principais pragas da cultura do milho apresentando redução de até 34% das plantações. Para controlar biologicamente esta praga, o baculovírus *S. frugiperda* MNPV (SfMNPV) já foi utilizado em lavouras (Valicente e Cruz, 1991). Uma outra praga de interesse econômico seria a lagarta da soja *A. gemmatilis*, que também já foi utilizada em programas de controle biológico utilizando o baculovírus AgMNPV. Sendo assim, visando o aumento da velocidade de mortes de pragas, baculovírus recombinante tem sido construídos para aumentar sua propriedade como bioinseticida.

Alguns microrganismos entomopatogênicos produzem quitinases para penetração no corpo hospedeiro (Kramer & Muthukrishnan, 1997; Gooday, 1999). Com relação à descrição das funções celulares de diferentes quitinase o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* é considerado um modelo importante. Essas quitinases estão, entre outras enzimas, provavelmente envolvidas na infecção dos insetos hospedeiros caracterizando-se como um determinante patogênico (Charnley *et al*, 1984; St. Leger *et al*, 1991).

St. Leger e colaboradores (1996a) analisaram algumas isoformas de quitinase em *M. anisopliae*, sendo que uma destas quitinases apresentou maior expressão e mais tardia em relação à secreção de proteases, além de possuir alta identidade com uma quitinase de 42 kDa de *Trichoderma harzianum*, um fungo também utilizado no controle de fungos patogênicos. O grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos Filamentosos, no Centro de Biotecnologia da Universidade do Rio Grando do Sul (UFRGS), vem estudando as possíveis funções das quitinases produzidas por *M. anisopliae*. O gene *chit1* foi o primeiro a ser isolado e caracteriza-se por ser uma endoquitinase (Baratto *et al.*, 2003), possuir 42 kDa (sendo que os 35 primeiros aminoácidos constituem a sequência de peptídeo-sinal), PI de 5,8 e apresentar uma fase aberta de leitura (*Open Reading Frame* – ORF) de 1.521 pb e três íntrons (Bogo *et al.*, 1998). Entretanto, segundo Screen e colaboradores (2001), a sua superexpressão em *M. anisopliae* foi capaz de aumentar os níveis de atividade quitinolítica extracelular, embora não tenha aumentado à virulência em larvas de *Manduca sexta*.

Baratto e colaboradores (2006) caracterizaram uma quitinase (*chi2*) de 42 kDa, PI 4,8 e uma ORF de 1.542 pb. A sua expressão é regulada por diferentes fontes de carbono, como quitina cristalina, e reprimida em meios contendo glicose. Uma terceira quitinase foi identificada em *M. anisopliae*, a CHIT30. Essa quitinase mostrou atividade *endo* e *exo*quitinasíca e de acordo com a fonte de carbono disponibilizada, possui expressão diferenciada, sendo mais expressa em meios contendo quitina cristalina, GlcNAc em baixas concentrações e cutícula do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e reprimida em meios contendo glicose (Da Silva *et al.*, 2005). Sttats *et al.* (2007), construíram mutantes de *M. anisopliae* com a deleção deste gene onde

observaram que não houve alteração morfológica, mas apresentaram diminuição da sua virulência.

Genes de quitinases de alguns patógenos de insetos foram utilizados para aumentar a patogenicidade dos baculovírus (Kramer & Muthukrishnan, 1997; Merzendorfer & Zimoch, 2003). A superexpressão de quitinases em insetos infectados com o AcMNPV recombinante contendo, tanto o gene da quitinase viral (*chiA*) quanto genes de quitinases do fungo *M. anisopliae*, poderia aumentar a sua virulência pela maior degradação da cutícula do inseto ou pela maior degradação da membrana peritrófica, permitindo a entrada de mais vírus no intestino de insetos susceptíveis.

Sendo assim, diante da superexpressão de quitinases em insetos infectados com o AcMNPV recombinante contendo o gene da quitinase viral (*chiA*), além de, quitinases do fungo *M. anisopliae*, pretendemos aumentar a virulência do AcMNPV e do AgMNPV.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Considerando que o fungo *M. anisopliae* é um potencial modelo de interação entre patógeno-hospedeiro, por atacar artrópodes diversos, e por secretar hidrolases, como as quitinases, que estão envolvidas nessa patogenia, acelerando o processo de morte de inseto hospedeiro, o presente trabalho propõe avaliar se a expressão das enzimas CHI1 e CHI2 do fungo durante a infecção de larvas de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* por vírus recombinantes derivados do AcMNPV e AgMNPV.

2.2 Objetivos Específicos

- ❖ Clonagem do gene *chi2* nos vetores pGemT-easy e vetor pFBI-AccI-PSX, necessários para a construção subsequente do baculovírus recombinante.
- ❖ Construção de AcMNPV e AgMNPV recombinantes contendo o gene *chi2*, do fungo *M. anisopliae*.
- ❖ Analisar e comparar os efeitos causados pelo vírus recombinantes, contendo o gene *chi1* ou *chi2* do fungo *M. anisopliae*, em larvas de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* com base na determinação de parâmetros de mortalidade (bioensaios), assim como, as atividades enzimáticas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens celulares e larvas de insetos

As linhagens celulares, derivadas de insetos, utilizadas neste trabalho foram: células de *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1-4) (Granados *et al.*, 1994) e células provenientes de *Anticarsia gemmatalis* (UFL-AG-286) (Sieburth e Maruniak, 1988). As células foram conservadas em meio TC-100 (GIBCO-BRL), suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas a 27°C. Larvas de *Spodoptera frugiperda* Smith, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae) foram gentilmente cedidas pela Dra. Maria Elita Batista de Castro (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEN).

3.1.1 Plasmídeos e vírus utilizados:

Todos os plasmídeos e vírus utilizados neste capítulo estão listados nas tabelas 8 e 9, assim como, suas principais características.

Tabela 8: Lista dos plasmídeos utilizados no Capítulo II.

Plasmídeos	Construção/Composição	Utilização
pUC18::chi2 (Boldo, 2009)	O plasmídeo contém o gene <i>chi2</i> do fungo <i>M.anisopliae</i>	Obter o fragmento correspondente ao gene <i>chi2</i> para construção subsequente
pGemT-easy (Promega)	Plasmídeo especializado em clonagem de fragmento de PCR. Ele possui sítio de transcrição T7 RNA polimerase; região de múltipla clonagem; sítio de iniciação de transcrição SP6 RNA polimerase; códon de iniciação do lacZ.	Construção do plasmídeo contendo o gene <i>chi2</i> do fungo <i>M.anisopliae</i>
pGem.chi2f	Oligonucleotídeos específicos para amplificar o gene <i>chi2</i> , utilizando o pUC18::chi2 como template, foram utilizados e em seguida clonados no plasmídeo comercial pGemTeasy.	Este plasmídeo foi utilizado para remover o gene de interesse <i>chi2</i> a fim de transferi-lo para um vetor

		subsequente pFastBac/AccI-PSX
pFastBac/AccI-PSX (Araújo, 2010)	O plasmídeo possui os promotores pSyn e pXIV que irão dirigir a expressão do gene <i>chi2</i> .	Foi utilizado na construção do plasmídeo contendo o gene <i>chi2</i> do fungo <i>M.anisopliae</i> .
pSX.chi2f	O plasmídeo pFastBac/AccI-PSX foi digerido com as enzimas de restrição <i>PstI</i> e <i>EcoRI</i> para clonar o gene <i>chi2</i> e assim obter um plasmídeo contendo os promotores pSyn e pXIV dirigindo a expressão do gene <i>chi2</i> .	Construir o vírus AcMNPV recombinante contendo o gene <i>chi2</i> do fungo <i>M.anisopliae</i>
pBacChi2	O plasmídeo é resultado da transposição do gene de interesse <i>chi2</i> no genoma do baculovírus AcMNPV na forma de um grande plasmídeo.	O DNA foi extraído e purificado para transfectar células de inseto Tn5B com o auxílio de um lipossomo
P2100 (Hallwass, 2005)	O plasmídeo possui o promotor e gene da poliedrina do AgMNPV, além do sítio de restrição <i>EcoRV</i> , local onde foi introduzido os genes <i>chi2</i> e <i>chi1</i> do fungo <i>M. anisopliae</i> .	Foi utilizado na construção dos plasmídeos que darão origem aos baculovírus AgMNPV recombinante
P2100.chi2f	O plasmídeo p2100 foi digerido com a enzima de restrição <i>EcoRV</i> para linearizar e tratado para ser desfosforilado. O gene <i>chi2</i> foi amplificado por PCR, tratado com a enzima Klenow e clonado no plasmídeo p2100 precisamente digerido.	Utilizado para construção de baculovírus AgMNPV recombinante
P2100.chi1f	O plasmídeo p2100 foi digerido com a enzima de restrição <i>EcoRV</i> para linearizar e tratado para ser desfosforilado. O gene <i>chi1</i> foi amplificado por PCR, tratado com a enzima Klenow e clonado no plasmídeo p2100 precisamente digerido.	Utilizado para construção de baculovírus AgMNPV recombinante
pSynQUIT (Welzel, 2006)	O plasmídeo contém o gene <i>chi1</i> do fungo <i>M.anisopliae</i> sob o comando dos promotores pSyn e pXIV	Foi utilizado para construir o vírus AcMNPV recombinante vSynQUIT (Welzel, 2006)

Tabela 9: Lista dos vírus utilizados no Capítulo II.

Vírus	Utilização
AcMNPV L-1 (Lee e Miller, 1978)	Baculovírus selvagem utilizado como controle nos ensaios enzimáticos e bioensaios
vSynQUIT (Welzel, 2006)	Vírus AcMNPV recombinante contendo o gene <i>chi1</i> do fungo <i>M. anisopliae</i>
vAc. <i>chi2f</i>	Vírus AcMNPV recombinante contendo o gene <i>chi2</i> do fungo <i>M. anisopliae</i>

3.2 Construção de plasmídeos recombinantes contendo os genes *chi1* e *chi2* de *Metarhizium anisopliae*

3.2.1 Construção do plasmídeo pGem.*chi2f*

O plasmídeo pUC18::*chi2* (Figura 39), gentilmente cedido pelo Dr Juliano Tomazzoni Boldo da Universidade Federal de Rio Grande do Sul (UFRGS), após digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI* (Fermentas), liberou um fragmento correspondente ao gene quitinase (*chi2*) do fungo *M. anisopliae*. A reação de digestão foi feita primeiramente com a enzima de restrição *PstI*, contendo 5 µL do DNA plasmidial (10 ng/µL), 5 µL do Tampão Tango™ 10X (Fermentas), 1 U/µL da enzima *PstI* (Fermentas) e 38 µL de água milli-Q. Em seguida, a reação de digestão foi incubada a 37°C durante 3 h. Após esse período, a digestão foi precipitada com isopropanol (1:1), para remover o tampão e a enzima utilizada anteriormente, e assim, foi feita a segunda reação com a enzima *EcoRI*, onde utilizou-se cerca de 3 µL do DNA plasmidial (10 ng/µL) previamente digerido com a enzima de restrição *PstI*, 3 µL de Tampão Tango™ 10X (Fermentas), 1 µL da enzima *EcoRI* 1 U/µL (Fermentas) e 38 µL

de água milli-Q. Incubou-se por mais 3 h a 37°C. O perfil de restrição foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0.8% (Sambrook *et al.*, 1989) e o gel corado com brometo de etídio (0,1 µg/mL). O fragmento de 1.309 pb, visualizado no gel de agarose, foi extraído do gel de agarose, eluído e purificado de acordo com o protocolo do PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen).

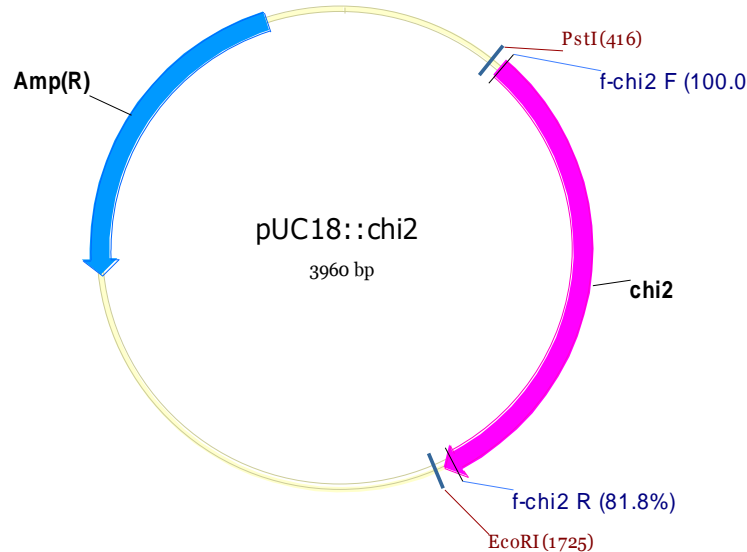


Figura 39: Mapa do plasmídeo PUC::*chi2*. A figura mostra o gene *chi2* do fungo *M. anisopliae*, assim como, a localização dos sítios de restrição *PstI* e *EcoRI*, a região de anelamento dos oligonucleotídeos (Chi2fF e Chi2fR) e o gene de resistência a ampicilina -Amp (R).

Em seguida, oligonucleotídeos foram desenhados para amplificar a sequência do gene *chi2* (Chi2fF e Chi2fR) (Tabela 10) a partir deste fragmento purificado. As condições para amplificação foram 30 ciclos com desnaturação inicial a 95°C por 5 min; ciclo de amplificação: desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 55°C por 1 min e 30 s, extensão a 72°C por 1 min e 30 s e extensão final a 72°C por 7 min. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose como descrito acima. Após amplificação do gene *chi2*, uma reação de ligação foi preparada utilizando 5 µL do fragmento gênico purificado (cerca de 200 ng/µL), 1 µL do tampão de ligação 10X, 3 µL (200 ng) do vetor pGemT-easy (Promega) e 1 µL da enzima de ligação T4 DNA

Ligase 1U/ μ L (Promega). A ligação foi transformada em células competentes da cepa *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen), utilizando o método de choque-térmico (Sambrook *et al.*, 1989). O clone selecionado foi denominado pGem.*chi2f*.

Para confirmar o clone pGem.*chi2f*, uma PCR foi preparada utilizando oligonucleotídeos específicos (Chi2fF e Chi2fR) para o gene *chi2* (Tabela 10).

Tabela 10: Oligonucleotídeos utilizados nas ampliações dos genes *chi2* do fungo *Metarhizium anisopliae*

Gene/ <i>M. anisopliae</i>	Oligonucleotídeos	Sequência de nucleotídeos (5'→3')	Utilização
Quitinase 2 (<i>chi2</i>)	Chi2f F	ATGCATCATCTACGCGCTC TCGTCGGCG	Amplificação da região codante do gene <i>chi2</i>
	Chi2f R	CTGCAGTCACCGGCATGAC GACCACCAATCGCC	

3.1.2 Construção dos plasmídeos pPSX.*chi2f* e pSynQUIT

A partir do plasmídeo pGem.*chi2f*, foi construído o plasmídeo pPSX.*chi2f*, de maneira que o gene *chi2* foi retirado por digestão com as enzimas de restrição *Pst*I e *Eco*R I e clonado no vetor pFBI-AccI-PSX, o qual possui os promotores pSyn e pXIV, que irão dirigir a expressão do gene *chi2* (Figura 40).

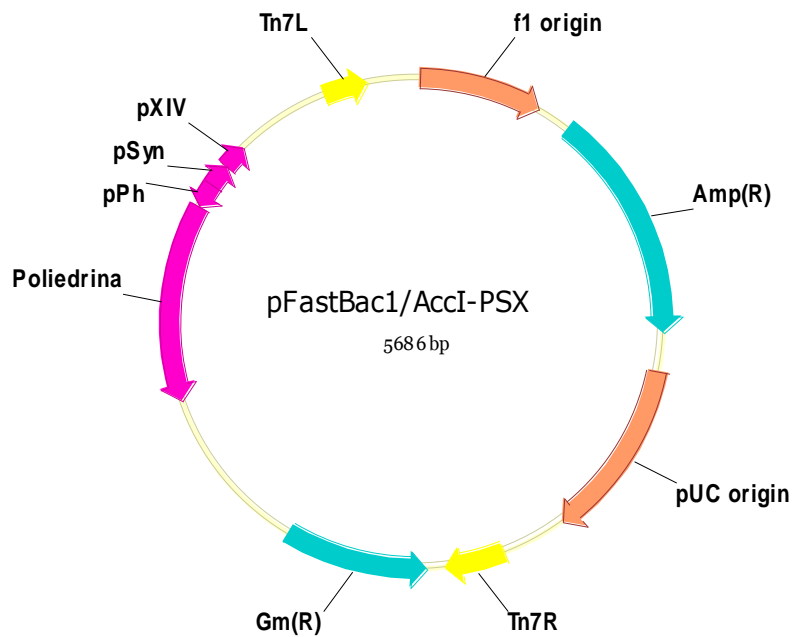


Figura 40: Mapa do plasmídeo pFB1/Acc1-PSX. A figura mostra a localização dos promotores pSyn e pXIV, os sítios de restrição *Pst*I e *Eco*RI, o promotor e o gene da poliedrina do AcMNPV, as regiões homólogas Tn7L e R responsáveis pela transposição, os genes ampicilina Amp(R) e gentamicina Gm(R) que conferem resistência, duas origens de replicação para cópias múltiplas (f1 e pUC).

As digestões foram preparadas de acordo com o procedimento descrito acima. Após digestão e visualização do fragmento liberado (1.259 pb) após a eletroforese em gel de agarose 0,8%, fez-se a purificação do gene *chi2* seguido de uma reação de ligação no vetor pFBI-AccI-PSX, previamente digerido com as mesmas enzimas. A ligação foi transformada em células competentes da cepa *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen), utilizando o método de choque-térmico (Sambrook *et al.*, 1989).

Para confirmar a inserção do gene *chi2* no vetor pFBI-AccI-PSX, uma reação de digestão com a enzima de restrição *Eco*RV foi preparada seguindo instruções do fabricante (Promega), assim como uma reação de amplificação utilizando os oligonucleotídeos Chi2f F/ Chi2f R, específico para o gene *chi2* como descrito acima. O plasmídeo pPSX.*chi2f* selecionado foi utilizado para construir o vírus AcMNPV recombinante contendo o gene *chi2* do fungo *M. anisopliae*. O plasmídeo pSynQUIT (Welzel, 2006), contém o gene quitinase 1 (*chi1*) do fungo *M. anisopliae* sob o

comando dos promotores pSyn e PXIV.

3.1.3 Construção dos plasmídeos p2100.*chi2f* e p2100.*chi1f*

A construção do plasmídeo p2100.*chi2f* iniciou-se a partir da amplificação por PCR do gene *chi2*, utilizando oligonucleotídeos Sx-*Bgl*III F e Sx-*Bgl*III R (Tabela 11). As condições para amplificação foram: para volume final de 25 µl, contendo 16,2 µl de água milli-Q, 2,5 µl de tampão de reação 10X (Invitrogen), 1,5 µl de dNTP 10 mM (Invitrogen), 1,0 µl de cada oligonucleotídeo (10 mM) da Integrated DNA Technologies (IDT), 0,3 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 1 µl do DNA (20 ng/µl). Os ciclos foram: 30 ciclos com desnaturação inicial a 94°C por 7 min; ciclo de amplificação: desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 56°C por 1 min e 30 s, extensão a 72°C por 1 min e 30 s e extensão final a 72°C por 10 min. Os oligonucleotídeos foram anelados no plasmídeo pPSX.*chi2f*, nas regiões a montante aos promotores pSyn e pXIV e a jusante ao *chi2*. Sendo assim, o fragmento amplificado apresentou os mesmos promotores do plasmídeo pPSX.*chi2f* mais o gene *chi2* e nas extremidades, a adição do sítio de restrição *Bgl*III. Esse fragmento foi analisado por eletroforese em gel da agarose e purificado de acordo com o protocolo do PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen).

O vetor utilizado para ligar o fragmento, correspondente ao gene *chi2* com os promotores pSyn e pXIV, foi o p2100 (Hallwass, 2005). O vetor p2100 foi digerido com a enzima de restrição *Eco*RV e em seguida defosforilado com a enzima Shrimp Alkaline Phosphatase de acordo instruções do fabricante (Promega). O inserto foi então, tratado com a enzima DNA polimerase (*Klenow fragment*), de acordo com especificações do fabricante (Fermentas) e ligado no vetor de transferência p2100. Em seguida, transformado em células competentes da cepa *Escherichia coli* DH5a

(Invitrogen), utilizando o método de choque-térmico de acordo com o protocolo de transformação bacteriana, descrito por Sambrook *et al.* (1989).

A partir do plasmídeo pSynQUIT (Welzel, 2006), um fragmento foi amplificado por PCR em condições para amplificação de 30 ciclos com desnaturação inicial a 94°C por 7 min; ciclo de amplificação: desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 57°C por 1 min e 30 s, extensão a 72°C por 1 min e 30 s e extensão final a 72°C por 10 min. Foram utilizados os oligonucleotídeos Sx-BglIII F e ORF603BamHI R (Tabela 11), os quais se anelam a montante aos promotores pSyn e pXIV e a jusante ao gene *chi1*. A purificação, preparação do vetor de transferência p2100, reação de ligação e transformação, foi preparada, da mesma maneira como descrito anteriormente para o plasmídeo p2100.*chi2f*.

Tabela 11: Oligonucleotídeos utilizados nas amplificações dos genes *chi1* e *chi2* do fungo *Metarhizium anisopliae*

Gene	Oligonucleotídeos	Sequência de nucleotídeos (5'→3')	Utilização
<i>chi1</i> e <i>chi2</i> <i>M.anisopliae</i>	Sx-BglIII F	GTGAACAGATCTCCATGATG GGCCAAGCTTGGCG	Amplificação da região codante dos genes <i>chi1</i> e <i>chi2</i> junto com os promotores pSyn e pXIV
	Sx-BglIII R	CACTTGAGATCTCGGATCTC CTAGGCTCAAGCAGTG	Amplificação da região codante do gene <i>chi2</i>
	ORF603BamHI R	CCCGGATCCAGCCATTGTAA TGAGACGACGCACAACT	Amplificação da região codante do gene <i>chi1</i>

Para confirmar a introdução dos genes *chi1* e *chi2* no vetor de transferência p2100, PCR foi realizada, utilizando oligonucleotídeos específicos para cada gene. A reação de amplificação foi feita para o gene *chi1* onde utilizamos os oligonucleotídeos Sx-BglIII F e ORF603BamHI R (Tabela 11) e para o gene *chi2* utilizou-se os oligonucleotídeos Chi2f F e Chi2f R (Tabela 10). As condições para as duas

amplificações foram de 30 ciclos com desnaturação inicial a 95°C por 5 min; ciclo de amplificação: desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 54°C por 1 min e 30 s, extensão a 72°C por 1 min e 30 s e extensão final a 72°C por 7 min.

3.2 Construção de vírus recombinante

3.2.1 vAc.*chi2f* e vSynQUIT

A linhagem de bactéria *E.coli* denominada DH10Bac, que possui dentre as suas características especiais o genoma completo do baculovírus AcMNPV na forma de um grande plasmídeo (bacmídeo), foi utilizada para construir o bacmídeo recombinante pBacChi2. Esse sistema é fundamentado na transposição entre o plasmídeo doador (pPSX.*chi2f*) e o genoma do baculovírus, presente na forma de um bacmídeo, pela ação de transposases codificadas pelo plasmídeo *helper*, além disso, o bacmídeo possui um sítio de inserção de um transposon bacteriano Tn7 no locus da poliedrina (Figura 41).

Sendo assim, o plasmídeo pPSX.*chi2f* foi transformado na cepa DH10Bac e as colônias nas quais ocorreu a transposição foram selecionadas pela presença dos antibióticos que conferiram resistência à tetraciclina, kanamicina (presente nas bactérias DH10Bac) e gentamicina (presente apenas nas bactérias onde ocorreu o evento de transposição), além da presença do substrato X-gal e do indutor IPTG, responsáveis pela coloração das colônias de bactérias. Colônias brancas indicaram que o gene da β -galactosidase, presente no bacmídeo, foi interrompido pelo evento de transposição. Enquanto colônias azuis indicam que o gene está intacto permitindo, assim, que a enzima seja produzida agindo sobre o substrato (X-gal).

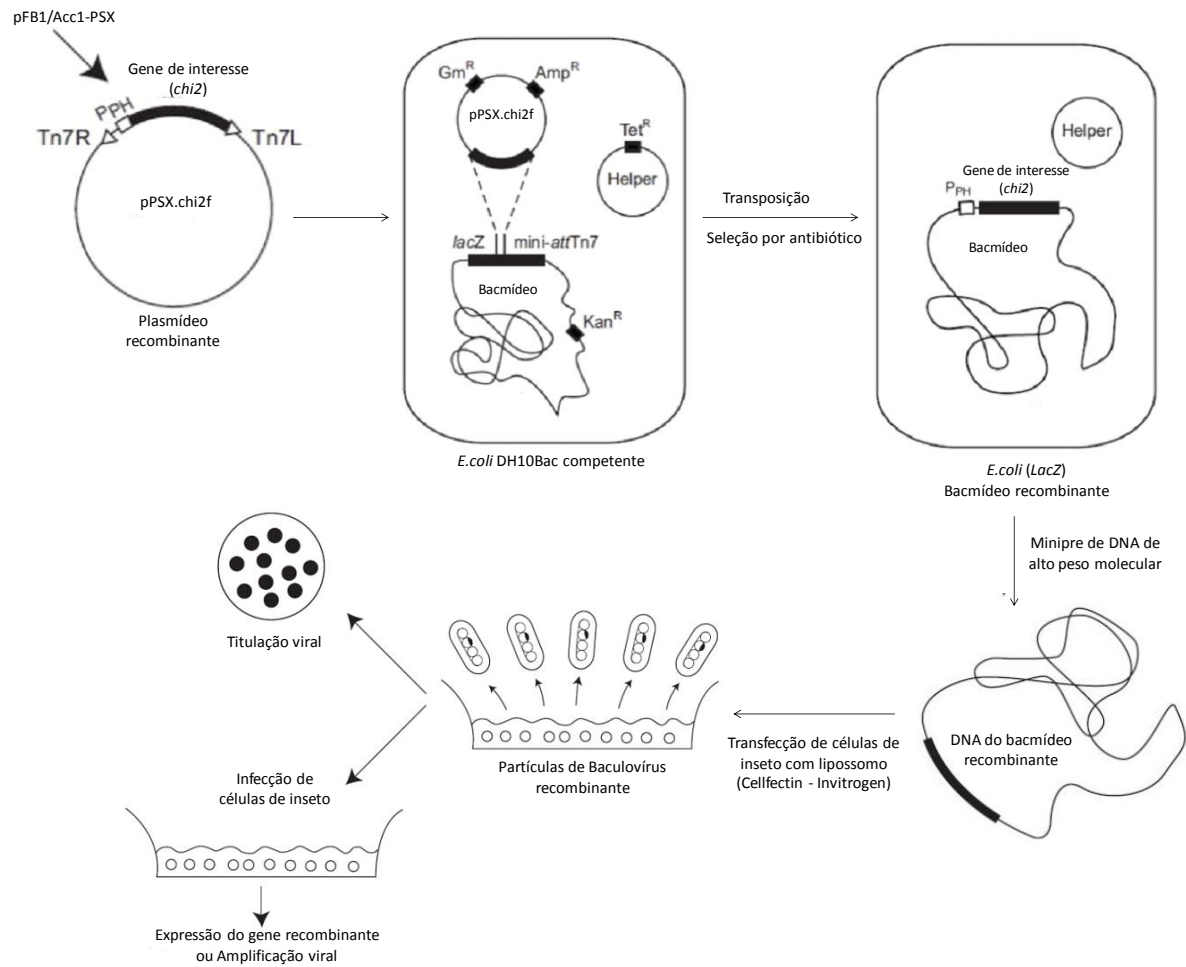


Figura 41: Esquema mostrando os diferentes passos para construção de baculovírus recombinantes usando o sistema Bac-to-Bac de expressão da empresa Invitrogen. A figura mostra a transformação de bactérias DH10Bac, que contém o genoma do baculovírus AcMNPV na forma de um bacmídeo, com o plasmídeo de transferência pFastBac com o inserto de interesse. Logo a seguir, mostrado o evento de transposição, que permite a inserção do gene de interesse no bacmídeo e utilização deste na transfecção de células de inseto. Os vírus recombinantes obtidos podem ser avaliados quanto ao seu título viral ou ainda utilizados para infectar novas células e prover a produção da proteína recombinante. Adaptado de Bac-to-Bac Baculovirus Expression System manual (Invitrogen).

Sendo assim, as colônias selecionadas foram cultivadas e seu material genético foi extraído, para então, confirmar a transposição por PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para verificar a presença e a orientação do gene de interesse. Para a confirmação do pBacChi2 utilizou-se a combinação entre alguns oligonucleotídeos: M13 F e *Chi2f* R, M13 R e *Chi2f* F, assim como *Chi2f* F e *Chi2f* R. Na reação de PCR utilizou-se 14,5 µL de água milli-Q, 2,5 µL de tampão 10X, 2,5 µL de MgCl₂, 1,5 µL

dNTPs 10 mM, 1,0 µL de cada oligonucleotídeo 10 µM, 100 ng/µL do DNA do bacmídeo recombinante, 1 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen), para um volume final de 25,0 µL. O programa de amplificação da PCR foi: 95°C por 5 min, 35 ciclos de 95°C por 1 min e 30 s, 58°C por 1 min e 30 s, 72°C por 5 min, seguido de uma extensão final de 72°C por 7 min. Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose 0,8%.

Após confirmação do bacmídeo pBacChi2, cerca de $0,5 \times 10^6$ células de *Trichoplusia ni* (BTI-TN5B1-4), em cultura foram transferidas para uma placa de poliestireno de 35 mm de diâmetro (TPP) por pelo menos 1 h, para formação de monocamada de células, e assim, deu início a construção do vírus recombinante AcMNPV, pelo evento da transfecção.

Um micrograma de DNA do bacmídeo pBacChi2 foi diluído em 0,5 mL de meio TC-100 sem soro e incubado juntamente com 10 µL de Cellfectin® Reagent (Invitrogen). A mistura do DNA com o lipossomo foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, o meio de cultura das células foi substituído pela mistura de DNA/lipossomo sem que a monocamada de células previamente formada fosse desfeita e a placa foi incubada à temperatura ambiente por 3 h. Em seguida, a mistura foi substituída por meio TC-100 novo, contendo 10% de soro fetal bovino e a partir daí as células foram incubadas a 27°C, por sete dias. O vírus recombinante vSynQUIT, foi construído utilizando a estratégia de recombinação homóloga, como descrito por Welzel (2006).

3.3 Bioensaios:

Trinta larvas neonatas de *S. frugiperda* foram inoculadas oralmente com os diferentes concentrações (10^2 , 10^1 , 1.0, 0.1, 0.01 OB/nL) de corpos de oclusão dos vírus AcMNPV e recombinante vAc.chi2f, segundo a metodologia do *droplet feeding* descrita por Hughes & Wood (1981). Como controle negativo, as larvas foram incubadas com phenol red 2%. Os tratamentos foram colocados em estufas incubadoras B.O.D., a 26°C e fotoperíodo de 14 horas, sendo a mortalidade registrada diariamente. Os dados foram analisados pelo programa Polo Plus (LeOra Software) para doses utilizadas versus probabilidade de mortalidade, que permite determinar a concentração letal média do vírus (CL_{50}). Bioensaios utilizando larvas de *S. frugiperda* no 3º ínstar não apresentou efeito de mortalidade, uma vez que estas larvas são pouco suscetíveis a infecção pelo baculovírus AcMNPV, assim como os recombinantes AcMNPV.

3.4 Análise da atividade quitinolítica:

Testou-se a atividade da quitinase presente no extrato de células BTI-Tn5B1-4 (1×10^7) infectadas com os vírus AcMNPV e vAc.chi2f (10 pfu/célula) a 72 h p.i., utilizando o substrato 4-methylumbelliferyl- β -D-N,N'-diacetylchitobioside [4MU-(GlcNAc)₂] (Sigma). Antes de iniciar o ensaio quitinolítico, fez-se a dosagem de proteínas presentes no estoque de poliedros e no extrato de células BTI-Tn5B1-4, onde as concentrações de proteínas nas amostras enzimáticas foram determinadas pelo método colorimétrico descrito por Bradford (1976). Os ensaios enzimáticos foram conduzidos em triplicatas utilizando 100 μ g de proteínas.

A análise da atividade quitinolítica foi mensurada utilizando uma versão modificada do método de Trudel and Asselin (1989). As células infectadas com os vírus

AcMNPV e ν Ac.chi2f foram coletadas a 72 h p.i. e o extrato total de células foi coletado e centrifugado a 3000 x g por 10 min. O sobrenadante foi removido e o sedimento celular foi lavado duas vezes com tampão PBS 1x (NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KCl 2.7 mM, pH 7.4), em seguida, ressuspensionado em 500 μ L de tampão PBS 1x e armazenado a -80°C. Sendo assim, a partir da dosagem estabelecida de proteínas totais, 100 μ g das proteínas presentes no extrato de células BTI-Tn5B1-4 infectadas com os vírus selvagem e recombinante, e de células não infectadas (mock) foram analisados. Cada amostra foi misturada em 350 μ L de tampão fosfato de sódio 10 mM pH 6,0 e 100 μ L de substrato [5 mM 4MU-(GlcNAc)₂ em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 5,0]. Após o período de incubação por 1 h a 37°C, a reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de Na₂CO₃ 0,25 M seguindo-se de leitura em um espectrofotômetro a 550 nm (SpectraMax, Molecular Devices Corporation, USA). Substrato em água (sem enzima) foi utilizado como controle. Os valores obtidos nos ensaios enzimáticos foram comparados pelo teste de Student's, utilizando o Programa R i386 2.25.2 (Team, 2012), valores de p<0,05 foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Confirmação da construção do plasmídeo pGem.chi2f

A partir do plasmídeo pUC18::*chi2*, o gene *chi2* derivado do fungo *M. anisopliae* foi removido pela digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI*, apresentando um fragmentos de 2.651 pb, correspondente ao plasmídeo pUC18 e outro de 1.309 pb, referente ao gene *chi2* como mostra o perfil de restrição na figura 42.

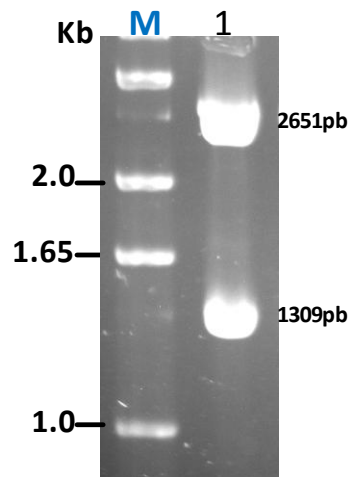


Figura 42: Perfil de restrição do plasmídeo pUC::*chi2*. Gel de agarose 0,8% mostrado os fragmentos gerados após digestão do plasmídeo pUC::*chi2* com as enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI* (poço 1), liberando fragmentos de 2.651 pb e 1.309 pb, sendo que o fragmento de 1.309 pb corresponde ao gene *chi2*. M - Marcador DNA ladder 1 Kb Plus (Invitrogen).

O fragmento de 1.309 pb purificado do gel de agarose foi utilizado como “template” na amplificação do fragmento de interesse por PCR, contendo o gene *chi2*, para construir o plasmídeo pGem.*chi2f* (Figura 43) pela ligação do fragmento ao vetor pGem-T easy (Promega).

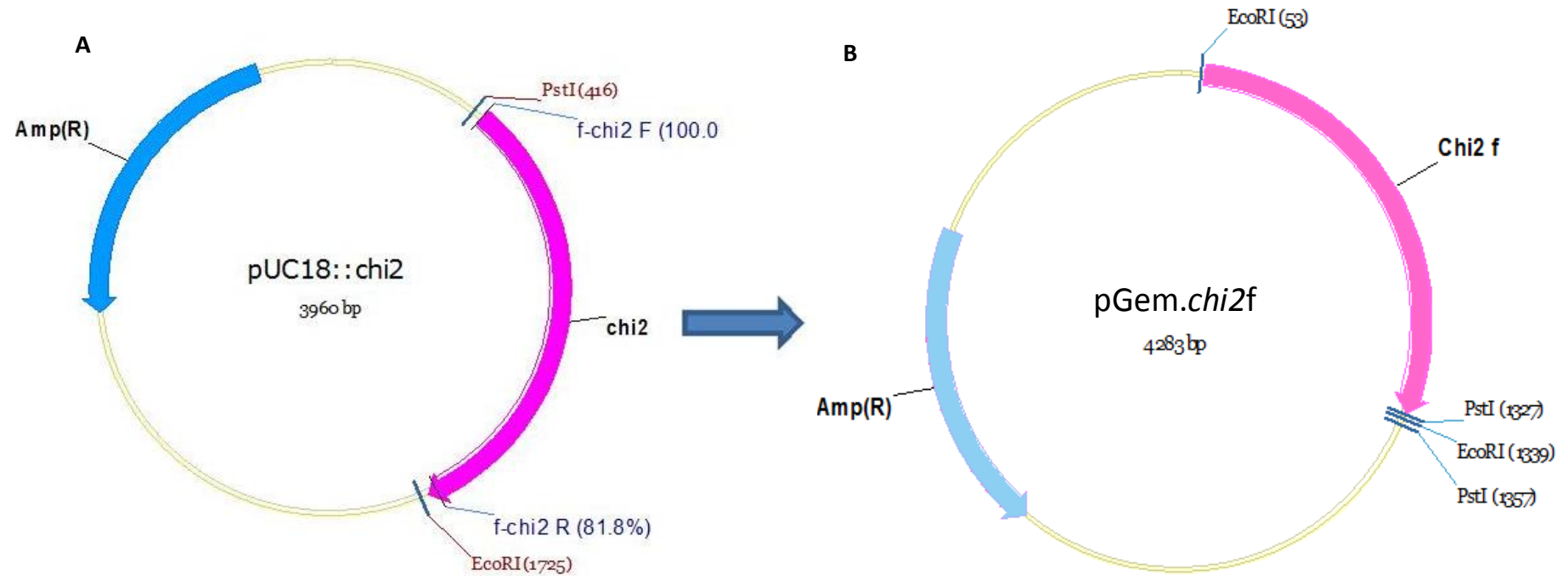


Figura 43: Mapa da construção do plasmídeo pGem.chi2f. (A) A figura apresenta o mapa do plasmídeo pUC18::chi2 contendo a região de anelamento dos oligonucleotídeos (Chi2fF e Chi2fR) utilizados para amplificação do gene *chi2* e posteriormente introduzido no vetor pGem-T easy (Promega). (B) A figura mostra o local onde foi introduzido o gene *chi2* no vetor pGem-T easy (Promega), entre os sítios de restrição *PstI* e *EcoRI* e o gene que confere resistência a ampicilina (*Amp^R*).

A confirmação dessa construção ocorreu pela amplificação por PCR do gene *chi2* utilizando oligonucleotídeos específicos (Chi2fF e Chi2fR) para o gene. O fragmento amplificado apresentou tamanho de 1.233 pb (Figura 44).

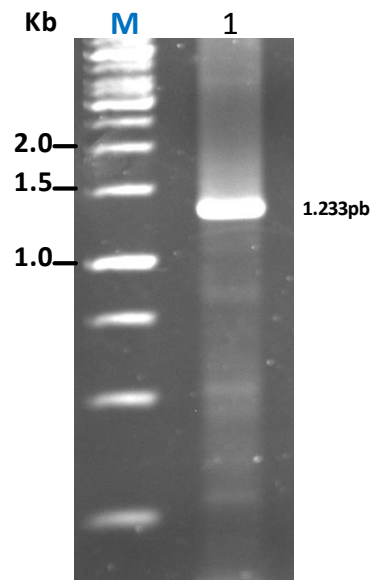


Figura 44: Confirmação da construção do plasmídeo pGem.*chi2f*. Gel da agarose 0,8% mostrado o fragmento de 1.233 pb correspondente ao gene *chi2* amplificado por PCR com os oligonucleotídeos (Chi2fF e Chi2fR). M - Marcador DNA ladder 1 Kb (Fermentas).

4.1.2 Confirmação da construção dos plasmídeos pPSX.*chi2f*

Para construir o plasmídeo pPSX.*chi2f*, o plasmídeo pGem.*chi2f* previamente construído foi digerido com as enzimas de restrição *Pst*I e *Eco*RI para liberar o fragmento correspondente ao gene *chi2*, e assim, introduzi-lo no vetor pFBI-AccI-PSX (Figura 45).

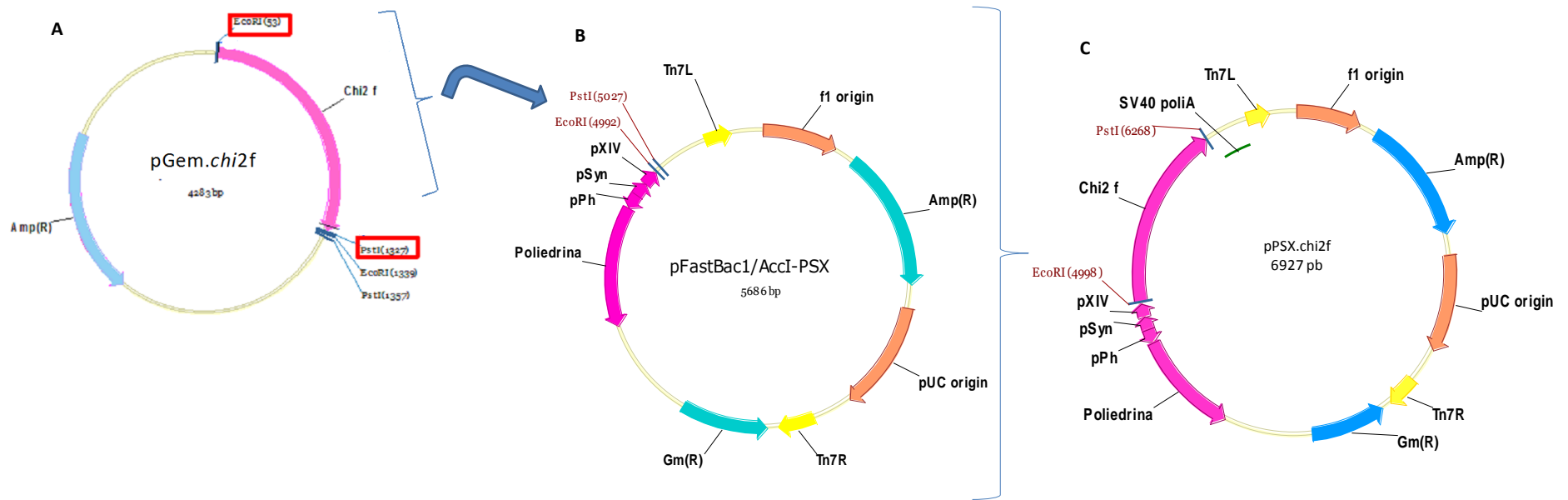


Figura 45: Esquema ilustrando a construção do plasmídeo pPSX.chi2f. (A) A figura mostra o mapa do plasmídeo pGem.chi2f indicando os sítios de restrição das enzimas *EcoRI* e *PstI* digeridas para liberar o fragmento correspondente ao gene *chi2* e o gene de resistência a ampicilina (AmpR). (B) A figura representa o plasmídeos pFastBac1/AccI-PSX, indicando a região aonde foi introduzido o gene *chi2*, entre os sítios de restrição *EcoRI* e *PstI*. (C) Mapa do plasmídeo pPSX.chi2f construído pela ligação do gene *chi2*, retirado do plasmídeo pGem.chi2f e ligado no plasmídeo pFastBac1/AccI-PSX.

A confirmação dessa inserção gênica foi feita pela digestão com a enzima *EcoRV*, apresentando um perfil de 4.676 pb, 2.071 pb e 180 pb (este último não foi possível visualizar no gel de agarose 0,7 % por ser um fragmento pequeno para a concentração utilizada). Além da confirmação pela amplificação do gene *chi2* por PCR (oligonucleotídeos Chi2f F/Chi2f R), apresentando um fragmento de 1.233 pb (Figura 46).

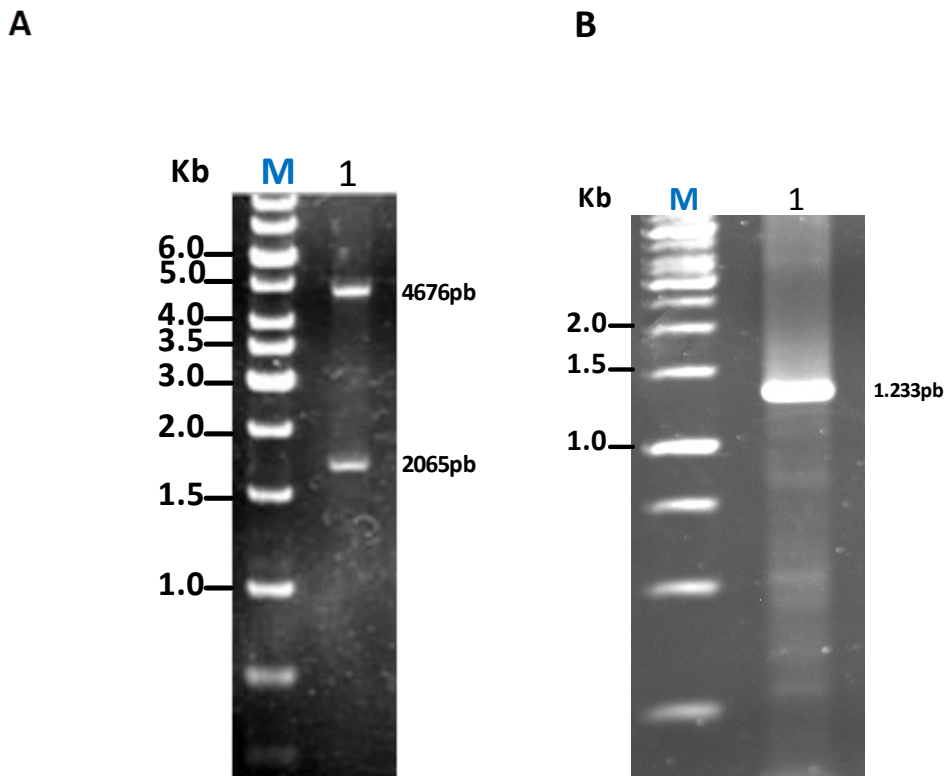


Figura 46: Confirmação da construção do plasmídeo pPSX.*chi2f*. (A) Gel de agarose 0,8% mostrando o perfil de restrição do plasmídeo pPSX.*chi2f* com a enzima *EcoRV* (poço 1). (B) Gel de agarose 0,8% mostrando o produto da amplificação por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos (Chi2f F/Chi2f R) para o gene *chi2* e o DNA do plasmídeo pPSX.*chi2f* com molde (poço 1). M - Marcador DNA ladder 1 Kb (Fermentas).

4.1.3 Confirmação da construção dos plasmídeos p2100.*chi2f* e p2100.*chi1f*

O vetor p2100 foi digerido com a enzima de restrição *EcoRV*, linearizado e defosforilado (Figura 47A). Os insertos referentes aos genes, *chi1* e *chi2*, foram

amplificados por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos, *Sx-Bgl*III F e ORF603*Bam*HI R para o gene *chi1* e *Sx-Bgl*III F e *Sx-Bgl*III R para o gene *chi2*, utilizando o DNA dos plasmídeos pSynQUIT e pPSX.*chi2f*, respectivamente, que contém os promotores pSyn e pXIV e tratados com a enzima klenown para então ser ligado no vetor p2100 (Figura 48 e 49). Os fragmentos amplificados apresentaram tamanho esperado de 1.890 pb, correspondente ao gene *chi1*, e 1.768 pb referente ao gene *chi2* (Figura 47).

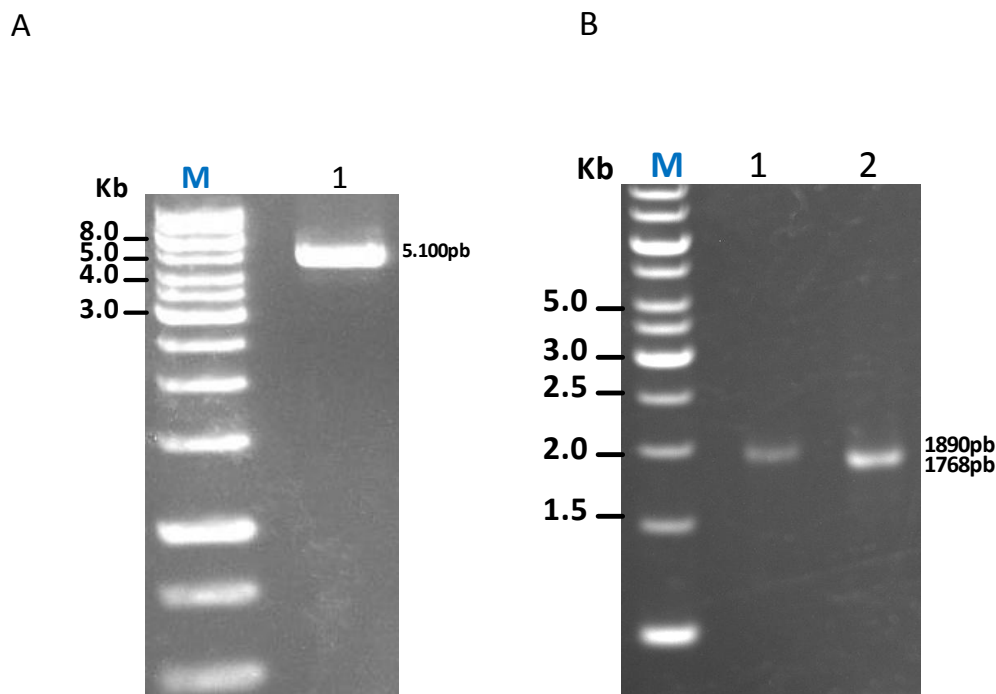


Figura 47: Amplificação e clonagem dos genes *chi1* e *chi2* de *M. anisopliae* no vetor p2100. (A) Gel de Agarose 0.8% mostrando no poço 1, o vetor p2100 com tamanho de 5.100 pb, digerido com a enzima de restrição *EcoRV* e defosforilado. M - Marcador DNA ladder 1 Kb (Fermentas). (B) Gel de Agarose 0.8% mostrando a amplificação dos insertos *chi1* (*Sx-Bgl*III F e ORF603*Bam*HI R) e *chi2* (*Sx-Bgl*III F e *Sx-Bgl*III R) por PCR apresentando tamanhos de 1.890 pb (poço 1) e 1.768 pb (poço 2), respectivamente. M - Marcador DNA ladder 1 Kb (Fermentas).

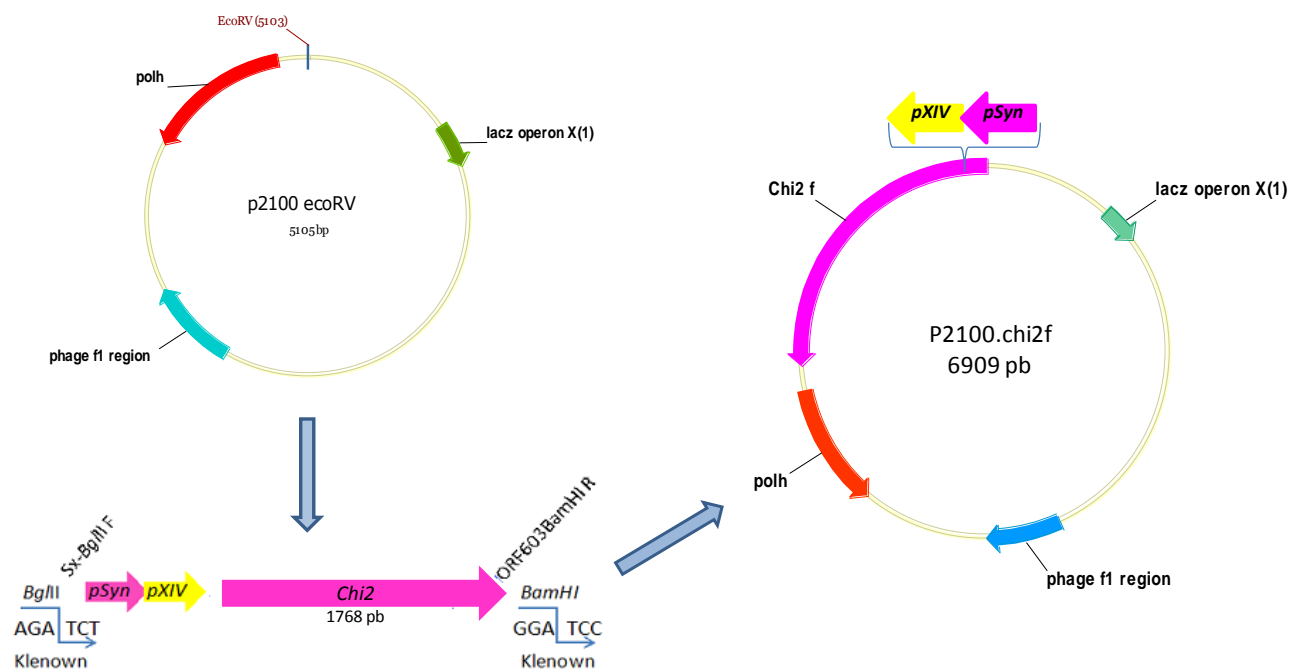


Figura 48: Esquema da construção do plasmídeo p2100.chi2f. O esquema mostra o plasmídeos p2100, que contém o promotor e gene da poliedrina do baculovírus AgMNPV, a região de origem f1 e o sítio de restrição *EcoRV*. Abaixo o esquema representa o fragmento amplificado por PCR (oligonucleotídeo Sx-*Bgl*II F e Sx-*Bgl*II R) do gene *chi2* juntamente com os promotores pSyn e pXIV, indicando a região tratada com a enzima klenown para tornar o fragmento com as extremidades abrupta. Por fim, o mapa do plasmídeo construído após a ligação do fragmento *chi2* amplificado por PCR no vetor p2100, dentro do sítio de restrição *EcoRV*.

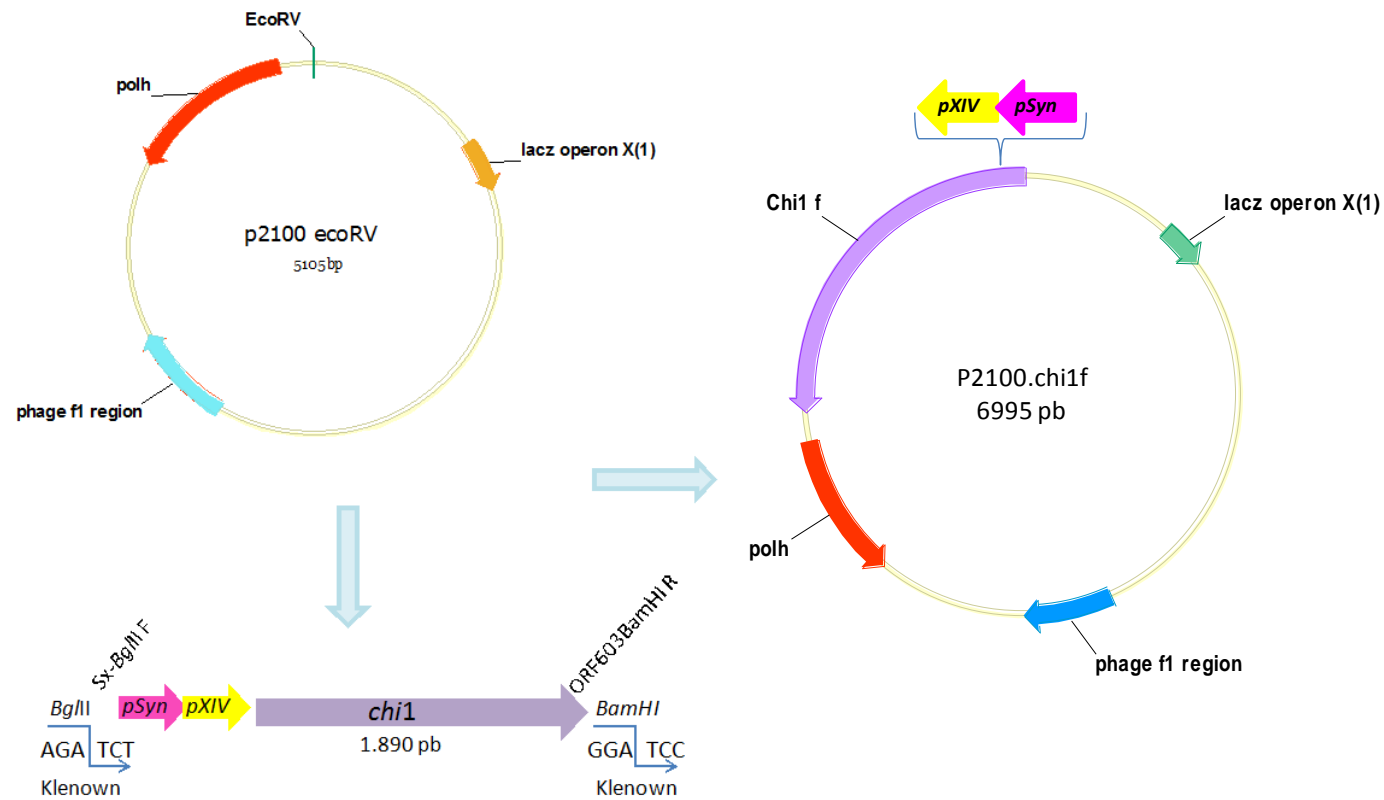


Figura 49: Esquema da construção do plasmídeo p2100.chi1f. O esquema mostra o plasmídeo p2100, que contém o promotor e gene da poliedrina do baculovírus AgMNPV, a região de origem *f1* e o sítio de restrição *EcoRV*. Abaixo o esquema representa o fragmento amplificado por PCR (oligonucleotídeo *Sx-Bgl*II F e *Sx-Bgl*II R) do gene *chi1* juntamente com os promotores *pSyn* e *pXIV*, indicando a região tratada com a enzima klenown para tornar o fragmento com as extremidades abruptas. Por fim, o mapa do plasmídeo construído após a ligação do fragmento amplificado *chi1* por PCR no vetor p2100, dentro do sítio de restrição *EcoRV*.

Foram feitas reações de ligação entre o vetor p2100 e o gene *chi1*, assim como, entre o vetor p2100 e o gene *chi2*. Sendo assim, para confirmar a introdução das quitinases no vetor p2100, reações de PCR foram preparadas utilizando oligonucleotídeos específicos, Sx-*Bgl*III F e ORF603*Bam*HI R para o gene *chi1* e Sx-*Bgl*III F e Sx-*Bgl*III R para o gene *chi2*, onde foi possível observar a amplificação do fragmento de 1.890 pb correspondente ao gene *chi1* (Figura 50A) e 1.233pb correspondente ao gene *chi2* (Figura 50B).

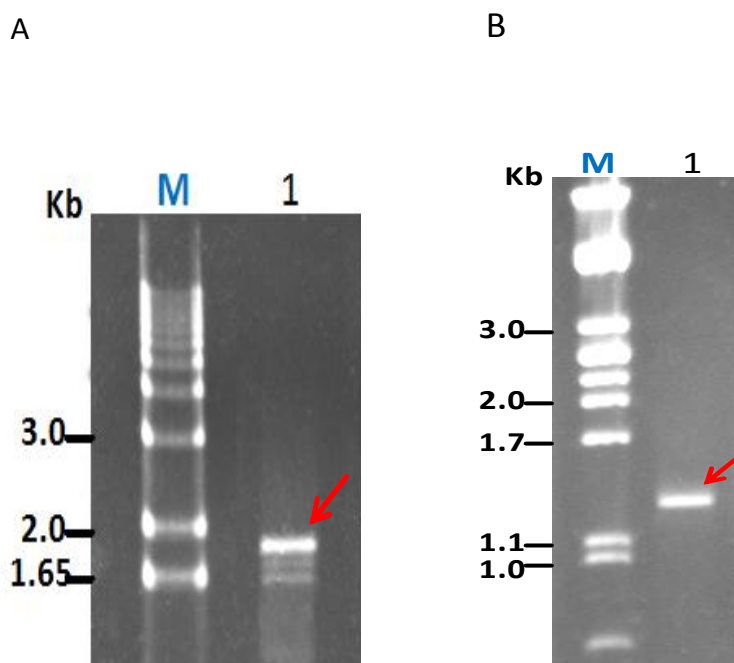


Figura 50: Confirmação da construção dos plasmídeos p2100.*chi2*f e p2100.*chi1*f. (A) Gel de Agarose 0.8 % mostrando o fragmento amplificado por PCR (oligonucleotídeos Sx-*Bgl*III F e ORF603*Bam*HI R) de 1.890 pb correspondente ao gene *chi1* (seta no poço 1). M - Marcador DNA ladder 1 Kb Plus (Invitrogen). (B) Gel de Agarose 0.8 % mostrando o fragmento amplificado por PCR (oligonucleotídeos Sx-*Bgl*III F e Sx-*Bgl*III R) de 1.233 pb correspondente ao gene *chi2* (seta no poço 1). M - Marcador DNA Lambda PstI (Promega).

4.2 Construção de vírus recombinantes

O plasmídeo pPSX.*chi2f* foi utilizado na transformação de bactérias *E.coli* (DH10-Bac, Invitrogen) competentes e, através do evento de transposição foi possível transferir o gene *chi2* do plasmídeo de transferência para o genoma do baculovírus presente na forma plasmidial (bacmídeo) que está dentro dessa linhagem de bactéria (Figura 52). Sendo assim, a transposição foi confirmada com a realização de PCR utilizando uma combinação de oligonucleotídeos M13 F e *Chi2f* R, M13 R e *Chi2f* F e *Chi2f* F e *Chi2f* R em cada reação. Os fragmentos amplificados apresentaram tamanho de 3.900 pb, 1.865 pb e 1.233 pb conforme o esperado, respectivamente (Figura 51).

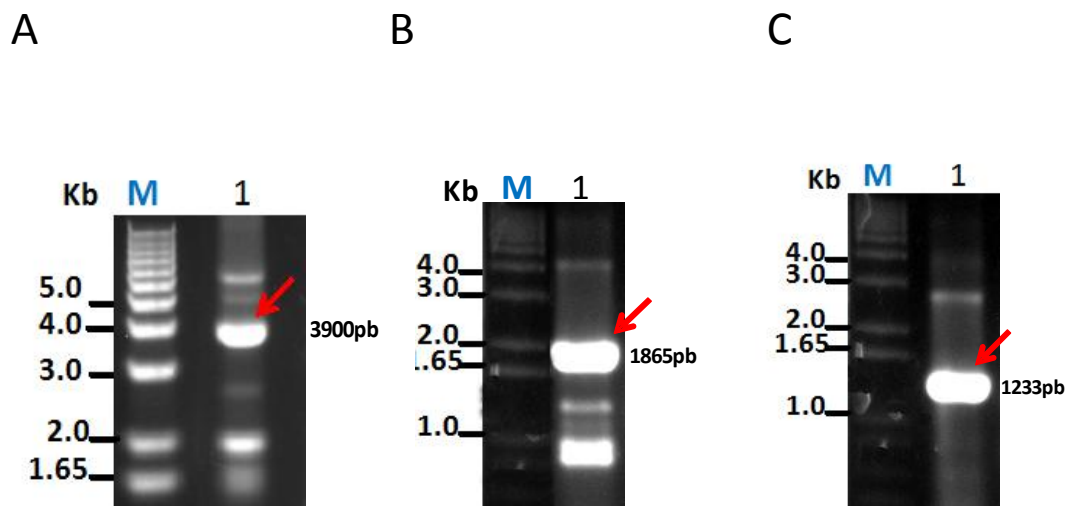


Figura 51: Confirmação da transposição do gene *chi2* para o DNA do bacmídeo. Gel de Agarose 0.8 %. Poço 1 – pBac*Chi2*, produto de PCR utilizando os oligonucleotídeos M13 F e *Chi2f* R obtendo um fragmento esperado de 3.900 pb. Poço 2 - pBac*Chi2*, produto de PCR utilizando os oligonucleotídeos M13 R e *Chi2f* F obtendo um fragmento esperado de 1.865 pb. Poço 3 - pBac*Chi2*, produto de PCR utilizando os oligonucleotídeos *Chi2f* F e *Chi2f* R obtendo um fragmento esperado de 1.233 pb. M-Marcador de Peso Molecular 1Kb Plus DNA ladder, (Invitrogen).

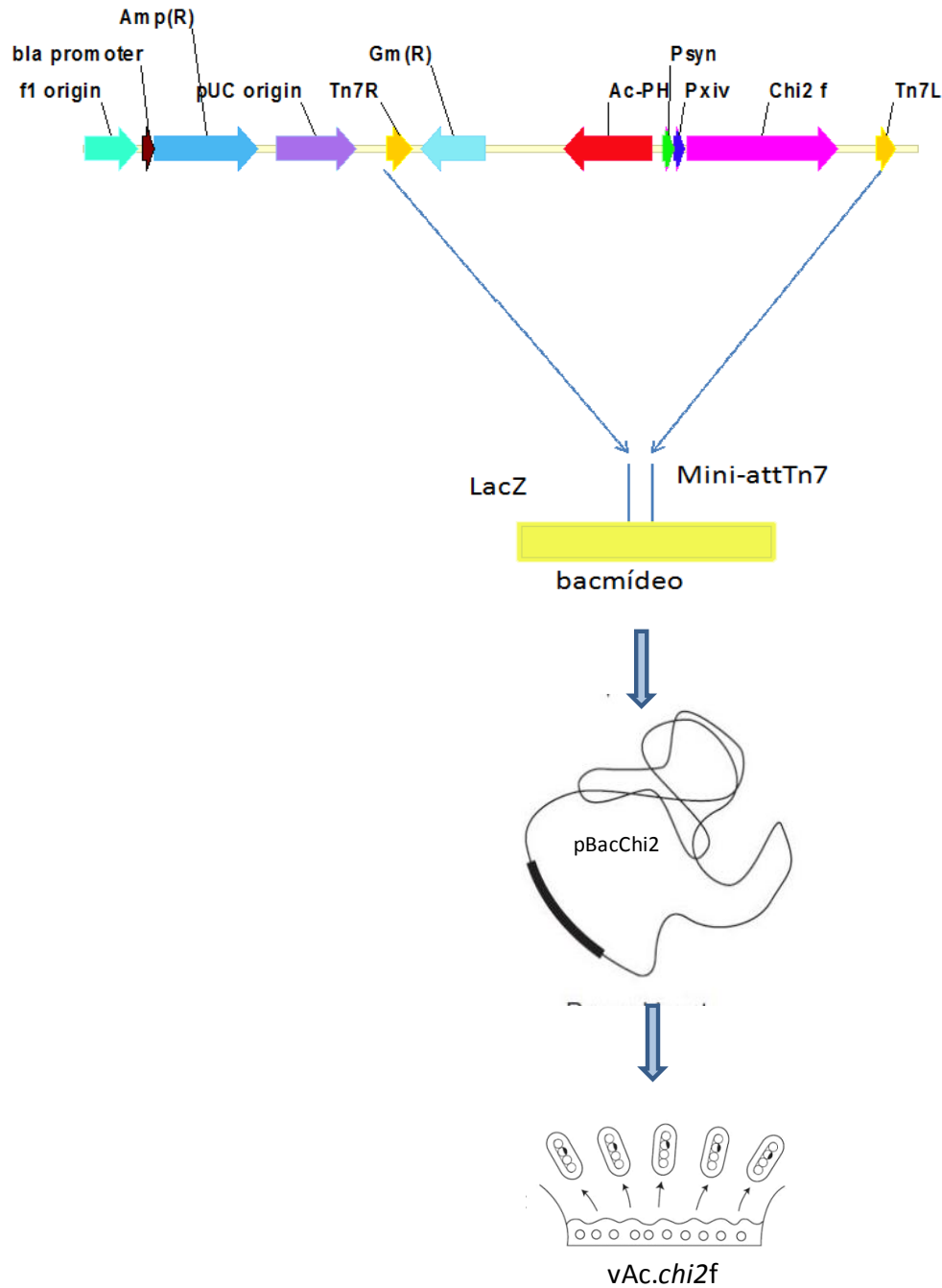


Figura 52: Esquema da construção do vírus *vAc.chi2f*. O esquema indica a região aonde foi transposto o gene *chi2*, juntamente com os promotores *pSyn* e *pXIV* e o gene da poliedrina do *AcMNPV*, no bacmídeo, para a construção do vírus recombinante. Na ilustração superior, o esquema representa o plasmídeo doador *pPSX.chi2f* com as regiões homólogas *Tn7L* e *R* responsáveis pela transposição, os genes ampicilina *Amp(R)* e gentamicina *Gm(R)* que conferem resistência, duas origens de replicação para cópias múltiplas (*f1* e *pUC*), além do gene *chi2* sob o comando dos promotores *pSyn* e *pXIV*, a presença do promotor e do gene da poliedrina do *AcMNPV*. A ilustração inferior, representa a região do bacmídeo aonde ocorreu a transposição do gene *chi2* para o genoma do baculovírus *AcMNPV* na forma de um grande plasmídeo, originando o bacmídeo recombinante *pBacChi2* e consecutivamente transfectar esse o bacmídeo recombinante *pBacChi2* em células de inseto *BTI-Tn5B1-4* visando a construção do vírus recombinante *vAc.chi2f*.

Células de inseto BTI-Tn5B1-4 foram transfectadas com o DNA do pBac*Chi2* e lipossomos (Cellfectin, Invitrogen), e sete dias após a transfecção, o sobrenadante contendo o vírus recombinante (vAc.*chi2f*) foi coletado e usado para infectar novas células BTI-Tn5B1-4, sendo possível observar a 96 h p.i. corpos de oclusão poliédrico (Figura 53).

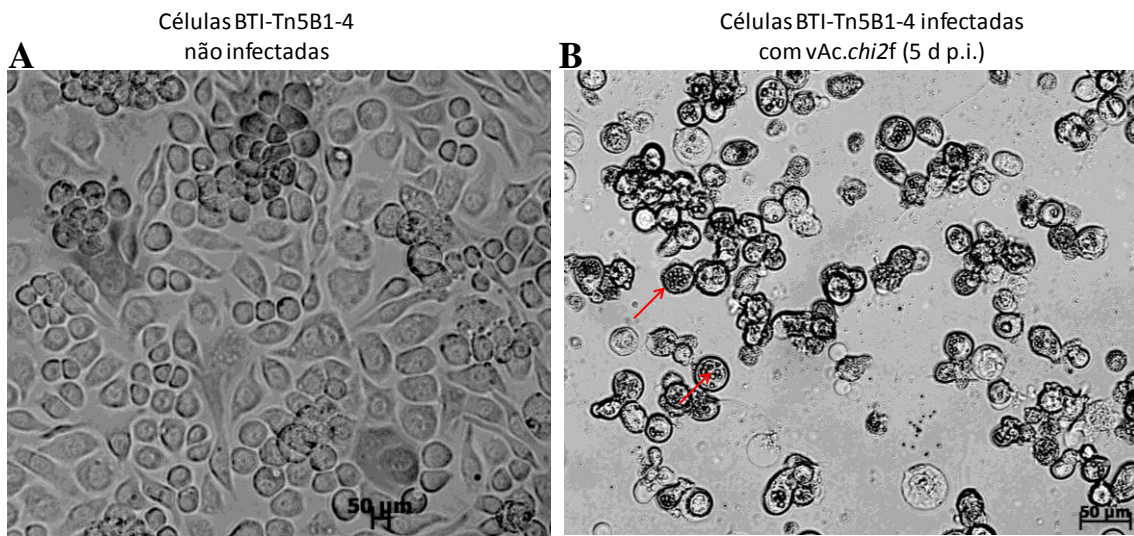


Figura 53: Análise estrutural de células de inseto infectadas com o vírus recombinante vAc.*chi2f*. A) Células BTI-Tn5B1-4 não infectadas. B) células BTI-Tn5B1-4 infectadas pelo vAc.*chi2f*, com 5 d p.i. As setas indicam poliedros (OBs) no núcleo de células infectadas pelo vírus vAc.*chi2f*.

4.3 Bioensaios:

As análises de mortalidade pela concentração letal média (CL_{50}) de poliedros (OB/nl), necessária para matar 50% da população de larvas de *S. frugiperda*, apresentou valores três vezes menor para larvas infectadas com os poliedros do vírus recombinante vAc.*chi2f* (12,065 OB/nL), quando comparado com o vírus selvagem AcMNPV (40,115 OB/nL) entretanto não apresentou diferença significativa entre os vírus testados devido a sobreposição dos limites fiduciais (Tabela 12). Sendo assim, os resultados sugerem que embora o vírus recombinante, o qual possui em seu genoma tanto o gene

viral *chiA* nativo como o gene *chi2* do fungo *M.anisopliae*, tenha apresentado uma quantidade menor de vírus para matar 50% da população de insetos testadas que a do vírus selvagem, este vírus estava supeexpressando o gene quitinase em seu genoma.

Tabela 12: Concentração letal média (CL₅₀) para larvas neonatas de *S. frugiperda* infectadas oralmente com poliedros dos vírus AcMNPV e vAc.*chi2f*. Método de Probit.

Vírus	CL ₅₀ (OB/nl)	FL (95%) (lower – upper)	Slope ± (SE)	χ ²
<i>vAc.chi2f</i>	12,065	2,899 - 26,102	0,384	1,22
AcMNPV	40,115	14,122 – 238,673	0,428	1,64

CL₅₀ Concentração letal média de poliedros (OB/nl) necessária para matar 50% da população de insetos em teste.

FL: limites fiduciais

SE: erro padrão

χ²: qui-square

4.4 Análise enzimática:

A atividade quitinolítica foi analisada a partir do extrato de células de inseto BTI-Tn5B1-4 infectadas com os vírus AcMNPV e vAc.*chi2f* a 72 h p.i. No extrato total de células de inseto infectadas com os vírus recombinantes vAc.*chi2f* ($A_{550} = 4,75 \pm 0,035$ - $P < 0,05$) e vSynQuit ($A_{550} = 3,74 \pm 0,14$) a atividade encontrada foi maior quando comparado com o extrato de células infectadas com o vírus AcMNPV ($A_{550} = 3,66 \pm 0,005$) e em células não infectadas ($A_{550} = 2,46 \pm 0,027$) (Figura 54). Além disso, a atividade detectada nos extratos de células de inseto infectada entre os vírus recombinantes, foi maior para o vAc.*chi2f* quando comparado com o vSynQuit (Welzel, 2006). O extrato de células não infectadas apresentou baixo nível de atividade quitinolítica, o que pode ser atribuído à atividade enzimática endógena detectada na célula hospedeira.

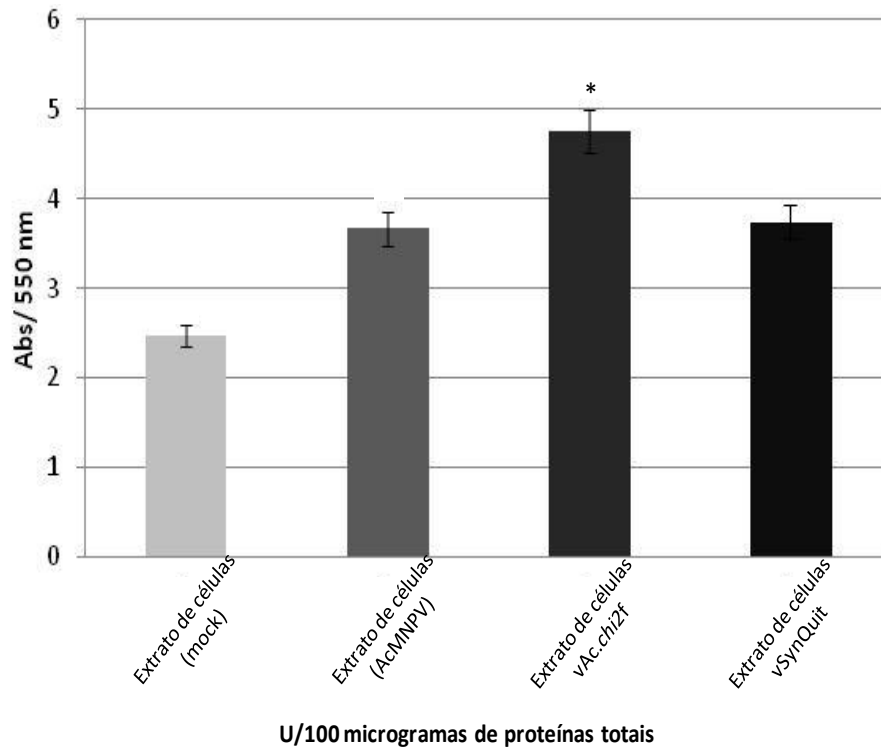


Figure 54: Análise da atividade quitinolítica. O gráfico apresenta a atividade quitinolítica detectada a partir do extrato total de células de inseto infectadas com os vírus recombinantes (*vAc.chi2f* e *vSynQuit*) e selvagem (*AcMNPV*), além de células de insetos não infectadas (*Mock*). No ensaio com extrato de células de inseto infectadas com os vírus recombinantes apresentaram maior atividade de quitinase, quando comparado com o selvagem e com extratos de células de insetos não infectadas. Os ensaios foram feitos em triplicata. * $P < 0.05$ (test-t Student's).

5 DISCUSSÃO

Com o auxílio da biotecnologia, a seleção de organismos mais virulentos é essencial para a utilização e distribuição ambiental de microrganismos geneticamente modificados, como por exemplo, vírus recombinantes mais eficientes para o controle biológico de insetos praga.

No presente trabalho, genes de quitinases (*chi1* e *chi2*) do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* foram usados para modificar geneticamente o genoma dos baculovírus AcMNPV utilizando diferentes vetores de transferência com o objetivo de analisar o efeito da expressão dessas proteínas na patogenicidade viral. O vetor de transferência pFBI-AccI-PSX, utilizado para construção de AcMNPV recombinantes possui dois promotores em tandem (pSyn e PXIV), assim como, no vetor de transferência pSynXIVVI+X3 (Wang *et al.*, 1991) utilizado em alguns estudos para expressão de proteínas heterólogas. Estes promotores pSyn e PXIV são ativados na fase tardia e muito tardia da expressão gênica viral e são muito utilizados para expressar proteínas heterólogas em altos níveis, em células de inseto. O vetor pFBI-AccI-PSX possui além dos promotores pSyn e PXIV, o promotor e o gene da poliedrina do baculovírus AcMNPV facilitando, assim, a detecção do vírus recombinante quando transfectado em células de inseto. Esse vetor foi usado para a construção do vírus recombinante vAc.*chi2f*, que foi confirmado pela presença de poliedros em células infectadas (Figura 54).

A maioria dos baculovírus possui um gene de quitinase expresso, em células de inseto, como uma proteína por volta de 58 kDa (gene *chiA* de AcMNPV) nos estágios finais da infecção (Ayres *et al.*, 1994), assim como, uma catepsina (gene *v-cath* de

AcMNPV) de 38 kDa (Rawlings *et al.*, 1992; Slack *et al.*, 1995) e que esse genes atuam juntos para promover a liquefação do hospedeiro antes da morte do hospedeiro

A desintegração do inseto infectado pelo AcMNPV é vantajosa para o vírus, pois permite uma disseminação eficiente de poliedros no ambiente (Saville *et al.*, 2004). Desta forma, a superexpressão de quitinases em insetos infectados com o AcMNPV recombinante contendo, tanto o gene viral quitinase quanto gene de quitinases heterólogas, poderiam em conjunto aumentar a sua virulência pela maior degradação da cutícula do inseto.

Estudos mostraram que a expressão de genes quitinase heterólogas sob o comando de promotores forte de baculovírus, com o da poliedrina, foi capaz de acelerar o processo de morte das larvas de *S. frugiperda* (75 h) quando comparada ao vírus selvagem (100 h) (Gopalakrishnan *et al.*, 1995). Welzel (2006) construiu um baculovírus AcMNPV recombinante vSynQUIT, contendo a quitinase (*chit1*) do fungo *M. anisopliae* sob o comando de promotores fortes (pSyn e pXIV) visando o aumento da virulência do vírus contra o seu hospedeiro, sendo possível observar uma diminuição do tempo letal médio necessário para matar 50% da população quando comparado com o vírus selvagem AcMNPV em larvas de *S. frugiperda* no 3º instar de desenvolvimento, sugerindo o aumento na virulência do vírus recombinante em relação ao vírus selvagem. Enquanto para larvas neonatas infectadas com o vírus recombinante vSynQuit o tempo letal médio foi 45,2% menor em relação ao vírus selvagem (Welzel, 2010), ou seja, as larvas estavam mais susceptíveis a infecção.

Boldo *et al.* (2009) verificaram os efeitos da superexpressão e da deleção da quitinase (*chi2*) do *M. anisopliae*, onde os transformantes obtidos nos ensaios de superexpressão e de deleção do gene *chi2* apresentaram diferenças nos níveis de

virulência quando testados em bioensaios utilizando o inseto *Dysdercus peruvianus*. A linhagem com o gene *chi2* deletado apresentou uma redução de 19% em seu TL₅₀. No presente trabalho, larvas neonatas de *S. frugiperda* foram infectadas com o vírus recombinante vAc.*chi2f* e o selvagem AcMNPV. Os resultados sugerem que não houve diferença significativa entre os vírus testados, embora o vírus recombinante apresente em seu genoma uma outra quitinase para aumentar a virulência nas larvas. Portanto novos bioensaios serão conduzidos.

A correlação entre atividade quitinolítica em *M. anisopliae* e virulência pode ser melhor avaliada pela análise individual de genes através de análises funcionais. Como por exemplo, mutantes construídos a partir da deleção de uma quitinase bifuncional CHIT30, foram menos eficientes em relação a secreção desta enzima e à virulência em bioensaios com *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera - Pyrrhocoridae) (Staats, 2007). Enquanto a endoquitinase codificada pelo gene *chit1* de *Metarhizium acridum* parece não aumentar a virulência contra *M. sexta*, visto que linhagens contendo cassetes para expressão constitutiva deste gene não foram mais virulentos ao inseto modelo, apesar do aumento na produção de quitinases (Screen *et al.*, 2001).

No presente estudo, as atividades quitinolíticas dos extratos de células de inseto (BTI-Tn5B1-4) infectadas pelos vAc.*chi2f* e AcMNPV foram avaliadas utilizando o substrato fluorescente 4MU-(GlcNAc)₂, específico para detectar a atividade exoquitinolítica. O resultado obtido no ensaio quitinolítico indica maior atividade enzimática em extrato de células de inseto infectadas pelos vírus recombinantes vAc.*chi2f* e vSynQuit, quando comparados às células de inseto infectadas pelo vírus selvagem AcMNPV e de células não infectadas. A presença do gene *chi2* no genoma do baculovírus AcMNPV recombinante, vAc.*chi2f*, foi capaz de detectar a produção de

maior quantidade de enzima liberada quando comparada com o vírus recombinante vSynQuit, o qual possui o gene *chi1* do fungo *M. anisopliae* (Welzel, 2006). A detecção de atividade quitinolítica observada em células infectadas pelo vírus selvagem pode ter sido maior quando comparada com células não infectadas, devido a presença de uma quitinase viral (*chiA*) no genoma do baculovírus selvagem AcMNPV (Hawtin *et al.*, 1995). Entretanto, a menor detecção de atividade de quitinase produzida pelo vírus contendo *chi1* pode ser atribuída a melhor expressão do gene *chi2* em relação ao gene *chi1*, uma vez que estudos indicam melhor expressão de *chi2* de *M. anisopliae* em relação a outras quitinases inclusive a *chi1* (Boldo *et al.*, 2009).

Segundo Oliveira *et al.* (2006) o genoma do baculovírus AgMNPV os genes quitinase e catepsina estão ausentes, diferindo da maioria dos baculovírus, inclusive do AcMNPV, que possuem tais genes. Para melhor avaliar a expressão de quitinases heterólogas no genoma do baculovírus AgMNPV construímos neste trabalho, o plasmídeo, p2100.*chi2f*, que por sua vez possui o promotor e o gene da poliedrina do baculovírus AgMNPV, além do gene *chi2* sob o comando dos mesmos promotores do vírus recombinante vAc.*chi2f*, pSyn e PXIV. Porém a metodologia aplicada para construir o vírus recombinante AgMNPV foi por recombinação homóloga, utilizando co-transfecção, em células de inseto, de um vetor de transferência e o DNA viral. Após várias tentativas, foi possível detectar a presença de vírus recombinante após a co-transfecção. Entretanto o vírus recombinante não foi isolado até o momento.

Contudo, estudos envolvendo a superexpressão de genes heterólogos, envolvidos principalmente na degradação do hospedeiro são essenciais visando o aumento da patogenicidade e virulência de vírus utilizados contra importantes pragas que atacam plantações de interesse econômico no Brasil e no mundo.

PERSPECTIVAS

Visando a conclusão do capítulo I, referente ao estudo dos genes virais *chiA* e *v-cath*, pretende-se finalizar com:

- ❖ Utilizar nova estratégia para construção do vírus recombinante vAgp2100Ac.*chiA/v-cath*.
- ❖ Análise dos efeitos causados pelo vírus recombinante vAgp2100Ac.*chiA/v-cath* em larvas de *A. gemmatalis* com base na determinação de parâmetros de mortalidade (bioensaios), assim como ensaios enzimáticos.
- ❖ Produção de antisoro e análise da expressão das proteínas recombinantes CHIA e V-CATH.

Com relação ao capítulo II, referente ao estudo do efeito causado pela introdução de quitinases pertencente ao fungo *M. anisopliae*, no genoma de baculovírus, pretende-se finalizar com:

- ❖ Construção de baculovírus AgMNPV recombinante pela inserção do gene *chi2* e *chi1*, do fungo *M. anisopliae*, no genoma do baculovírus.
- ❖ Análise e comparação dos efeitos causados pelo vírus recombinante, contendo o gene *chi1* ou *chi2* do fungo *M. anisopliae*, em larvas de *S. frugiperda* com base na determinação de parâmetros de mortalidade (bioensaios).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J. R.; MCCLINTOCK, T. J. Baculoviridae: nuclear polyhedrosis viruses. Nuclear polyhedrosis viruses of insects. In.: Adams, J. R. e Bonani, J. R. (Ed.). **Atlas of Invertebrate Viruses**. Boca Raton: CRC, 1991.

AFONSO, C. L.; TULMAN, E. R.; LU, Z.; BALINSKY, C. A.; MOSER, B. A.; BECNEL, J. J.; ROCK, D. L.; KUTISH, G. F. Genome sequence of a baculovirus pathogenic for *Culex nigripalpus*. **Journal of Virology**, v. 75, n. 22, p. 11157-11165, 2001.

ALLEN, G. E.; KNELL, J. D. A nuclear polyhedrosis virus *Anticarsia gemmatalis*: I. Ultrastructure, replication, and pathogenicity. **The Florida Entomologist**, v. 60, n. 3, p. 233-40, 1977.

ALMEIDA, A. M. R.; AMORIM, L.; BERGAMIN, F. A.; TORRES, E.; FARIAS, J.R. B.; BENATO, L. C.; PINTO, M. C.; VALENTIN, N. Progress of soybean charcoal rot under tillage and no-tillage systems in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 131-35, 2003.

ALMEIDA, J. E. M.; ALMEIDA, B. F. Banco de microrganismos entomopatogênicos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 4, n. 20, p. 30-33, 2001.

AYRES, M. D.; HOWARD, S. C.; KUZIO, J.; LOPEZ-FERBER, M.; POSSEE, R.D. The complete DNA sequence of *Autographa californica* Nuclear polyhedrosis virus. **Virology**, v. 202, n. 2, p. 586-605, 1994.

BAC-TO-BAC® TOPO® EXPRESSION SYSTEM. **An efficient cloning and sitespecific transposition system to generate recombinant baculovirus for high-level protein expression**. Invitrogen. Catálogo nº A11101, A11100. Carlsbad, CA: Life Technologies, 2008. Versão A.

BARATTO, C. M.; DUTRA, V.; BOLDO, J. T.; LEIRIA, L. B.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Isolation, characterization, and transcriptional analysis of the chitinase chi2 Gene (DQ011663) from the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Current Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 217-21, 2006.

BARATTO, C. M.; SILVA, M. V.; SANTI, L.; PASSAGLIA, L.; SCHRNAK, I. S.; VAINSTAIN, M. H.; SCHRANK, A. Expression and characterization of the 42 kDa chitinase of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* in *Escherichia coli*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 11, p. 723-28, 2003.

BHATTACHARYA, A.; PURI, M.; DATTA, A. Induction of N-acetylglucosamine kinase in yeast. **Biochemical Journal**, v. 141, n. 2, p. 593-95, 1974.

BHATTACHARYA, A.; S., B.; DATTA, A. Regulation of N-acetylglucosamine kinase synthesis in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 374, n. 3, p. 384-91, 1974.

- BHATTACHARYA, D.; NAGPURE, A.; GUPTA, R. K. Bacterial chitinases: properties and potential. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 21-28, 2007.
- BILIMORIA, S. I. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. In.: KURSTAK, E. (Ed.). **Viruses of invertebrates**. New York: Marcel Dekker, 1991.
- BISWAS, M.; SINGH, B.; DATTA, A. Induction of N-acetylmannosamine catabolic pathway in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 585, n. 4, p. 535-42, 1979.
- BLISSARD, G. W.; ROHRMANN, G. F. Baculovirus diversity and molecular biology. **Annual Review of Entomology**, v. 35, p. 127-55, 1990.
- BOGO, M. R.; ROTA, C. A.; JR., H. P.; OCAMPOS, M.; CORREA, C. T.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. A chitinase encoding gene (chit1 gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full length cDNA. **Current Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 221-25, 1998.
- BOLDO, J. T.; JUNGES, A.; AMARAL, K. B.; STAATS, K. B.; VAINSTEIN, C. C.; HENNING, M.; SCHRANK, A. Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. **Current Genetics**, v. 55, n. 5, p. 551-60, 2009.
- BOLLIGER, F. P. **IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. 2012. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default_publicoCompleta.shtm>. Acesso em: 25 Nov. 2012.
- BONATO, E. R.; BONATO, A. L. V. **A soja no Brasil: história e estatística**. Londrina: EMBRAPA-CNPQ-Documentos, 21, 61 p. 1987.
- BOUCIAS, D. G.; PENDLAND, J. C. Baculoviruses. In. **Principles of insect pathology**. Norwell: Kluwer Academic Publishers, 1998.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantifications of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-54, 1976.
- BRESSOLLIER, P.; LETOURNEAU, F.; URDACI, M.; VERNEUIL, B. Purification and characterization of a keratinolytic serine protease from *Streptomyces albidoflavus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2570-576, 1999.
- CARTENS, E. B.; BALL, L. A. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**, v. 154, p. 1181-188, 2009.
- CASTRO, M. E. B.; SOUZA, L. M.; SIHLER, W.; RODRIGUES, M. C. J.; RIBEIRO, M. B. Biologia Molecular de baculovirus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 10, p. 1733-761, 1999.

CHARNLEY, A. K. Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: A speculative review. In.: Anderson, J. M. et al. (eds.) (Ed.). **Invertebrate-Microbiology Interactions**. London: Cambridge, 1984.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira**. 2011. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 04 de Nov. 2011.

CORRÊA, R. F. T. **Estudo da atividade tóxica para *Aedes aegypti* das proteínas Cry4Aa e Cry4Ba de *Bacillus thuringiensis* expressas em baculovírus recombinantes**. 84 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências da Saúde - Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. L. C.; MATOSO, M. J. **Controle Biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma***. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 40 p. 1999.

DA SILVA, M. V.; SANTI, L.; STAATS, C. C.; DA COSTA, A. M.; COLODEL, E. M.; DREMEIER, D.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the chi3 gene. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 3, p. 182-92, 2005.

DAIMON, T.; SUSUMU, K.; KANG, W.; SHIMADA, T. Comparative studies of *Bombyx mori nucleopolyedrovirus* chitinase and its host ortholog, BmChi-h. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 345, n. 2, p. 825-33, 2006.

DAIMON, T., KATSUMA, S., SHIMADA, T. Mutational analysis of active site residues of chitinase from *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. **Virus Research**, v. 124 n. 1-2, p. 168-175, 2007.

DALL'AGNOL, A. The impact of soybeans on the Brazilian economy. In. **Technical information for agriculture**. São Paulo: Máquinas Agrícolas Jacto, 2000.

DUO-CHUAN, L. Review of fungal chitinases. **Mycopathologia**, v. 161, n. 6, p. 345-60, 2006.

DWYER, K. G.; GRANADOS, R. R. Mapping *Pieris-rapae* granulosis-virus transcripts and their in vitro translation products. **Journal of Virology**, v. 62, n. 5, p. 1535-542, 1988.

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

E. COLI EXPRESSION SYSTEM WITH GATEWAY® TECHNOLOGY. **Gateway®-adapted destination vectors for cloning and high-level expression of native or tagged recombinant proteins in *E. coli***. Invitrogen. Catálogo nº 11824- 026, 11801-016, 11802-014, 11803-012, 12216-016. Carlsbad: Life Technologies, 2008. Versão G.

EFSTATHIOU, S.; PRESTON, C. M. Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency. **Virus Research**, v. 111, n. 2, p. 108-19, 2005.

EMBRAPA SOJA. **Sistema Embrapa de Bibliotecas**. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>>. Acesso em: 01 de Out. 2011.

EMBRAPA SOJA. **Tecnologia de Produção de Soja – A soja no Brasil**. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>>. Acesso em: 04 de Out. 2011.

FEDERICI, B. A. Baculovirus pathogenesis. In.: Miller, L. K. (Ed.). **The baculoviruses**. New York: Plenum Press, 1997.

FERRAZ, L. C. C. B. As meloginoidoses das soja: passado, presente e futuro. In.: SILVA, J. F. V. (Ed.). **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Londrina: Embrapa Soja e Sociedade Brasileira de Nematologia, 2001.

FUNK, C. J.; CONSIGLI, R. A. Evidence for zinc-binding by 2 structural proteins of *Plodiainterpunctella granulosis-virus*. **Journal of Virology**, v. 66, n. 5, p. 3168-171, 1992.

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

GARCIA-MARUNIAK, A.; MARUNIAK, J. E.; ZANOTTO, P. M.; DOUMBOUYA, A. E.; LIU, J. C.; MERRITT, T. M.; LANOIE, J. S. Sequence analysis of the genome of the *Neodiprion sertifer nucleopolyhedrovirus*. **Journal of Virology**, v. 78, n. 13, p. 7036-051, 2004.

GATEWAY® TECHNOLOGY. **A universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in multiple systems**. Invitrogen. Catálogo nº 12535-019 e 12535-027. Carlsbad: Life Technologies, 2003. Versão E.

GHOSH, S.; PARVEZ, K. M.; BANERJEE, K.; SARIN, S. K. E.; HASNAIN, S. E. Baculovirus as mammalian cell expression vector for gene therapy: An emerging strategy. **Molecular Therapy**, v. 6, n. 1, p. 6-11, 2002.

GILLESPIE, A. T. Use of fungi to control pests of agricultural importance. In.: Burge, M. N. (Ed.). **Fungi in biological control systems**. Manchester: Manchester University, 1988.

GOODAY, G. W. Aggressive and defensive roles for chitinases. In.: Muzzarelli, R. A. A. e Jollès, P. (Ed.). **Chitin and Chitinases**. Berlim: Birkhäuser, 1999.

GOPALAKRISHNAN, B.; MUTHUKRISHNAN, S.; KRAMER, K. J. Baculovirus mediated expression of a *Manduca sexta* chitinase gene: properties of the recombinant protein. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 25, n. 2, p. 255-65, 1995.

GRAMKOW, A. W.; PERECMANIS, S.; SOUSA, R. L. B.; NORONHA, E. F.; RIBEIRO, B. M. Insecticidal activity of two proteases against *Spodoptera frugiperda* larvae infected with recombinant baculoviruses. **Virology**, v. 7, 2012.

GRANADOS, R. R.; GUXUN, L.; DERSEKSEN, A. C. G.; MCKENNA, K. A. A. New insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 64, n. 3, p. 260-66., 1994.

GREENE, G. L.; LEPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v. 69, n. 4, p. 487-88, 1976.

GREENSPAN, G. L.; CORSARO, B. G.; HUGHES, P. R.; GRANADOS, R. R. In vivo enhancement of baculovirus infection by the viral enhancing factor of a granulosis virus of the cabbage looper *Trichoplusia-ni* Lepidoptera noctuidae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 58, n. 2, p. 203-10, 1991.

GROSS, C. H.; SHUMAN, S. Characterization of a baculovirus-encoded RNA 5' -triphosphatase. **Journal of Virology**, v. 72, n. 9, p. 7057-063, 1998.

GUARINO, L. A.; XU, B.; JIN, J.; DONG, W. A virus encoded RNA polymerase purified from baculovirus-infected cells. **Journal of Virology**, v. 72, n. 10, p. 7985-991, 1998.

HALLWASS, M. **Uso do bioinseticida baculovírus *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) como vetor de expressão de proteínas com interesse fitopatológico e como sistema biológico para análise da interação vírus/hospedeiro.** Dissertação (Mestrado) - Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília Brasília, 2005.

HAMMOCK, B. D.; BONNING, B.; POSSEE, R. D.; HANZLIK, T. N.; MAEDA, S. Expression and effects of the juvenile hormone esterase in a baculovirus vector. **Nature**, v. 34, p. 458-61, 1990.

HARRISON, R. L.; BONNING, B. C. Use of Proteases to Improve the Insecticidal Activity of Baculoviruses. **Biological Control**, v. 20, n. 3, p. 199-209, 2001.

HASHIMOTO, Y.; HAYAKAWA, T.; UENO, Y.; FUJITA, T.; Y., S.; MATSUMOTO, T. Sequence analysis of the *Plutella xylostella* granulovirus genome. **Virology**, v. 275, n. 2, p. 358-72, 2000.

HAWTIN, R. E.; ARNOLD, K.; AYRES, M. D.; ZANOTTO, P. M.; HOWARD, S. C.; GOODAY, G. W.; CHAPPELL, L. H.; KITTS, P. A.; KING, L. A.; POSSEE, R. D. Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. **Virology**, v. 212, n. 2, p. 673-85, 1995.

- HAWTIN, R. E.; ZARKOWSKA, T.; ARNOLD, K.; THOMAS, C. J.; GOODAY, G. W.; KING, L. A.; KUZIO, J. A.; POSSEE, R. D. Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. **Virology**, v. 238, n. 2, p. 243-53, 1997.
- HENRISSAT, B. Classification of chitinases modules. In.: Jolles, P. e Muzzarelli, R. A. A. (Ed.). **Chitin and Chitinases**. Berlim: Birkhäuser, 1999.
- HERNIOU, E. A.; JEHLE, J. A. Baculovirus phylogeny and evolution. **Current Drug Targets**, v. 8, n. 10, p. 1043-050, 2007.
- HERNIOU, E. A.; OLSZEWSKI, J. A.; CORY, J. S.; O'REILLY, D. R. The genome sequence and evolution of baculoviruses. **Annual Review of Entomology**, v. 48, p. 211-34, 2003.
- HESS, K. R.; ZHANG, W.; BAGGERLY, K. A.; STIVERS, D. N.; COOMBES, K. R. Microarrays: handling the deluge of data and extracting reliable information. **Trends in Biotechnology**, v. 19, n. 11, p. 463-68, 2001.
- HODGSON, J. J.; ARIF, M. B.; KRELL, J. P. Reprogramming the chiA expression profile of *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 9, p. 2479-487, 2007.
- HOM, G. L.; VOLKMAN, E. L. *Autographa californica M Nucleopolyhedrovirus* chiA is required for processing of V-CATH. **Virology**, v. 277, n. 1, p. 178-83, 2000.
- HOM, G. T.; OHKAWA, T.; TRUDEAU, D. E.; VOLKMAN, E. L. *Autographa californica M Nucleopolyhedrovirus* ProV-CATH is activated during infected cell death. **Virology**, v. 296, n. 2, p. 212-18, 2002.
- HOMMA, K.; KURATA, S.; NATORI, S. Purification, characterization, and cDNA cloning of procathepsin-I from the culture-medium of NIH-Sape-4, an embryonic-cell line of *Sarcophaga-peregrina* (flesh fly), and its involvement in the differentiation of imaginal disks. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 15258-5264, 1994.
- HORTON, M. H.; BURAND, J. P. Saturable attachment sites for polyhedron-driven baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. **Journal of Virology**, v. 67, n. 4, p. 1860-868, 1993.
- HOTCHKIN, P. G. Comparison of Virion Proteins and Granulin From a Granulosis Virus Produced in Two Host Species. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 38, p. 303-04, 1981.
- HUGHES, P. R.; WOOD, H. A. A synchronous peroral technique for the bioassay of insect viruses. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 37, n. 2, p. 154-59, 1981.
- JARVIS, D. L. Baculovirus expression vectors. In.: Miller, L. K. (Ed.). **The Baculoviruses**. New York: Plenum Press, 1997.

JEHLE, A. J.; BLISSARD, W. G.; BONNING, C. B.; CORY, S. J.; HERNIOU, A. E.; ROHRMANN, F. G.; THEILMANN, A. D.; THIEM, M. S.; VLAK, M. J. On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. **Archives of Virology**, v. 151, n. 7, p. 1257-266, 2006.

JOHNSON, D. W.; MARUNIAK, J. E. Physical map of *Anticarsia gemmatalis nuclear polyhedrosis virus* (AgMNPV-2) DNA. **Journal of General Virology** v. 70, n. 7, p. 1877-883, 1989.

JORNALE. **Soja-plantação**. Disponível em: < <http://jornale.com.br/mirian/wpcontent/uploads/2010/08/soja-plantacao.jpg> >. Acesso em: 28 de Out. 2011.

KATSUMA, S.; NOGUCHI, Y.; ZHOU, E. L. C.; KOBAYASHI, M.; MAEDA, S. Characterization of the 25KFP gene of the baculovirus *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*: implications for post-mortem host degradation. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 783-91, 1999.

KATSUMA, S.; TANAKA, S.; SHIMADA, T.; KOBAYASHI, M. Reduced cysteine protease activity of the hemolymph of *Bombyx mori* larvae infected with fp25K inactivated *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* results in the reduced postmortem host degradation. **Archives of Virology**, v. 149, n. 9, p. 1773-782, 2004.

KIM, M. G.; SHIN, S. W.; BAE, K. S.; KIM, S. C.; PARK, H. Y. Molecular cloning of chitinase cDNAs from the silkworm, *Bombyx mori* and the fall webworm, *Hyphantria cunea*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 28, n. 3, p. 163- 71, 1998.

KING, A. M.Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. The most recent report of the ICTV: Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth report of the International Committee on taxonomy of Viruses. (2012). Elsevier Academic Press.

KITTS, P. A.; AYRES, M. D.; POSSEE, R. D. Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 19, p. 5667-672, 1990.

KLEMA, M.; GOLDBERG, D. E. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, p. 275-305, 2002.

KRAMER, K. J.; CORPUZ, L.; CHOI, H. K.; MUTHUKRISHNAN, S. Sequence of a cDNA and expression of the gene encoding epidermal and gut chitinases of *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 23, n. 6, p. 691- 701, 1993.

KRAMER, K. J.; MUTHUKRISHNAN, S.; 887-900., I. I. B. M. B. Insect chitinases: Molecular biology and potential use as biopesticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, n. 11, p. 887-900, 1997.

LABANDERIA, C. C.; SEPKOSKI, J. J. Insect diversity in the fossil record. **Science**, v. 261, p. 310-14, 1993.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 660-85, 1970.

LARSSON, R. Insect pathological investigations on Swedish Thysanura: A nuclear polyhedrosis virus of the bristletail *Dilta hibernica*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 44, n. 2, p. 177-72, 1984.

LAUZON, H. A.; LUCAROTTI, C. J.; KRELL, P. J.; FENG, Q.; RETNAKARAN, A.; ARIF, B. M. Sequence and organization of the *Neodiprion lecontei* nucleopolyhedrovirus genome. **Journal of Virology**, v. 78, n. 13, p. 7023-035, 2004.

LAUZON, H. A. M.; GARCIA-MARUNIAK, A.; ZANOTTO, P.; CLEMENTE, J. C.; HERNIOU, E. A.; LUCAROTTI, C. J.; ARIF, B. M.; MARUNIAK, J. E. Genomic comparison of *Neodiprion sertifer* and *Neodiprion lecontei* nucleopolyhedroviruses and identification of potential hymenopteran baculovirus-specific open reading frames. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 6, p. 1477-489, 2006.

LAUZON, M. A. H.; JAMIESON, B. P.; KRELL, J. P.; ARIF, M. B. Gene organization and sequencing of the *Choristoneura fumiferana* defective nucleopolyhedrovirus genome. **Journal of General Virology**, v. 86, n. 4, p. 945-61, 2005.

LEE, H. H.; MILLER, K. L. Isolation of Genotypic variants of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis virus. **Journal of Virology**, v. 27, n. 3, p. 754-67, 1978.

LEORA SOFTWARE COMPANY. **PoloPlus: Probit and Logit Analysis. User's Guide. Versão 2.0**. Petaluma: LeOra Software Company, 2003. 39 p.

LEPORE, L. S.; ROELVINK, P. R.; GRANADOS, R. R. Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 68, n. 2, p. 131-40, 1996.

LI, W.; SHI, Z.; YU, M.; REN, W.; SMITH, C.; EPSTEIN, J. H.; WANG, H.; CRAMERI, G.; HU, Z.; ZHANG, H.; ZHANG, J.; MCEACHERN, J.; FIELD, H.; DASZAK, P.; EATON, B. T.; ZHANG, S.; WANG, L. F. Bats Are Natural Reservoirs of SARS-Like Coronaviruses. **Science**, v. 310, n. 5748, p. 676-79, 2005.

LI, Z.; LI, C.; PAN, L.; YU, M.; YANG, K.; PANG, Y. Characterization of p24 gene of *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus. **Virus Genes**, v. 30, n. 3, p. 349-56, 2005.

LIMA, A. A. **Análise do efeito causado pelos genes quitinase e catepsina dos baculovírus CfDefNPV e AcMNPV inseridos no genoma do *Anticarsia gemmatilis* multiple nucleopolyhedrovirus**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências da Saúde - Patologia Molecular, Universidade de Brasília., Brasília, 2008.

LU, A.; MILLER, L. K. Regulation of baculovirus late and very late expression. In: Miller, L. K. (Ed.). **The baculoviruses**. New York: Plenum Press, 1997.

- LUCAROTTI, C. J.; ARIF, B. M.; MARUNIAK, J. E. Genomic comparison of *Neodiprion sertifer* and *Neodiprion lecontei* nucleopolyhedroviruses and identification of potential hymenopteran baculovirus-specific open reading frames. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 6, p. 1477-489, 2006.
- LUCKOW, V. L.; LEE, S. C.; BARRY, G. F.; OLINS, P. O. Efficient generation of infectious recombinant baculovirus by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *E. coli*. **Journal of Virology**, v. 67, n. 8, p. 4566-579, 1993.
- MARTIGNONI, M. E.; IWAI, P. J. **A catalog of viral diseases of insects, mites, and ticks**. Portland: U.S.D.A. Forest Service, 1986. 57 p.
- MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. 3 ed. São Paulo: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 388 p.
- MERZENDORFER, H.; ZIMMICH, L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, p. 4393-412, 2003.
- MIKITANI, K.; SUGASAKI, T.; SHIMADA, T.; KOBAYASHI, N.; GUSTAFSSON, J. A. The chitinase gene of the silkworm, *Bombyx mori*, contains a novel Tc-like transposable element. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 37725-7732, 2000.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-28, 1959.
- MILLER, L. K. E. **The Baculoviruses**. New York: Plenum Press, 1997. 447 p.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Soja em número (safra 2010/2011). Disponível em: < http://www.cnpsa.embrapa.br/index.php?cod_pai=2eop_page=294 >. Acesso em: 05 de Out. 2012.
- MOLANO, J.; DURAN, A.; CABIB, E. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. **Analytical Biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 648-56, 1977.
- MORALES, L.; MOSCARDI, F. Comparação entre duas metodologias de bioensaios para vírus entomopatogênicos. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 22, p. 535-40, 1993.
- MOSCARDI, F. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. In.: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998.
- MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, v. 44, p. 257-89, 1999.
- MOSCARDI, F.; SOUZA, M. L. Baculovirus para o controle de pragas. **Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento**, v. 24, p. 22-29, 2002.

- MOTTRAM, J. C.; BROOKS, D. R.; COOMBS, G. H.; SAJID, M. Clã CD Cysteine Peptidases of Parasitic Protozoa. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 4, p. 182-87, 2003.
- MURPHY, F. A.; FAUKQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; GHABRIAL, S. A.; JARVIS, A. W.; MARTELLI, G. P.; MAYO, M. A.; SUMMERS, M. D. Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses: International Committee on Taxonomy of Viruses. New York: Springer-Verlag Wien, Sixth. 1995.
- O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus Expression Vectors: A laboratory Manual**. New York: Oxford, 1992.
- OHBA, M.; TANADA, Y. A synergistic factor enhances the in vitro infection of an insect baculovirus. **Naturwissenschaften**, v. 70, n. 12, p. 613-14, 1983.
- OHKAWA, T.; MAJIMA, K.; MAEDA, S. A cysteine protease encoded by the baculovirus *Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus*. **Journal of Virology**, v. 68, n. 10, p. 6619-625, 1994.
- OLIVEIRA, J. V. C. **Expressão temporal dos genes do nucleopoliedrovirus *Anticarsia gemmatalis* e sua influencia sobre a célula**. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas - Programa de Pós-graduação, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- OLIVEIRA, J. V. C.; WOLFF, J. L. C.; MARUNIAK-GARCIA, A.; RIBEIRO, B. M.; CASTRO, M. E. B.; SOUZA, L. M.; MOSCARDI, F.; MARUNIAK, J. E.; ZANOTTO, P. M. A. Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus*. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 11, p. 3233-250, 2006.
- PAGE, M. J.; DI CERA, E. Serine peptidases: classification, structure and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 7-8, p. 1220-236, 2008.
- PENNOCK, G. D.; SHOEMAKER, C.; MILLER, L. K. Strong and regulated expression of *Escherichia coli* beta-galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. **Molecular and Cellular Biology**, v. 4, n. 3, p. 399-06, 1984.
- PERES, J. R. R. Transgênico: os benefícios para um agronegócio sustentável. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, v. 18, n. 1, p. 13-26, 2001.
- POSSEE, R. D. Baculoviruses as expression vectors. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, n. 5, p. 569-72, 1997.
- PRAÇA, L. B.; SILVA, N. S. B.; MONNERAT, R. G. *Spodoptera frugiperda* J. Smith 1797 (*Lepidoptera: Noctuidae*) Biologia, amostragem e métodos de controle. In. **Documentos 199**. Brasília: Embrapa Cenargem, 2006.
- PTASHNE, M. **A Genetic Switch: Phage (Lambda) and Higher Organisms**. 2 ed. Cambridge: Cell Press & Blackwell Scientific Publications, 1992.

- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Versão 2.11.1. Viena, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2010.
- RAMACHANDRAN, A.; BASHYAM, M. D.; VISWANATHAN, P.; GHOSH, S.; SENTHIL, K. M. S.; HASNAISN, S. E. The bountiful and baffling baculovirus: The story of polyhedron transcription. **Current Science**, v. 81, n. 8, p. 998-1010, 2001.
- RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.
- RAWLINGS, N. D.; O'BRIEN, E.; BARRETT, A. J. MEROPS: The protease database. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 343-46, 2002.
- RAWLINGS, N. D.; PEARL, L. H.; BUTTLE, D. J. The baculovirus *Autographa californica nuclear polyhedrosis* virus genome includes a papain-like sequence. **Biological Chemistry**, v. 373, p. 1211-15, 1992a.
- RAWLINGS, N. D.; PEARL, L. H.; BUTTLE, D. J. The baculovirus *Autographa californica nuclear polyhedrosis* virus genome includes a papain-like sequence. **Biology and Chemistry**, v. 373, p. 1211-215, 1992b.
- REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **The American journal of Hygiene**, v. 27, p. 493-97, 1938.
- RIBEIRO, B. M.; GATTI, C. D. C.; COSTA, M. H.; MOSCARDI, F.; MARUNIAK, J. E.; POSSEE, R. D.; ZANOTTO, P. M. A. Construction of a recombinant *Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV-2D) harbouring the β -galactosidase gene. **Archives of Virology**, v. 146, n. 7, p. 1355-367, 2001.
- RIBEIRO, B. M.; SOUZA, M. L.; KITAJIMA, E. W. Taxonomia, Caracterização e bioquímica de vírus de insetos. In.: Alves, B. S. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo: Unes, 1998.
- RUDENSKAYA, G. N.; PUPOV, D. V. Cysteine Proteinases of Microorganisms and Viruses. **Biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 3-17, 2008.
- SAJID, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 1-21, 2002.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SAVILLE, G. P.; THOMAS, C. J.; POSSEE, R. D.; KING, L. A. Partial redistribution of the *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* chitinase in virusinfected cells accompanies mutation of the carboxy-terminal KDEL ER-retention motif. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 3, p. 685-94, 2002.

- SAVILLE, P. G.; PATMANIDI, L. A.; POSSEE, D. R.; KING, A. L. Deletion of the *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* chitinase KDEL motif and in vitro and in vivo analysis of the modified virus. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 4, p. 821-31, 2004.
- SCREEN, S. E.; HU, G.; ST. LEGER, R. J. Transformants of *Metarhizium anisopliae* *sf. anisopliae* overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae sf. acridum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, n. 4, p. 260-66, 2001.
- SECCHI, V. A. Baculovírus, mais do que uma grande descoberta: uma revolucionária alternativa aos agrotóxicos. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, v. 3, n. 3, p. 49-54, 2002.
- SEIDL, V. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 36-42, 2008.
- SEIDL, V. A.; HUEMER, B.; SEIBOTH, B.; KUBICEK, C. P. A complete survey of Trichoderma chitinase reveals tree distinct subgroups of family 18 chitinases. **FEBS Journal**, v. 272, n. 22, p. 5923-939, 2005.
- SHINODA, T.; OBAYASHI, J.; MATSUI, M.; CHINZEI, Y. Cloning and functional expression of a chitinase cDNA from the common cutworm, *Spodoptera litura*, using a recombinant lacking the virus-encoded chitinase gene. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, n. 6-7, p. 521-32, 2001.
- SIEBURTH, P. J.; MARUNIAK, J. E. Growth characteristics of a continuous cell line from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 24, n. 3, p. 195-98, 1988.
- SINGH, B.; DATTA, A. Induction of N-acetylglucosamine-catabolic pathway in spheroplasts of *Candida albicans*. **Biochemical Journal**, v. 178, n. 2, p. 427-31, 1979a.
- SINGH, B.; DATTA, A. Regulation of glucosamine-6-phosphate deaminase synthesis in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 583, n. 1, p. 28-35, 1979b.
- SINGH, B.; DATTA, A. Regulation of N-acetylglucosamine uptake in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 557, n. 1, p. 248-58, 1979c.
- SLACK, J. M.; ARIF, B. M. The baculovirus occlusion-derived virus: Virion structure and function. **Advances in Virus Research**, v. 69, p. 99-165, 2007.
- SLACK, J. M.; FAULKNER, P. Characterization of v-cath, a cathepsin L-like proteinase expressed by the baculovirus *Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis* virus. **Journal of General Virology**, v. 76, n. 5, p. 1091-098, 1995.
- SLACK, J. M.; RIBEIRO, B. M.; SOUZA, M. L. The gp64 locus of *Anticarsia gemmatalis multicapsid nucleopolyhedrovirus* contains a 3' repair exonuclease homologue and lacks v-cath and ChiA genes. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 1, p. 211-19, 2004.

SMITH, G. E.; VLAK, J. M.; SUMMERS, M. D. Physical analysis of *Autographa californica nuclear polyhedrosis* virus transcripts for polyhedron and 10.000 molecular weight protein. **Journal of Virology**, v. 45, n. 1, p. 215-25, 1983.

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

ST. LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 58, n. 3, p. 415-26, 1991.

ST. LEGER, R. J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; RIZZO, N. W.; ROBERTS, D. W. Biochemical characterization and ultrastructural localization of chitinase produced by *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride* and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 3, 1996.

ST. LEGER, R. J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; ROBERTS, D. W. Proteinsynthesis in *Metarhizium anisopliae* growing on host cuticle. **Mycological Research**, v. 99, n. 9, p. 1034-040, 1995.

STAATS, C. C.; BOLDO, J. T.; BROETTO, L.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Comparative Genome Analysis of Proteases, Oligopeptide Uptake and Secretion Systems in *Mycoplasma* spp. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 225-29, 2007.

TAKAHASHI, S. Y.; YAMAMOTO, Y.; SHIONOYA, Y.; KAGEYAMA, T. Cysteine proteinase from the eggs of the silkmoth, *Bombyx-mori* - identification of a latent enzyme and characterization of activation and proteolytic processing in-vivo and in-vitro. **Journal of Biochemistry**, v. 114, n. 2, p. 267-72, 1993.

TAKAYA, N.; YAMAZAKI, D.; HORIUCHI, H.; OHTA, A.; TAKAGI, M. Cloning and Characterization of a Chitinase-encoding Gene (*chiA*) from *Aspergillus nidulans*, Disruption of Which Decreases Germination Frequency and Hyphal Growth. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n. 1, p. 60-65, 1998.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparitive Biochemistry and Physiology**, v. 109B, p. 1-62, 1994.

TINSLEY, T. W.; KELLY, D. C. Taxonomy and nonmenclature of insect pathogenic viruses. In: Maramorosch, K. e Sherman, K. E. (Ed.). **Insecticides for Biological Control**. Orlando: Academic Press, 1985.

TRUDEL, J.; AUDY, P.; ASSELIN, A. Electrophoretic form of chitinase activity in Xanthi-nc Tobacco, healthy and infected with Tobacco Mosaic Virus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 2, n. 6, p. 315-24, 1989.

TURNISPEED, G. S.; KOGAN, M. Ecology and Management of soybean arthropods. **Annual Review of Entomology**, v. 32, p. 507-38, 1987.

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

VERMELHO, A. B.; SIMONE, S. G.; LEVY, C. M. D.; SANTOS, A. L. S.; DE MELO, A. C. N.; SILVA JR, F. P.; BON, E. P.; BRANQUINHA, M. H. Trypanosomatidae peptidases: a target for drugs development. **Current Enzyme Inhibition**, v. 3, n. 1, p. 19-46, 2007.

VOLKMAN, L. E.; HOM, G. *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus chiA Is required for processing of V-CATH. **Virology**, v. 277, n. 1, p. 178-83, 2000.

VOLKMAN, L. E.; KEDDIE, B. A. Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis. **Seminars in Virology**, v. 1, p. 249-56, 1990.

WANG, F.; ZHANG, X. C.; KUMAR, S. V.; WU, F. X. Influences of chitinase gene deletion from BmNPV on the cell lysis and host liquefaction. **Archives of Virology**, v. 150, n. 5, p. 981-90, 2005.

WANG, P.; HAMMER, D. A.; GRANADOS, R. R. Interaction of *Trichoplusia ni* granulosis virus-encoded enhancin with the midgut epithelium and peritrophic membrane of four lepidopteran insects. **Journal of General Virology**, v. 75, n. 8, p. 1961-967, 1994.

WANG, X.; OOI, B. G.; MILLER, L. K. Baculovirus vectors for multiple gene expression and for occluded virus production. **Gene**, v. 100, p. 131-37, 1991.

WASHBURN, J. O.; TRUDEAU, D.; WONG, J. F.; VOLKMAN, L. E. Early pathogenesis of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus and *Helicoverpa zea* single nucleopolyhedrovirus in *Heliothis virescens*: a comparison of the 'M' and 'S' strategies for establishing fatal infection. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 2, p. 343-51, 2003.

WELZEL, A. **Baculovírus recombinante contendo genes de proteases são mais virulentos contra *Spodoptera frugiperda***. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências da Saúde - Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

WELZEL, A. **Patologia dos baculovírus: Efeito da ação de enzimas heterólogas e análise da resposta transcricional do hospedeiro durante a infecção viral**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências da Saúde – Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

WILLIAMS, G. V.; FAULKNER, P. Cytological changes and viral morphogenesis during Baculovirus infection. In: MILLER, L. K. (Ed.). **The baculoviruses**. New York: Plenum Press, 1997.

WINSTANLEY, D.; CROOK, N. E. Replication of *Cydia-pomonella* granulosis-virus in cell cultures. **Journal of General Virology**, v. 74, n. 8, p. 1599-609, 1993.

XU, B.; YOO, S.; GUARINO, L. A.; 2912-2917., J. O. V. Differential transcription of baculovirus late and very late promoters: fractionation of nuclear extracts by phosphocellulose chromatography. **Journal of Virology**, v. 69, n. 5, p. 2912-917, 1995.

YANG, J.; TIAN, B.; LIANG, L.; ZHANG, K. Q. Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 1, p. 21-31, 2007.

YARYGIN, D. V.; KLUNOVA, S. M.; FILIPPOVICH, Y. B. Isolation, purification, and properties of cysteine proteinase from *Bombyx mori* L. eggs. **Biochemistry (Moscow)**, v. 68, n. 1, p. 63-67, 2003.

ZANOTTO, P. M. A.; KESSING, B. D.; E., M. J. Phylogenetic interrelationships among baculoviruses – evolutionary rates and host associations. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 62, n. 2, p. 1147-164, 1993.

ZHENG, Y.; ZHENG, S.; CHENG, X.; LADD, T.; LINGOHR, E. J.; KRELL, P. J.; ARIF, B. M.; RETNAKARAN, A.; FENG, Q. A molt-associated chitinase cDNA from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, n. 12, p. 1813-823, 2002.

ZHENG, Y. P.; RETNAKARAN, A.; KRELL, P. J.; ARIF, B. M.; PRIMAVERA, M.; FENG, Q. L. Temporal, spatial and induced expression of chitinase in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, n. 3, p.241-47, 2003.

ANEXOS

Anexo I – Artigo submetido à revista Plos One

Lima AA; Silva-Aragão CW, Castro MEB, Oliveira JVC, Sosa-Gómez DR, Ribeiro BM (2013) A recombinant *Anticarsia gemmatalis* MNPV harboring *chiA* and *v-cath* genes from *Choristoneura fumiferana* defective NPV induce host liquefaction and increased insecticidal activity. **Plos one.**

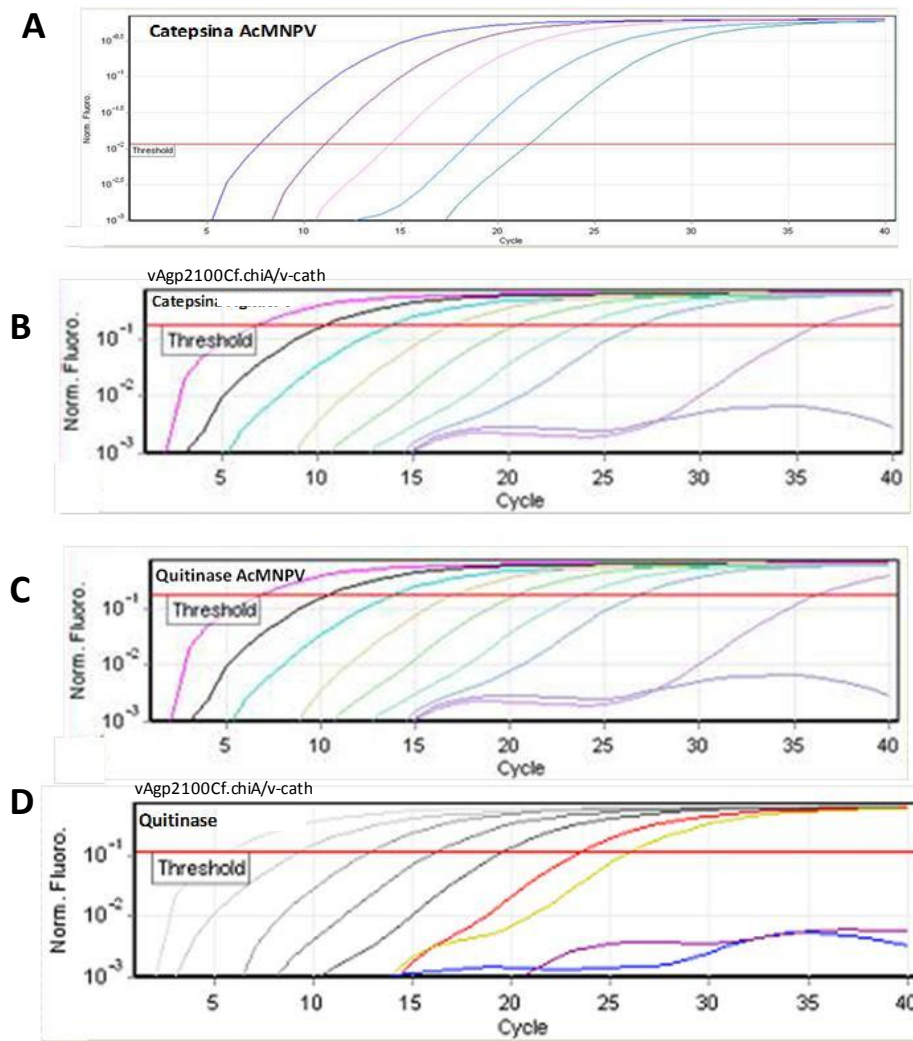
Anexo II - Gráficos preparados para os ensaios de qRT-PCR:

Figura AII.1: Curvas de amplificação de cada diluição seriada dos gene *chiA* e *v-cath*. O eixo X representa às diluições e o eixo Y a fluorescência das amostras. Quanto menor a diluição menor o número de ciclos necessários para detectar a amplificação dos genes. (A e B) Os gráficos correspondem as curvas de amplificação para o gene *v-cath* dos vírus AcMNPV e do recombinante vAgp2100Cf.chiA/v-cath, respectivamente. (C e D) Os gráficos correspondem as curvas de amplificação para o gene *chiA* dos vírus AcMNPV e do recombinante vAgp2100Cf.chiA/v-cath, respectivamente.

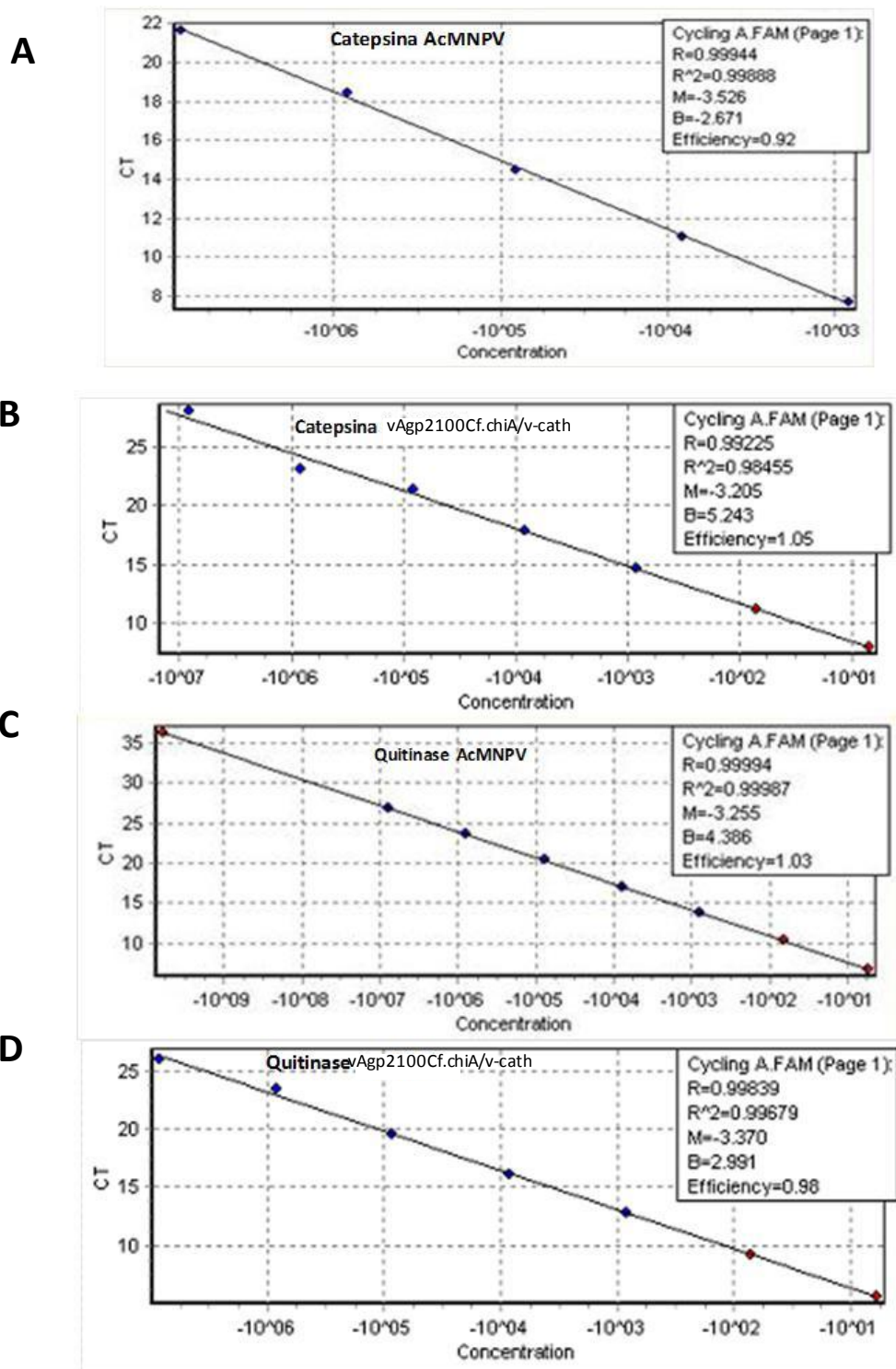


Figura AII.1: Curvas padrão para os genes *chiA* e *v-cath*. As curvas foram construídas a partir da concentração inicial das diluições do produto de PCR (eixo X) e a eficiência de amplificação necessária para a detecção da amplificação de cada diluição seriada (eixo Y). (A e B) Os gráficos correspondem as curvas padrão para o gene *v-cath* dos vírus AcMNPV e do recombinante vAgp2100Cf.chiA/v-cath, respectivamente. (C e D) Os gráficos correspondem as curvas padrão para o gene *chiA* dos vírus AcMNPV e do recombinante vAgp2100Cf.chiA/v-cath, respectivamente.

Anexo III - Sequenciamento do plasmídeo pDEST.chiA:

+1	Xxx	Xxx	Xxx	Phe	Ile	Xxx	Xxx	Met	Phe	Cys	Leu	Ser	Thr	Xxx	Ser	Xxx	Asp	Ile	His	Met	Ser	Tyr	Tyr	His	His	His	His	His
1	NNN	NNN	NNN	TTT	ATT	NNN	NNN	ATG	TTT	TGC	CTG	AGC	ACC	NNN	AGC	NNN	GAT	ATT	CAT	ATG	AGC	TAT	TAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT
+1	Lys	Lys	Ala	Gly	Phe	Met	Val	His	Tyr	Leu	Val	Lys	Val	Leu	Trp	Leu	Thr	Ile	Ala	Val	Ala	Tyr	Ala	Ser	Pro	Gly	Thr	Pro
109	AAA	AAA	GCG	GGC	TTT	ATG	GTG	CAT	TAT	CTG	GTG	AAA	GTG	CTG	TGG	CTG	ACC	ATT	GCG	GTG	GCG	TAT	GCG	AGC	CCG	GGC	ACC	CCG
+1	Tyr	Ala	Leu	Val	Lys	Ile	Asn	Ser	Asp	Ala	Thr	Ala	Tyr	Glu	Asn	Leu	Ile	Gln	Arg	Glu	Asn	His	Val	Asn	Val	Gln	Val	Ser
217	TAT	GCG	CTG	GTG	AAA	ATT	AAC	AGC	GAT	GCG	ACC	GCG	TAT	GAA	AAC	CTG	ATT	CAG	CGC	GAA	AAC	CAT	GTG	AAC	GTG	CAG	GTG	AGC
+1	Gly	Asp	Met	Ala	Tyr	Val	Leu	Phe	Asn	Asp	Lys	Gln	Val	Trp	Lys	Gly	Asp	Ala	Asp	Ala	Lys	Lys	Ala	Thr	Val	Val	Val	Ser
325	GGC	GAT	ATG	GCG	TAT	GTG	CTG	TTT	AAC	GAT	AAA	CAG	GTG	TGG	AAA	GGC	GAT	GCG	GAT	GCG	AAA	AAA	GCG	ACC	GTG	GTG	GTG	AGC
+1	Val	Lys	Val	Cys	Asp	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Val	Ser	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Lys	Val	Ala	Asp	Thr	Asp	Gly	Gly	His	Leu	Asn
433	GTG	AAA	GTG	TGC	GAT	GAA	GAT	GGC	TGC	AGC	GTG	AGC	GAA	CCG	GTG	ACC	GTG	AAA	GTG	GCG	GAT	ACC	GAT	GGC	GGC	CAT	CTG	AAC
+1	Asn	Asn	Lys	Pro	Gly	Arg	Arg	Gln	Asp	Lys	Thr	Ile	Ala	Ala	Tyr	Phe	Val	Glu	Trp	Gly	Val	Tyr	Gly	Arg	Asn	Phe	Pro	Val
541	AAC	AAC	AAA	CCG	GGC	CGC	CGC	CAG	GAT	AAA	ACC	ATT	GCG	GCG	TAT	TTT	GTG	GAA	TGG	GGC	GTG	TAT	GGC	CGC	AAC	TTT	CCG	GTG
+1	Ser	His	Leu	Leu	Tyr	Gly	Phe	Ile	Pro	Ile	Cys	Gly	Gly	Asp	Gly	Leu	Asn	Asp	Ala	Leu	Lys	Thr	Ile	Pro	Gly	Ser	Phe	Glu
649	AGC	CAT	CTG	CTG	TAT	GGC	TTT	ATT	CCG	ATT	TGC	GGC	GGC	GAT	GGC	CTG	AAC	GAT	GCG	CTG	AAA	ACC	ATT	CCG	GGC	AGC	TTT	GAA
+1	Arg	Ser	Asp	Phe	Lys	Val	Ala	Ile	His	Asp	Pro	Trp	Ala	Ala	Ile	Gln	Lys	Pro	Gln	Lys	Gly	Val	Ser	Ala	Trp	Asn	Glu	Pro
757	CGC	AGC	GAT	TTT	AAA	GTG	GCG	ATT	CAT	GAT	CCG	TGG	GCG	GCG	ATT	CAG	AAA	CCG	CAG	AAA	GGC	GTG	AGC	GCG	TGG	AAC	GAA	CCG
+1	Met	Ala	Ala	Lys	Leu	Ala	Asn	Pro	His	Leu	Lys	Ile	Leu	Pro	Ser	Ile	Gly	Gly	Trp	Thr	Leu	Ser	Asp	Pro	Phe	Tyr	Tyr	Met
865	ATG	GCG	GCG	AAA	CTG	GCG	AAC	CCG	CAT	CTG	AAA	ATT	CTG	CCG	AGC	ATT	GGC	GGC	TGG	ACC	CTG	AGC	GAT	CCG	TTT	TAT	TAT	ATG
+1	Phe	Val	Asp	Ser	Val	Lys	Glu	Phe	Leu	Gln	Val	Trp	Lys	Phe	Phe	Asp	Gly	***	Thr	Ser	Ile	Gly						
973	TTT	GTG	GAT	AGC	GTG	AAA	GAA	TTT	CTG	CAG	GTG	TGG	AAA	TTT	TTT	GAT	GGC	TAA	ACC	AGC	ATT	GGC						

Figura AIII.1: Parte da sequência do plasmídeo pDEST.chiA. Após o sequenciamento do plasmídeo pDEST.chiA verificou-se a alteração de uma base nucleotídica que resultou num códon de terminação (TAA), grifado em vermelho.

Anexo IV – Quantidade de OB/g em larvas de *A. gemmatalis* no início do terceiro ínstar, infectadas com os baculovírus AgMNPV-LDB80, AgMNPV-2D e com o vírus recombinante vAgp2100Cf.chiA/v-cath por bioensaios.

Tabela IV.1: Dados obtidos a partir dos bioensaios feitos com larvas de *A. gemmatalis* em relação a produção de corpos de oclusão obtidos com os respectivos vírus.

		AgMNPV – LD80	AgMNPV – Bras.	AgMNPV – AgCf
CONCENTRAÇÃO (cpi/ml de dieta)		cpi/g	cpi/g	cpi/g
20	R1	6,35 x 10 ⁹	7,60 x 10 ⁹	8,94 x 10 ⁹
20	R2	8,13 x 10 ⁹	-----	7,92 x 10 ⁹
20	R3	-----	-----	-----
60	R1	6,90 x 10 ⁹	7,09 x 10 ⁹	8,12 x 10 ⁹
60	R2	9,20 x 10 ⁹	4,30 x 10 ⁹	10,68 x 10 ⁹
60	R3	8,01 x 10 ⁹	-----	8,65 x 10 ⁹
180	R1	10,62 x 10 ⁹	7,25 x 10 ⁹	10,37 x 10 ⁹
180	R2	14,90 x 10 ⁹	12,72 x 10 ⁹	15,08 x 10 ⁹
180	R3	10,62 x 10 ⁹	10,59 x 10 ⁹	15,60 x 10 ⁹
540	R1	10,21 x 10 ⁹	10,23 x 10 ⁹	11,93 x 10 ⁹
540	R2	8,07 x 10 ⁹	9,93 x 10 ⁹	12,50 x 10 ⁹
540	R3	10,41 x 10 ⁹	8,27 x 10 ⁹	13,80 x 10 ⁹
1600	R1	10,13 x 10 ⁹	14,65 x 10 ⁹	18,41 x 10 ⁹
1600	R2	8,50 x 10 ⁹	10,70 x 10 ⁹	12,28 x 10 ⁹
1600	R3	10,70 x 10 ⁹	8,80 x 10 ⁹	11,72 x 10 ⁹
4860	R1	11,59 x 10 ⁹	13,58 x 10 ⁹	16,29 x 10 ⁹
4860	R2	8,15 x 10 ⁹	13,22 x 10 ⁹	11,37 x 10 ⁹
4860	R3	12,12 x 10 ⁹	9,75 x 10 ⁹	11,59 x 10 ⁹