



Universidade de Brasília – UnB  
Instituto de Biologia – IB  
Departamento de Biologia Celular – CEL  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Análise funcional de glicoproteínas de envelope de vírus do  
gênero Thogotovirus e sua relação evolutiva com a família  
*Baculoviridae***

Bruno Milhomem Pilati Rodrigues

Brasília – DF

Fevereiro/2025



Universidade de Brasília – UnB  
Instituto de Biologia – IB  
Departamento de Biologia Celular – CEL  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Análise funcional de glicoproteínas de envelope de vírus do  
gênero *Thogotovirus* e sua relação evolutiva com a família  
*Baculoviridae***

**Autor:** Bruno Milhomem Pilati Rodrigues

**Orientador:** Bergmann Morais Ribeiro

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) da Universidade de Brasília como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

Brasília – DF

Fevereiro/2025

## Resumo

Baculovírus são vírus que infectam insetos e são amplamente utilizados como agentes de controle biológico de pragas agrícolas importantes, assim como ferramentas biotecnológicas. Dentro da família, o gênero *Alphabaculovirus* infecta lepidópteros e é subdividido em Grupo I e Grupo II. Cada grupo possui uma proteína de superfície de envelope de fusão principal, GP64 e proteína F, respectivamente, essenciais para entrada em células e para eficiente brotamento de vírions. Interessantemente, GP64 compartilha semelhança estrutural e de sequência com a glicoproteína de envelope (GP) de vírus do gênero *Thogotovirus*, que infectam carrapatos e mosquitos e pertencente à distante família *Orthomyxoviridae*. Esta similaridade sugere fortemente que o gene *gp64* de baculovírus foi adquirido por transferência horizontal de genes (HGT) de um ancestral orthomyxovírus. Para explorar esta conexão, neste trabalho, foi substituído o gene *gp64* do baculovírus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) pela GP de dois orthomyxovírus: *Apis thogotovirus* 1, proveniente de abelhas sequenciado em nosso laboratório, e *Melitaea didyma thogotovirus* 1, um possível novo thogotovirus identificado neste trabalho em banco de dados de sequenciamento. Experimentos *in vitro* de passagem viral em série em cultura, titulação viral, western blot e qPCR, demonstraram que a GP de *Apis thogotovirus* 1 efetivamente resgatou a infectividade do AcMNPV em linhagens de células de lepidópteros. Esta proteína é capaz de induzir fusão de membranas, confirmado por ensaio de formação de sincícios sensível a pH. Análises ultraestruturais por criomicroscopia eletrônica indicam sua menor incorporação a envelopes virais. Além disso, ensaios de fluorimetria e citometria de fluxo revelaram que esta GP aumentou significativamente a entrada e a transdução de gênica de AcMNPV em linhagens de células de mosquito. A partir de análise no banco de dados *Sequence Read Archive* (SRA), caracterizamos o genoma e construímos a filogenia de um novo thogotovirus, do inseto lepidóptero *Melitaea didyma*, hospedeiro filogeneticamente mais próximo ao hospedeiro natural de baculovírus já identificado. Sua filogenia baseada em GP o agrupa com o *gp64* do baculovírus, entretanto sua GP não foi capaz de restaurar a infectividade do AcMNPV na ausência de *gp64*. Sendo assim, este trabalho ajuda a elucidar a complexa história evolutiva da *gp64* e aponta novas aplicações biotecnológicas para a utilização de GPs de thogotovirus.

**Palavras-chave:** baculovírus, thogotovirus, transferência horizontal de genes, proteína de fusão de envelope, *gp64*

## Abstract

Baculoviruses are viruses that infect insects and are widely used as biological control agents for major agricultural pests, as well as biotechnological tools. Within this family, the *Alphabaculovirus* genus infects lepidopterans, and is subdivided into Group I and Group II. Each group has a main envelope fusion protein, GP64 and F protein, respectively, which are essential for cell entry and efficient virus budding. Interestingly, GP64 shares structural and sequence similarity with the envelope glycoprotein (GP) of viruses from the *Thogotovirus* genus, which infect ticks and mosquitoes and belong to the distant *Orthomyxoviridae* family. This similarity strongly suggests that the *gp64* gene in baculoviruses was acquired through horizontal gene transfer (HGT) from an ancestral orthomyxovirus. To explore this connection, in this study, the *gp64* gene of the baculovirus *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) was replaced with the GP from two orthomyxoviruses: *Apis thogotovirus* 1, a virus from bees sequenced in our laboratory, and *Melitaea didyma* thogotovirus 1, a potential new thogotovirus identified in this study through sequencing database analysis. In vitro experiments, including serial viral passage in culture, viral titration, western blot, and qPCR, demonstrated that the GP from *Apis thogotovirus* 1 effectively rescued AcMNPV infectivity in lepidopteran cell lines. This protein is capable of inducing membrane fusion, as confirmed by a pH-sensitive syncytium formation assay. Cryo-electron microscopy ultrastructural analyses indicated its lower incorporation into viral envelopes. Additionally, fluorimetry and flow cytometry assays revealed that this GP significantly enhanced AcMNPV entry and gene transduction in mosquito cell lines. From the analysis of the Sequence Read Archive (SRA) database, we characterized the genome and constructed the phylogeny of a new thogotovirus from the lepidopteran insect *Melitaea didyma*, a host phylogenetically closest to the natural baculovirus host identified so far. Its GP-based phylogeny clusters it with baculovirus *gp64*; however, its GP was unable to restore AcMNPV infectivity in the absence of *gp64*. This study contributes to elucidating the complex evolutionary history of *gp64* and highlights new biotechnological applications for the use of thogotovirus GPs.

**Keywords:** baculovirus, thogotovirus, horizontal gene transfer, envelope fusion protein, *gp64*

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, minha mais profunda gratidão à toda minha família, cujo apoio foi essencial ao longo desta jornada. À minha mãe, Arlete, ao meu pai, Raul, ao meu irmão, Lucas, a minha namorada Karen, obrigado pelo amor incondicional, pelos conselhos sempre sábios e pela compreensão em todos os momentos. Pelo o amor em aceitar minhas limitações e acolhimento em todos os momentos. Espero conseguir retribuir o privilégio que é tê-los comigo.

Aos meus amigos e amigas, que sempre estiveram presentes e que ocupam um lugar especial na minha vida, sou imensamente grato. Ter vocês ao meu lado, mesmo que alguns à distância, faz a vida valer a pena. Espero um dia poder retribuir todo o carinho e os anos de amizade que compartilhamos.

Aos meus amigos do grupo de baculovírus da UnB, sou muito grato por cada troca de conhecimento, pelas sugestões valiosas e pela disposição constante em ajudar. Após tantos anos de companheirismo vocês ajudaram a formar a pessoa que sou. Ao meu amigo e colaborador Luís, pelo incentivo, confiança e cuidado que tornou este trabalho possível. Trabalhar ao lado de profissionais e seres humanos tão incríveis foi um privilégio.

Ao meu orientador, Bergmann Morais Ribeiro, um profissional exemplar, minha eterna gratidão pela confiança depositada em mim e no meu trabalho, pela compreensão e humanidade, pela capacidade de tranquilizar nos momentos de incerteza. Agradeço pelo exemplo de vida e profissionalismo.

Por fim, agradeço à Universidade de Brasília ao CNPq pelo privilégio de poder realizar este trabalho. Ao CNPEM e o Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) pelo apoio na execução do projeto e por demonstrar o potencial da ciência nacional em toda sua beleza.

*Life is a process, not a substance, and it is necessarily temporary.  
We are not the reason for the existence of the universe,  
but our ability for self-awareness and reflection makes us special within it.*

Sean Carroll - The Big Picture

## Sumário

Resumo .....	3
Lista de abreviatura e siglas .....	9
Lista de tabelas .....	18
<b>1. Introdução.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1 Baculovírus: biologia e ciclo replicativo .....</b>	<b>19</b>
<b>1.2 Baculovírus: classificação.....</b>	<b>22</b>
<b>1.3 Thogotovirus.....</b>	<b>23</b>
<b>1.4 A proteína GP64 e proteínas de fusão de envelope.....</b>	<b>25</b>
<b>2. Justificativa .....</b>	<b>29</b>
<b>3. Objetivos .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>30</b>
<b>4. Materiais e Métodos .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1 Linhagens celulares.....</b>	<b>30</b>
<b>4.2 Análises bioinformáticas do thogotovirus de lepidoptera .....</b>	<b>30</b>
<b>4.3 Análise Filodinâmica .....</b>	<b>32</b>
<b>4.4 Clonagem molecular e construção de baculovírus recombinantes.....</b>	<b>32</b>
<b>4.5 Ensaios de transfecção e infecção .....</b>	<b>37</b>
<b>4.6 Análise de expressão de proteínas .....</b>	<b>38</b>
<b>4.7 Atividade fusogênica induzida por pH.....</b>	<b>39</b>
<b>4.8 Análise de cinética de crescimento viral por qPCR.....</b>	<b>39</b>
<b>4.9 Fluorimetria de transdução em células de mosquito.....</b>	<b>40</b>
<b>4.10 Citometria de fluxo de transdução em células de mosquito.....</b>	<b>40</b>
<b>4.11 Análise ultraestrutural por Criomicroscopia eletrônica (Cryo-EM).....</b>	<b>40</b>
<b>5. Resultados e discussão .....</b>	<b>41</b>

<b>5.1</b>	<b>Melitaea didyma thogotovirus 1 (MediTHOV-1), um possível novo thogothovírus de lepidóptera .....</b>	<b>41</b>
<b>5.3</b>	<b>Clonagem molecular e construção de baculovírus recombinantes.....</b>	<b>48</b>
<b>5.4</b>	<b>A EFP de MediTHOV-1 não é capaz de recuperar infectividade de AcMNPV <i>gp64 null</i> .....</b>	<b>51</b>
<b>5.5</b>	<b>A proteína de fusão de envelope de Apis thogotovirus 1 é capaz de resgatar a infectividade de AcMNPV <i>gp64 null</i> .....</b>	<b>56</b>
<b>5.6</b>	<b>Ensaio de fusão mediado por pH.....</b>	<b>59</b>
<b>5.7</b>	<b>Análise da expressão de proteínas por Western blot.....</b>	<b>60</b>
<b>5.8</b>	<b>Cinética de replicação viral por qPCR .....</b>	<b>61</b>
<b>5.9</b>	<b>Transdução em linhagens celulares de mosquito.....</b>	<b>62</b>
<b>5.10</b>	<b>Análise ultraestrutural por criomicroscopia eletrônica .....</b>	<b>67</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>71</b>
<b>7.</b>	<b>Referências.....</b>	<b>72</b>
	<b>Anexos.....</b>	<b>79</b>

## Lista de abreviatura e siglas

Aag2 - linhagem celular derivada de *Aedes aegypti*

AcMNPV - *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*, *Alphabaculovirus aocalifornicae*

Ac-ATHOVGP $gp64^-$  - Vírus AcMNPV recombinante contendo o gene codificante da EFP de ATHOV-1 e deletado para o gene *gp64*

Ac-ATHOVGP $gp64^+$  - Vírus AcMNPV recombinante contendo o gene codificante da EFP de ATHOV-1 contendo também o gene *gp64*

Ac-MevidGP $gp64^-$  - Vírus AcMNPV recombinante contendo o gene codificante da EFP de MediTHOV-1 e deletado para o gene *gp64*

Ac-MevidGP $gp64^+$  - Vírus AcMNPV recombinante contendo o gene codificante da EFP de MediTHOV-1 contendo também o gene *gp64*

ATHOV-1 - *Apis thogotovirus 1*

BLASTx - *Basic Local Alignment Search Tool*, pesquisa nucleotídeos em um banco de dados de proteínas

BOUV - *Thogotovirus bourbonense*, também conhecido como vírus Bourbon

BmNPV - *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*, *Alphabaculovirus bomori*

BSA – albumina sérica bovina

BV – vírus brotado (*budded virus*)

CHO - célula de ovário de hamster chinês (*chinese hamster ovary*)

C6/36 - linhagem celular derivada de *Aedes albopictus*

DHOV - *Thogotovirus dhorienne*, também conhecido como Thogotovirus Dhor

dsDNA - DNA de fita dupla (*double stranded DNA*)

dpi - dias pós infecção

dpt - dias pós transfecção

EFP - proteína de fusão de envelope (*envelope fusion protein*)

eGFP - proteína verde fluorescente modificada (*enhanced green fluorescent protein*)

ESS - Tamanho Efetivo da Amostra

FBS - soro bovino fetal (*fetal bovine serum*)

$g$  - força de aceleração gravitacional

GP - glicoproteína de envelope

GP64 - principal proteína de fusão de envelope de alphabaculovirus do grupo I

*gp64* - gene codificador da proteína GP64

G1- $\alpha$  – alphabaculovirus do grupo I

G2- $\alpha$  - alphabaculovirus do grupo II

HGT - transferência horizontal de genes (do inglês *horizontal gene transfer*)

HPD – sensibilidade posterior mais alta (*highest posterior density*) método de estimativa de intervalo de confiança

hpi - horas pós infecção

ICTV - Comitê Internacional para Taxonomia de Vírus

IE1 - *Immediate early protein IE1*

MCC - Credibilidade Máxima de Clados

MCMC - Cadeia de Markov Monte Carlo

ML - Proteína ML

MOI - multiplicidade de infecção

MediTHOV-1 - *Melitaea didyma thogotovirus 1*

NBT/BCIP - 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium

NP - Nucleoproteína

OB - corpo de oclusão (*occlusion body*)

ODV - vírus derivado de oclusão (*occlusion-derived virus*)

OZV - *Thogotovirus ozense*, também conhecido como Oz vírus

PA - Proteína polimerase ácida

PCR - reação em cadeia da polimerase

P0 - sobrenadante de cultura de células transfectadas, passagem 0

P1 – sobrenadante de cultura de células infectadas com P0, passagem 1

P2 – sobrenadante de cultura de células infectadas com P1, passagem 2

pFB-Acgp64-pA-PG – plasmídeo vetor para clonagem sob controle do promotor gp64 contendo gene repórter eGFP e poliedrina.

pFB-ATHOVGP - Plasmídeo contendo gene codificante da EFP de ATHOV-1

pFB-MevidGP - Plasmídeo contendo gene codificante da EFP de MedivTHOV-1

pH - potencial hidrogeniônico

pb - pares de bases

PB1 - Proteína polimerase básica 1

PB2 - Proteína polimerase básica 2

PBS - solução salina tamponada com fosfato

PVDF - fluoreto de polivinilideno

qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RdRp - RNA polimerase dependente de RNA

RNA-seq - sequenciamento de RNA

RMP - rotações por minuto

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

Sf-21 – linhagem celular derivada do lepidóptero *Spodoptera frugiperda*

Sf9-ET - linhagem celular derivada da linhagem Sf9, expressa gene repórter eGFP quando infectada por baculovírus

SINUV - *Thogotovirus sinuense*, também conhecido como vírus Sinu

-ssRNA - RNA fita simples senso negativo

SRA - *Sequence Read Archive*

TCID50 - dose infecciosa mediana de 50% de cultura de tecidos (*median tissue culture infectious dose*)

TC-100 - meio de cultura celular utilizado para cultura de células de inseto

THOV - *Thogotovirus thogotoense*, também conhecido como Thogotovirus thogoto

Tn5B - linhagem celular de lepidóptera derivada de *Trichoplusia ni*

U4.4 - linhagem celular derivada de *Aedes albopictus*

UPGMA - *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages*

## Lista de Figuras

**Figura 1.** Representação esquemática de partículas virais de baculovírus (superior) e micrografias eletrônicas de transmissão de respectivos fenótipos virais (inferior). Micrografias de ODV e nucleocapsídeo (inferior à esquerda) do vírus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) e BVs de *Lymantria dispar multiple nucleopolyhedrovirus* (inferior ao centro) e de *Spodoptera exigua multiple nucleopolyhedrovirus* (inferior à direita). Adaptado de: (HARRISON et al., 2018). .... 20

**Figura 2.** Esquema representando ciclo infeccioso de baculovirus. (A) os corpos de oclusão (OBs) contendo os vírus derivados de oclusão (ODVs) são ingeridos por lagartas a partir material vegetal contaminado. (B) no intestino médio do animal, os OBs são dissolvidos em condições de pH alcalino e os ODVs são liberados. ODVs ultrapassam a membrana peritrófica, que reveste o lúmen intestinal, e iniciam a infecção primária de células epiteliais. O vírus inicia sua replicação nuclear e produz partículas no seu fenótipo de vírus brotado (BV). (C) BVs promovem a infecção secundária de células de diversos tecidos animais (e. g. células de gordura, musculares e hemócitos). Células infectadas produzem grandes quantidades de BVs que acarretam a infecção sistêmica do indivíduo. (D) são produzidos ODVs no núcleo de células infectadas, que por sua vez são inclusos em matriz proteica formando OBs, posteriormente liberados. Figura criada com auxílio da ferramenta BioRender.com..... 21

**Figura 3.** Árvore filogenética indicando os gêneros da família *Baculoviridae*. Em destaque a principal proteína de fusão de envelope (EFP) encontrada em cada clado, e a ordem de inseto na qual cada gênero é encontrado. Adaptado de: (RIBEIRO et al., 2015). ..... 22

Thogotovirus possuem genomas segmentados, compostos por seis segmentos de RNA fita simples senso negativo (-ssRNA), sendo suas partículas virais envelopadas, com morfologia geralmente arredondada, mas podendo possuir forma filamentosa (Fig. 4).

**Figura 4.** Esquematização da morfologia da partícula viral de um thogotovirus assim como dos segmentos que compõe seu genoma e as proteínas que codificam. Adaptado de: <https://viralzone.expasy.org/79>, acesso em 28/01/23. .... 24

**Figura 5. A)** Comparação entre as estruturas tridimensionais das glicoproteínas de fusão de envelope GP64 de AcMNPV (PDB: 3DUZ) e de Thogotovirus dhoriense (PDB: 5XEB), ambas estruturas em conformação pós-fusão. Cadeias individuais que compõe os homotrímeros estão em diferentes cores. Gerado usando UCSF ChimeraX versão: 1.6.1.

<b>B)</b> Grau de identidade de aminoácidos entre glicoproteína GP64 de AcMNPV e representantes do gênero <i>Thogotovirus</i> . Destacado em negrito os dois vírus estudados neste trabalho.....	27
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática do plasmídeo vetor contendo o gene codificante para glicoproteínas de fusão de envelope de thogotovirus, mostrando os genes da poliedrina (retângulo azul), glicoproteína de thogotovírus (retângulo em laranja) e proteína fluorescente verde (retângulo em verde) sob o comando de diferentes promotores (setas em cinza). SV40/pA = sinal de poliadenilação do vírus SV40; His Tag= sequência de 6 histidinas. A localização das enzimas de restrição usadas para a clonagem dos genes de thogotovírus estão indicadas acima da figura. ....	34
<b>Figura 7.</b> Esquema mostrando processo de produção de baculovírus recombinantes utilizando o sistema Bac-to-Bac™. Adaptado de <i>User Guide Bac-to-Bac Baculovirus Expression System</i> , disponível em: <a href="http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/bactobac_man.pdf">http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/bactobac_man.pdf</a> . Acesso em: 27 jul. 2023. ....	35
<b>Figura 8.</b> Esquematização do processo de construção dos baculovírus recombinantes gerados e utilizados no trabalho. Nomes dados aos vírus gerados se encontra abaixo da representação gráfica das partículas virais e sua composição de EFPs. ....	36
<b>Figura 9.</b> Filogenias de máxima verossimilhança das proteínas de <i>Melitaea didyma</i> thogotovirus 1 e membros virais da família Orthomyxoviridae. (A) PB1, (B) PB2, (C) PA, (D) NP, (E) ML, (F) GP.....	43
<b>Figura 10.</b> Dinâmica temporal da evolução de glicoproteínas entre thogotovirus e alphabaculovirus. As barras nos nós representam o intervalo HPD de 95% para a idade, os rótulos dos nós indicam as probabilidades posteriores, e o eixo do tempo está em milhões de anos atrás. Os rótulos dos ramos estão coloridos pelos valores medianos das taxas de substituição. ....	46
<b>Figura 11.</b> Amplificação dos genes das EFPs de thogotovirus. Produtos de PCR em gel de agarose 0,8%, indicando fragmentos obtidos de tamanhos esperados para GP de ATHOV-1 (1572 pb) e MediTHOV-1 (1404 pb) M: Marcador molecular ladder 1 kb (Ludwig). ....	48
<b>Figura 12.</b> Mapa vetor dos plasmídeos vetores gerados. Em destaque as sequências das EFPs de ATHOV-1 (A) e MediTHOV-1 (B) (em laranja), sob o controle do promotor do gene <i>gp64</i> de AcMNPV (em cinza). Gene poliedrina em azul sob o controle de seu	

promotor nativo, e gene repórter eGFP (em verde) sob controle do promotor ie1. Mapa gerado utilizando o *software* Geneious versão 11.1.5 (Biomatters)..... 49

**Figura 13.** Confirmação da clonagem por ensaio de digestão por enzimas de restrição. Mapa vetor dos plasmídeos pFB-ATHOVGP anotado para o sítio de restrição para *BamHI* (A) e plasmídeo pFB-MediTHOVGP (D) anotado para os sítios das enzimas *BglII* e *HindIII*. Simulações do perfil de restrição esperado para reações com as enzimas selecionadas (B e E). Imagens de gel de agarose 0,8% das digestões obtidas dos respectivos plasmídeos com as mesmas enzimas selecionadas (C e F), demonstrando obtenção dos perfis de digestão esperados. M: Marcador molecular ladder 1 kb (Ludwig) Mapas e simulações geradas utilizando o *software* Geneious versão 11.1.5 (Biomatters). ..... 50

**Figura 14.** PCR de colônia de bacmídeos recombinantes contendo EFPs de thogotovirus. Resultado de eletroforese em géis de agarose 0,8% de reações utilizando DNA de colônias de bacmídeos com e sem *gp64*. A) O DNA de 5 colônias *gp64+* e *gp64-* contendo a EFP de ATHOV-1 foram amplificados por PCR utilizando os oligonucleotídeos M13 Forward, M13 Reverse e ApisTHOV\_GP\_NEW\_ApaI FWD. Fragmentos de ~4000 pb representam tamanho esperado para confirmação da transposição sítio específica, enquanto fragmento de amplificação de 300 pb em colônias 1, 3, 4 e 5 representa presença de bacmídeo não transposto. Colônia 2 foi selecionada para subsequente purificação. B) Eletroforese de reações de PCR de 5 colônias de *gp64+* e *gp64-* contendo a EFP de MediTHOV utilizando os oligonucleotídeos M13 Forward, M13 Reverse e MediTHOV\_ApaI FWD. Fragmentos de ~3800 pb esperados para amplificação entre primer específico do gene e M13 Reverse, indicando correta transposição. Foram observados pequenos fragmentos de amplificação inespecífica após duas séries de esgotamento de colônia em placa de Petri..... 51

**Figura 15.** Proteína de fusão de envelope de MediTHOV-1 não é capaz de substituir *gp64* de AcMNPV. Microscopia de fluorescência de células Sf21 7 dias pós transfecção, e 72 hpi da primeira passagem de infecção em série (P1) de Ac-MediTHOVGP*gp64+*, e 7 dpi do vírus Ac-MediTHOVGP*gp64-*. Barra de escala 250 µm. .... 52

**Figura 16.** Predição de peptídeos sinais utilizando SignalP para as glicoproteínas de envelope de (A) ACMNPV, (B) MediTHOV and (C) ATHOV-1 ..... 54

**Figura 17.** Alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos entre GP64 de *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV), *Orgyia pseudotsugata* multiple nucleopolyhedrovirus (OpMNPV), *Thogotovirus thogotoense*

(THOV), <i>Apis thogotovirus 1</i> (ATHOV-1) e <i>Melitaea dydima thogotovirus 1</i> (MediTHOV-1). Aminoácidos coloridos por hidropatia. Resíduo crítico identificado para fusão celular destacado com uma seta.....	55
<b>Figura 15.</b> Proteína de fusão de envelope de ATHOV-1 é capaz de substituir <i>gp64</i> de AcMNPV. Microscopia de fluorescência de células Sf21 7 dias pós transfecção, e 72 hpi de duas passagens de infecção em série (P1 e P2) de Ac-ATHOVGP <i>gp64+</i> , e 7 dpi do vírus Ac-ATHOVGP <i>gp64-</i> . Barra de escala: 125 µm.....	56
<b>Figura 19.</b> Cinética de infecção por Ac-ATHOVGP <i>gp64-</i> . (A) Microscopia de fluorescência e campo claro de células SF21 infectadas expressando o gene repórter eGFP e poliedrina (massas escuras intracelulares, setas azuis) indicando progressão da infecção ao longo do tempo. (B) Células Sf21 8 dpi, círculos pontilhados demarcam regiões de focos de infecção isolados. Barra de escala: 250 µm. ....	57
<b>Figura 20.</b> Títulação de baculovírus recombinantes pseudotipados. (A) Título obtido a partir de transfecção (P0) 7 dpt, e de passagens em série (P1 e P2) em 72 hpi para AcATHOV <i>gp64+</i> e 7 dpi para AcATHOV <i>gp64-</i> . LD: limite de detecção. (B) Títulos obtidos de infecção em Sf21 para inóculos de trabalho para AcATHOV <i>gp64+</i> e AcREP <i>gp64</i> 72 hpi e AcATHOV <i>gp64-</i> 14 dpi. ....	58
<b>Figura 21.</b> GP de ATHOV-1 é capaz de induzir fusão de membrana de células de lepidóptera. Células Sf21 infectadas com vírus controle Ac-REP <i>gp64</i> e pelo vírus Ac-ATHOVGP <i>gp64-</i> após exposição a baixo pH. Sincícios estão indicados por setas brancas. Sobreposição de fluorescência e campo claro demonstra sincícios compostos por células que expressam o gene repórter eGFP. Barra de escala: 125 µm. ....	60
<b>Figura 22.</b> Análise de expressão de proteínas por Western blot. Extrato de células Tn5B infectadas, e vírus brotados concentrados do sobrenadante de cultura (BV) marcados com anticorpos anti-GP64 (A) e anti-6xHisTag (B), indicando a expressão e incorporação de GP heteróloga ao BV.....	61
<b>Figura 23.</b> Curva de crescimento por qPCR. Células Sf21 foram infectadas em diferentes MOIs (1, 10 e 100) e carga viral do sobrenadante de cultura analisado em 5 tempos pós infecção. Quantificação absoluta de vírus controle reparado (A), AcMNPV contendo <i>gp64</i> e GP de ATHOV-1 (B) e vírus com apenas GP de ATHOV-1 (C).....	62
<b>Figura 24.</b> Microscopia de fluorescência de transdução em linhagens celulares de mosquito. Células U4.4 (A), C6/36 (B), Aag2 (C), e Sf21 (D), inoculadas em MOI 5 com vírus Ac-REP <i>gp64</i> e AcATHOVGP <i>gp64+</i> , e não infectadas (Mock) observadas por	

microscopia de campo claro e fluorescência para presença do gene repórter eGFP 48 hpi. Barra de escala: 250 $\mu$ m. ....	64
<b>Figura 25.</b> A EFP de ATHOV-1 aumenta e eficiência de transdução em células de mosquito. Quantidade total de fluorescência emitida pela proteína repórter eGFP de células lisadas foi medida 48 hpi em MOI 5. ....	65
<b>Figura 26.</b> Análise de transdução em células C6/36 por citometria de fluxo. Células foram transduzidas em MOI 5 com vírus indicados e leitura realizada 48 hpi. <b>A)</b> Gráfico de dispersão indicando população de células GFP positivas transduzidas com vírus Ac-REP <i>gp64</i> (9,6 %) e Ac-ATHOVGP <i>gp64+</i> (13,9 %) <b>B)</b> Histograma ressaltando área sob pico de intensidade de GFP, indicando maior intensidade de fluorescência para Ac-ATHOVGP <i>gp64+</i> (8,96) em relação a REP <i>gp64</i> (7,36). ....	66
<b>Figura 27.</b> Comparação por Cryo-EM entre BV de AcMNPV deletado para <i>gp64</i> , resgatado com seu gene <i>gp64</i> nativo (Ac-REP <i>gp64</i> ), e BV com a EFP heteróloga ATHOV-1 (Ac-ATHOV <i>gp64-</i> ). Setas brancas indicam peplômeros visíveis compostos por glicoproteínas do envelope. ....	67
<b>Figura 28.</b> Micrografias de Cryo-EM de vírus brotados Ac-ATHOV <i>gp64-</i> . As setas brancas indicam peplômeros projetados do envelope viral, possivelmente compostos pela EFP de ATHOV-1. O círculo branco tracejado mostra uma partícula viral com nucleocapsídeo em forma relaxada e o círculo preto tracejado indica uma partícula viral envelopada contendo dois nucleocapsídeos. ....	68
<b>Figura 29.</b> Crio elétron micrografias de sobrenadante de cultura infectada com vírus Ac-REP <i>gp64</i> . Setas vermelhas indicam vesículas membranosas com proteínas de superfície protuberantes. ....	69

## **Lista de tabelas**

<b>Tabela 1.</b> Primers utilizados para amplificação de genes codificadores de glicoproteínas de envelope viral. Sequências de anelamento as extremidades 5' e 3' da Open Reading Frame (ORF) dos genes das EFPs estão destacadas em negrito.....	33
<b>Tabela 2.</b> Lista de baculovírus recombinantes gerados e utilizados no trabalho, discriminado suas proteínas de fusão de envelope. ....	36
<b>Tabela 3.</b> Características gerais do genoma de <i>Melitaea didyma thogotovirus 1</i> (MediTHOV-1). Descrição dos segmentos genômicos, incluindo número de segmentos, comprimento de segmentos, comprimento de ORFs, comprimento de UTRs e relações de homologia com <i>Thogotovirus thogotoense</i> . ....	41

## 1. Introdução

### 1.1 Baculovírus: biologia e ciclo replicativo

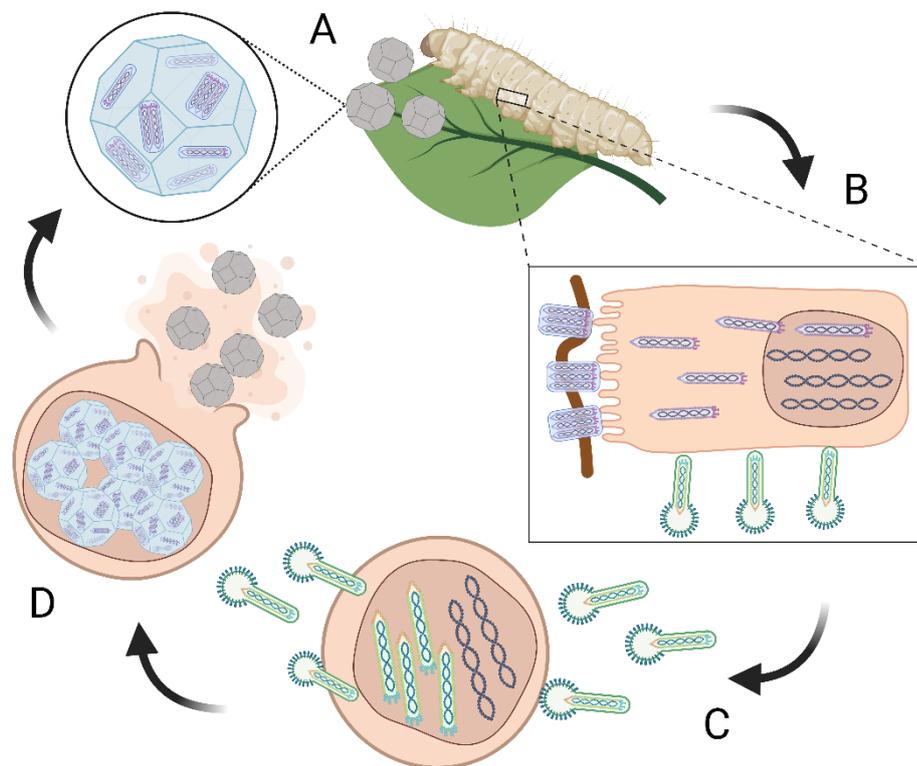
Os baculovírus são vírus de insetos pertencentes à família *Baculoviridae* (VAN OERS et al., 2023). Estes vírus são amplamente utilizados como bioinseticidas para o controle de importantes pragas agrícolas de grande impacto econômico e se consolidaram como ferramentas importantes no controle integrado de pragas (BEAS-CATENA et al., 2014). Seu uso reduz a dependência de pesticidas químicos, contribuindo para mitigação dos impactos ambientais associados aos defensivos agrícolas tradicionais, além de beneficiar a saúde dos trabalhadores rurais (BEAS-CATENA et al., 2014; SREE; VARMA, 2015).

Os avanços em biologia molecular na segunda metade do século XX, aliado ao desenvolvimento de técnicas de cultivo celular, permitiram elucidar aspectos fundamentais da biologia dos baculovírus, incluindo seu ciclo replicativo e suas interações com seus hospedeiros em nível celular e sistêmico (ROHRMANN, 2019a). Esses estudos consolidaram o uso dos baculovírus como ferramentas biotecnológicas, viabilizando a geração de baculovírus recombinantes por meio da inserção de genes de interesse em seu genoma (SUMMERS, 2006). Esses vírus recombinantes são amplamente utilizados na expressão heteróloga de proteínas em células de inseto, na produção de vacinas, na entrega de genes (*gene delivery*), na transdução gênica em linhagens celulares de mamíferos e como vetores para terapia gênica (COX, 2012; FELBERBAUM, 2015; PIDRE et al., 2023). Ademais, sua capacidade de penetrar em células mosquito vem sendo explorada para aplicações em transdução gênica nesses organismos (NAIK et al., 2018).

A família *Baculoviridae* consiste de vírus com grandes genomas de DNA fita dupla (dsDNA) circulares, superenovelados que variam de 80 a 180 mil pares de bases (kbp), e codificam de 80 a 200 genes em potencial (VAN OERS et al., 2023; VAN OERS; VLAK, 2007). A expressão desses genes é regulada temporalmente durante o seu complexo ciclo infeccioso, controlando a produção cronológica de dois fenótipos virais



Os BVs são virions envelopados em formato de bastão, responsáveis pela infecção célula a célula dentro dos tecidos do hospedeiro infectado, além de mediarem a infecção *in vitro*. Já os ODVs, são produzidos nas fases tardias da infecção, e incorporados em matrizes proteicas cristalinas, denominadas corpos de oclusão (OBs, do inglês *occlusion bodies*), compostas principalmente da proteína viral poliedrina. Os OBs funcionam como estruturas de resistência, são ingeridos por insetos em estágio larval e dissolvidos no pH alcalino do intestino médio, liberando os ODVs, que iniciam a infecção nas células do epitélio intestinal (ROHRMANN, 2019b) (Figura 2).



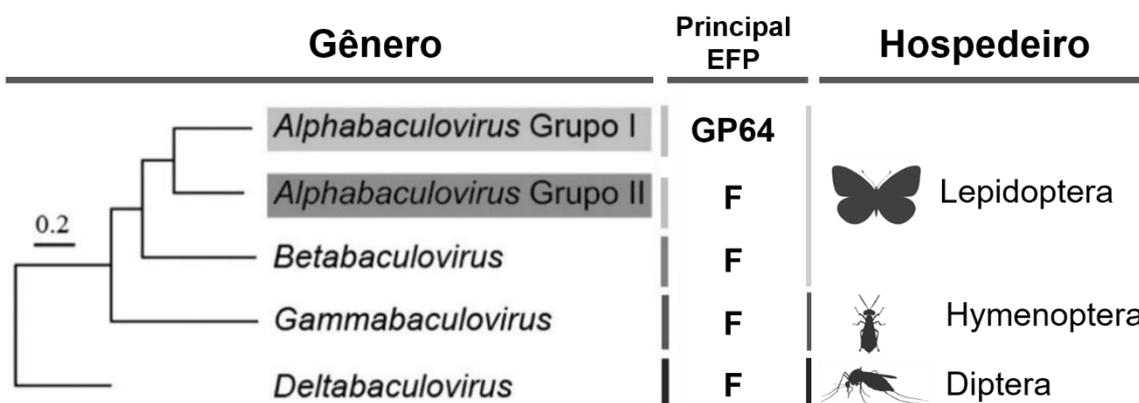
**Figura 2.** Esquema representando ciclo infeccioso de baculovirus. (A) os corpos de oclusão (OBs) contendo os vírus derivados de oclusão (ODVs) são ingeridos por lagartas a partir material vegetal contaminado. (B) no intestino médio do animal, os OBs são dissolvidos em condições de pH alcalino e os ODVs são liberados. ODVs ultrapassam a membrana peritrófica, que reveste o lúmen intestinal, e iniciam a infecção primária de células epiteliais. O vírus inicia sua replicação nuclear e produz partículas no seu fenótipo de vírus brotado (BV). (C) BVs promovem a infecção secundária de células de diversos tecidos animais (e. g. células de gordura, musculares e hemócitos). Células infectadas produzem grandes quantidades de BVs que acarretam a infecção sistêmica do indivíduo. (D) são produzidos ODVs no núcleo de células infectadas, que por sua vez são inclusos

em matriz proteica formando OBs, posteriormente liberados. Figura criada com auxílio da ferramenta BioRender.com.

## 1.2 Baculovírus: classificação

A família *Baculoviridae* apresenta-se dividida em quatro gêneros: *Alphabaculovirus* e *Betabaculovirus* que possuem como hospedeiros insetos da ordem Lepidóptera (mariposas e borboletas), *Deltabaculovirus* que infectam insetos da ordem Díptera (*e.g.* mosquitos) e *Gammabaculovirus*, que infectam insetos da ordem Hymenoptera (*e.g.* vespas, abelhas e formigas) (HARRISON et al., 2018) (figura 3). O gênero *Alphabaculovirus* é o mais estudado dentro da família, com 65 espécies reconhecidas pelo Comitê Internacional para Taxonomia de Vírus (ICTV) (<https://ictv.global/taxonomy>, acessado em 25/08/2023). Dentre essas, a espécie mais amplamente estudada é *Alphabaculovirus aupalifornicae*, também conhecida como *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus - AcMNPV*.

O gênero *Alphabaculovirus* é subdividido em grupo I e grupo II, em grande parte em função de qual é sua principal proteína de fusão de envelope (EFP), encontrada no envelope viral no seu fenótipo BV (ROHRMANN, 2019a). Esta proteína é essencial para infecção célula a célula, sendo responsável pelo eficiente brotamento de virions de células infectadas (OOMENS; BLISSARD, 1999), assim como por sua entrada e infecção de novas células (BLISSARD; THEILMANN, 2018). Membros do grupo I possuem como sua principal EFP a proteína GP64, enquanto no grupo II este papel é desempenhado pela glicoproteína denominada F (WANG et al., 2014) (Figura 3).



**Figura 3.** Árvore filogenética indicando os gêneros da família *Baculoviridae*. Em destaque, a principal proteína de fusão de envelope (EFP) encontrada em cada clado, e a ordem de inseto na qual cada gênero é encontrado. Adaptado de: (RIBEIRO et al., 2015).

O ciclo de infecção celular por baculovírus, no fenótipo BV, inicia-se com o reconhecimento da EFP por receptores de membrana da célula hospedeira, podendo também envolver o auxílio de outras proteínas do envelope viral (WANG et al., 2010). Nos *Alphabaculovirus* do grupo I, a glicoproteína GP64 é essencial nesse processo. Após a ligação, o vírus é internalizado por endocitose mediada por clatrina e transportado através da via endossomal (LONG et al., 2006). *In vitro*, esse processo ocorre tanto em linhagens celulares de lepidópteros, quanto em linhagens de mamíferos, onde também estão envolvidos outros mecanismos de internalização, como macropinocitose, com um papel relevante do colesterol neste processo (KATAOKA et al., 2012). Essa capacidade de entrada permite o uso de baculovírus como vetor de transdução gênica em células não permissivas à sua replicação, ampliando seu potencial para aplicações biotecnológicas (KOST; CONDREAY; JARVIS, 2005).

A acidificação do endossomo induz mudanças conformacionais na EFP, promovendo a fusão entre a membrana endossomal e o envelope viral, ocasionando a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma da célula hospedeira. Esse nucleocapsídeo é então transportado até o núcleo por meio de interações com a proteína actina e internalizado através do complexo de poro nuclear. Uma vez dentro do núcleo, ocorre a sua desencapsidação e a formação do estroma virogênico, uma estrutura especializada onde acontecem a replicação, transcrição, e montagem de novos nucleocapsídeos (MAREK et al., 2011)

Os nucleocapsídeos recém-formados são posteriormente transportados até a membrana plasmática, onde ocorre o brotamento viral e a aquisição do envelope, juntamente com a EFP. Nos *Alphabaculovirus* do grupo I, a eficiência desse processo depende da proteína GP64, cuja ausência resulta na formação de poucas partículas virais, majoritariamente não infecciosas (OOMENS; BLISSARD, 1999).

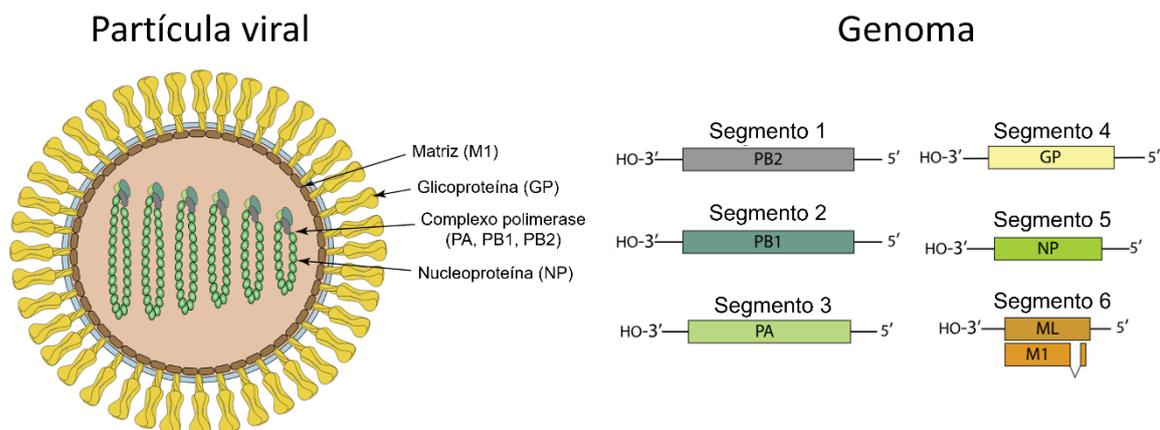
### **1.3 Thogotovirus**

Os vírus do gênero *Thogotovirus* pertencem à família *Orthomyxoviridae*, que inclui patógenos de grande relevância para a saúde humana e veterinária, com significativo impacto econômico e epidemiológico. Essa família é composta por 9 gêneros, entre eles os vírus influenza, responsáveis por surtos sazonais de gripe e por pandemias que, ao longo da história, resultaram em milhões de mortes (HSIEH et al., 2006). Vírus influenza também representam notada relevância veterinária, com esforços

internacionais contínuos de monitoramento e prevenção de eventos de introdução de linhagens animais em populações humanas (SAHA; DAVIS, 2022). Os thogotovirus, por sua vez, são encontrados em sua maioria em artrópodes, especialmente em diferentes espécies de carrapatos, e incluem membros consideradas como arbovírus emergentes, com potencial risco de transmissão para vertebrados.

O primeiro thogotovirus descrito, atualmente denominado *Thogotovirus thogotoense* (THOV), assim como o vírus *Thogotovirus dhorienense* (DHOV), já foram associados a casos de doença febril aguda, encefalite e óbito em humanos (BUTENKO et al., 1987; HAIG; WOODALL; DANSKIN, 1965; MOORE et al., 1975). Mais recentemente, em 2015, *Thogotovirus bourbonense* (BOUV) foi identificado nos Estados Unidos a partir de um caso fatal de infecção humana (KOSOY et al., 2015). Outro vírus filogeneticamente próximo à BOUV, denominado *Thogotovirus ozense* (OZV), foi detectado em carrapatos da espécie *Amblyomma testudinarium* no Japão (EJIRI et al., 2018), e anticorpos contra este vírus foram detectados em animais silvestres e humanos (TRAN et al., 2022). Em 2023, um óbito decorrente de infecção por OZV foi reportado no país (<https://www.niid.go.jp/niid/en/2013-03-15-04-55-59/2629-disease-based/a/ozv/cepr/12134-ozv-eng.html>, acessado em: 31/10/23). Além das infecções humanas, thogotovirus também podem causar doenças em animais domésticos, como ovinos, bovinos e camelos, levando a casos de encefalite e abortos (MOORE et al., 1975). Esses casos reforçam a preocupação com possíveis surtos em humanos e seu impacto econômico.

Thogotovirus possuem genomas segmentados, compostos por seis segmentos de RNA fita simples senso negativo (-ssRNA), sendo suas partículas virais envelopadas, com morfologia geralmente arredondada, mas podendo possuir forma filamentosa (Figura 4).



**Figura 4.** Esquemática da morfologia da partícula viral de um thogotovirus assim como dos segmentos que compõe seu genoma e as proteínas que codificam. Adaptado de: <https://viralzone.expasy.org/79>, acesso em 28/01/23.

Apesar de encontrados majoritariamente em carrapatos, uma espécie divergente dentro do gênero, denominada *Thogotovirus sinuense* (SINUV), foi descrita e isolada a partir de mosquitos, e apresenta a maior taxa de similaridade de aminoácidos (~46%) entre sua glicoproteína de envelope e a GP64 de baculovírus dentre todos os thogotovirus (CONTRERAS-GUTIÉRREZ et al., 2017).

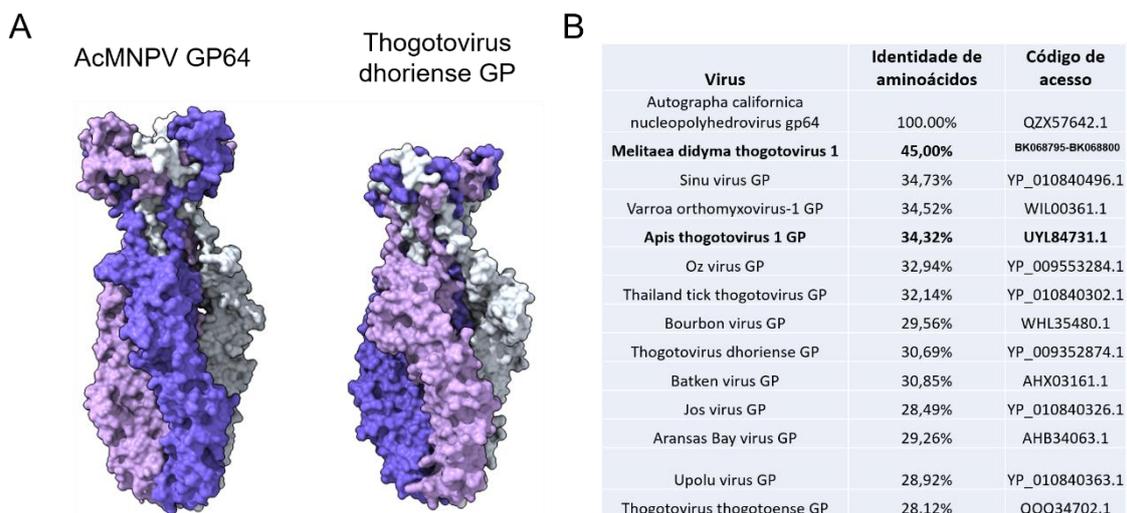
#### 1.4 A proteína GP64 e proteínas de fusão de envelope

O surgimento da proteína GP64, essencial para o brotamento eficiente de BVs e entrada em novas células, foi um evento relativamente recente na história evolutiva da família *Baculoviridae*, embora sua origem exata permaneça incerta. Diversas evidências sugerem que a GP64 se originou por meio de um evento de transferência horizontal de genes (HGT) (KADLEC et al., 2008; MORSE; MARRIOTT; NUTTALL, 1992; PENG et al., 2017). Entre os baculovírus, apenas os *Alphabaculovirus* do grupo I, com exceção de um betabaculovirus (ARDISSON-ARAÚJO et al., 2016), possuem essa proteína. Curiosamente, esses vírus também codificam uma proteína denominada “F-like”, que apresenta homologia com a proteína F encontrada nos outros gêneros de baculovírus (LUNG; CRUZ-ALVAREZ; BLISSARD, 2003; PEARSON; ROHRMANN, 2002). Embora a proteína F esteja presente no envelope de BVs de diversos *Alphabaculovirus* do grupo I, a sua deleção tem impacto mínimo, ou nenhum, na produção de virions ou na capacidade de entrada viral em células (LUNG; CRUZ-ALVAREZ; BLISSARD, 2003). Além disso, enquanto as proteínas F de diferentes baculovírus possuem alto grau de divergência entre si, a GP64 mantém uma maior grau de conservação na sequência de

aminoácidos (PEARSON; ROHRMANN, 2002). Estas observações indicam que, ao longo da evolução dos *Alphabaculovirus*, a glicoproteína GP64, adquirida por um ancestral dos membros do grupo I, substituiu a proteína F como a principal proteína de fusão de envelope. Esse evento provavelmente impulsionou a divergência evolutiva desse grupo dentro do gênero, contribuindo para sua irradiação evolutiva (JIANG et al., 2009; WANG et al., 2014).

A proteína GP64 não apresenta homologia com outras proteínas de fusão conhecidas dentro da família *Baculoviridae*. Curiosamente, ela apresenta um alto grau de similaridade estrutural com a glicoproteína de envelope (GP) encontrada em vírus do gênero *Thogotovirus*, pertencente à família *Orthomyxoviridae* (PENG et al., 2017). Essa família inclui vírus com genoma de RNA fita simples de senso negativo (-ssRNA), e é evolutivamente muito distante da família *Baculoviridae* (dsDNA). Não obstante, as únicas proteínas homólogas com alto grau de identidade de aminoácidos em relação à GP64 dos *Alphabaculovirus* do grupo I são as GPs de envelope de thogotovirus (KADLEC et al., 2008). Análises filogenéticas e estruturais sugerem que essas proteínas provavelmente se originaram de um ancestral em comum (PENG et al., 2017), indicando que a proteína GP64 pode ter surgido por meio de um evento de HGT (PEARSON; ROHRMANN, 2002), ocorrido durante uma coinfeção entre um ancestral dos *Alphabaculovirus* do grupo I e um vírus ancestral relacionado ao gênero *Thogotovirus*. Outra hipótese para a origem dessa proteína é que ela foi adquirida por meio de um evento de recombinação com uma sequência homóloga codificada pelo hospedeiro, tendo sido incorporada de forma independente por ambas linhagens (PEARSON; ROHRMANN, 2002).

A glicoproteína GP64 e as GPs de thogotovirus são classificadas como proteínas de fusão de classe III, a classe mais recentemente descrita, que também inclui proteínas de fusão do vírus da estomatite vesicular (VSV) e do Herpes Simplex 1 (HSV-1) (BACKOVIC; JARDETZKY, 2009). Essas proteínas formam homotrímeros de estrutura alongada, e podem ser subdivididas em 5 domínios proteicos estruturalmente conservados. Apesar da relativa baixa identidade de aminoácidos entre GP64 de AcMNPV e as GPs de thogotovirus (Figura 5 B), suas estruturas tridimensionais são altamente semelhantes (PENG et al., 2017) (Figura 5 A).



**Figura 5. A)** Comparação entre as estruturas tridimensionais das glicoproteínas de fusão de envelope GP64 de AcMNPV (PDB: 3DUZ) e de Thogotovirus dhoriense (PDB: 5XEB), ambas estruturas em conformação pós-fusão. Cadeias individuais que compõe os homotrímeros estão em diferentes cores. Gerado usando UCSF ChimeraX versão: 1.6.1. **B)** Grau de similaridade de aminoácidos entre glicoproteína GP64 de AcMNPV e representantes do gênero *Thogotovirus*. Destacado em negrito os dois vírus estudados neste trabalho.

Duas regiões ricas em resíduos de aminoácidos básicos, denominadas alças de fusão ou *fusion loops*, estão localizadas na extremidade do domínio I, próximo à membrana viral, na conformação pós-fusão. Essas alças são preditas como regiões de interação direta com a membrana do hospedeiro e são essenciais para a atividade de fusão de membranas (DONG; BLISSARD, 2012; MONSMA; BLISSARD, 1995). Além disso, o domínio IV, localizado na porção distal da proteína em sua conformação pós-fusão, forma um bolsão hidrofóbico composto por resíduos de aminoácidos importantes para a incorporação da GP64 nas membranas e para a indução da fusão. Esse domínio também está envolvido na mudança conformacional da proteína que é mediada pelo pH (YU et al., 2020).

A estrutura tridimensional da GP64 em sua conformação pós-fusão é conhecida desde 2008 (KADLEC et al., 2008). No entanto, essa proteína existe em um estado metaestável, o que historicamente dificultou sua purificação e análise estrutural na conformação pré-fusão. Assim, até recentemente, a estrutura da GP64 em sua conformação pré-fusão, e em estados intermediários durante a transição conformacional

induzida por pH permanecia desconhecida. Recentemente, Guo et al. (2024), foram capazes de isolar, purificar e estabilizar GP64 nativa a partir de envelopes virais de AcMNPV, utilizando uma estratégia baseada em nanodiscos lipídicos de Saposina A, o que permitiu sua análise em estado nativo por criomicroscopia eletrônica. Esse estudo determinou a estrutura da GP64 com resolução de 2,77 Å na conformação pré-fusão, e de 2,97 Å em um estado intermediário inicial da transição conformacional. Os resultados revelaram rearranjos estruturais importantes e propuseram um modelo de transição estrutural para a fusão de membranas mediadas por proteínas de fusão de classe III (GUO et al., 2024). Além disso, o trabalho identificou três resíduos de histidina (H23, H245 e H304) sensíveis a mudança de pH, responsáveis por iniciar as etapas iniciais de fusão de membrana. Esses achados podem ser aplicados ao estudo de proteínas de fusão de classe III presentes nos thogotovirus.

Uma estratégia para investigar a relação evolutiva entre baculovírus e thogotovirus, assim como a hipótese de aquisição de GP64 por HGT, é a avaliar a capacidade de proteínas de fusão de envelope de thogotovirus de substituir a função da GP64 nativa de baculovírus (LUNG et al., 2002). Estes estudos são realizados por meio da construção de baculovírus recombinantes pseudotipados com EFPs de thogotovirus, nos quais o gene *gp64* nativo foi deletado, permitindo a análise funcional dessas proteínas no contexto da infecção por baculovírus e sua proximidade evolutiva. Abordagem semelhantes já foram utilizadas para avaliar a homologia funcional de outras proteínas de fusão dentro da família *Baculoviridae* e de proteínas de fusão de classe III (ARDISSON-ARAÚJO et al., 2016; LUNG et al., 2002). Lung et al. (2002) demonstraram que a EFP de THOV pode ser incorporada à partícula viral de baculovírus, porém essa proteína não foi capaz de recuperar a infectividade de AcMNP com o gene *gp64* deletado. A EFP de THOV foi capaz de promover a fusão de membranas apenas em linhagens de células de mamíferos, mas não em células de inseto. Assim, ainda não estão completamente definidos os determinantes estruturais e os resíduos de aminoácidos essenciais para que EFPs sejam homólogas funcionais da GP64.

Além disso, a incorporação de EFPs de thogotovírus no envelope viral tem sido explorada como uma estratégia para melhorar a transdução gênica em linhagens celulares de mamíferos por vetores de baculovírus, aumentando a eficiência de internalização desses vetores (HU et al., 2019).

## **2. Justificativa**

Baculovírus são vírus de inseto amplamente estudados com relação à sua biologia básica e complexo ciclo replicativo. Ademais, são largamente utilizados como agentes biológicos no controle de pragas agrícolas de alto impacto econômico e explorados como ferramentas biotecnológicas versáteis para expressão de proteínas heterólogas e transdução gênica. O grupo mais estudado de baculovírus (*Alphabaculovirus* do Grupo I) possui a glicoproteína GP64 como principal proteína de fusão de envelope, essencial para propagação do ciclo infeccioso. A possível relação evolutiva entre as glicoproteínas de baculovírus e thogotovirus ainda carece de maior elucidação por meio de estudos funcionais, filogenéticos e estruturais. O surgimento recente de GP64 entre os baculovírus e seu sucesso evolutivo, levando à sua fixação na população, tornam essa proteína de grande interesse para a compreensão da história evolutiva da família *Baculoviridae*. Além disso, investigar a origem do gene *gp64* pode fornecer informações valiosas sobre a ocorrência de transferência horizontal de genes entre vírus distantes filogeneticamente. Esses processos evolutivos têm papel fundamental na diversificação e surgimento de novas linhagens virais, tendo implicações importantes na adaptação a novos hospedeiros e surgimento de novos patógenos. O estudo e a caracterização de genes de novos vírus também tem extrema importância no avanço do uso biotecnológico de agentes virais, fornecendo uma base genética para o desenvolvimento de vetores mais eficientes para expressão heteróloga de proteínas, transdução e edição genética. Nesse contexto, o presente estudo utiliza abordagens filogenéticas e funcionais para investigar a origem do gene *gp64* em baculovírus e explorar o potencial de glicoproteínas de thogotovirus como estratégia para o melhoramento de baculovírus com aplicações biotecnológicas.

## **3. Objetivos**

### **3.1 Objetivo Geral**

Auxiliar na elucidação do evento evolutivo de surgimento do gene *gp64* de baculovírus, através da caracterização e análises filogenéticas, e de ensaios funcionais de glicoproteínas de thogotovirus, no contexto de infecção *in vitro* por baculovírus.

### 3.2 Objetivos específicos

- a) Construir baculovírus recombinantes carregando os genes de GPs dos thogotovirus *Apis thogotovirus 1* (ATHOV-1) e *Melitaea didyma thogotovirus 1* (MediTHOV-1);
- b) Avaliar a capacidade destas GPs de resgatarem a capacidade de infecção *in vitro* de baculovírus na ausência do gene essencial *gp64*;
- c) Analisar a capacidade de baculovírus carregando GPs de thogotovirus de transdução gênica em células de mosquito;
- d) Descrever e caracterizar o genoma e a filogenia de um putativo novo thogotovirus de lepidóptero, *Melitaea didyma thogotovirus 1*.

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1 Linhagens celulares

Todas as linhagens celulares de insetos foram mantidas a 27 °C em meio de cultura TC-100 (Vitrocell Embriolife), suplementados com 10% soro fetal bovino (FBS) (Gibco). Células Sf21 derivadas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (VAUGHN et al., 1977) foram utilizadas para amplificação e estoques virais, ensaios de transfecção e cinética de infecção, enquanto células Tn5B derivadas de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) (WICKHAM et al., 1992) foram utilizadas em ensaios de expressão de proteínas e imunodeteção. As titulações virais foram realizadas utilizando células Sf-9 Easy Titer (Sf-9 ET) (HOPKINS; ESPOSITO, 2009). Ensaios de transdução foram realizados utilizando as linhagens de célula mosquito C6/36 (SINGH, 1967) e U4.4 (CONDREAY; BROWN, 1986), derivadas de *Aedes albopictus*, e células Aag2 (LAN; FALLON, 1990) derivadas de *Aedes aegypti*.

### 4.2 Análises bioinformáticas do thogotovirus de lepidoptera

A mineração de dados foi feita a partir do subconjunto de reads do banco de dados Sequence Read Archive (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>, SRA) disponível online no site Serratus (<https://serratus.io/explorer>, acessado em 14/12/2022) (EDGAR et al., 2022). No site, foram procurados conjuntos de reads os quais possuísem pelo menos 45% de identidade com os três motivos catalíticos da RNA-polimerase dependente de RNA (RdRp) com as sequências correspondentes em Sinu Virus, cuja glicoproteína é mais similar com as de baculovirus do que de outros orthomyxovirus (PENG et al., 2017).

Após download do *dataset* encontrado de RNA-seq de indivíduos adultos da borboleta *Melitaea didyma* (número de acesso SRR1325001), (ROMIGUIER et al., 2014), a qualidade das reads foi observada com o programa fastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). O relatório resultante do programa indicou que trimagens sucessivas das reads não eram necessárias. Assim, o conjunto de reads foi montado em contigs transcritos por meio do programa rnaSPAdes (BUSHMANOVA et al., 2019). Em seguida, foi feito BLASTx, com o programa Diamond (BUCHFINK; REUTER; DROST, 2021), dos transcritos contra um banco de dados local contendo as sequências FASTA das proteínas de thogotovirus disponíveis no banco de dados Protein (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) em 11/10/22. Os seis hits correspondentes aos seis segmentos do genoma de thogotovirus foram analisados em seguida.

Os segmentos virais foram anotados com ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>, acessado em 15/12/22). Para análises filogenéticas dos segmentos virais, cada sequência proteica codificada por segmento do vírus foi alinhada com correspondentes homólogos para a família Orthomyxoviridae com o programa MAFFT v7.489 (KATO; ASIMENOS; TOH, 2009). Para a glicoproteína, foram adicionadas ainda sequências dos vírus AcMNPV e *Alphabaculovirus bomori* (BmNPV). Os alinhamentos proteicos resultantes foram trimados com o programa trimAI (CAPELLA-GUTIÉRREZ; SILLA-MARTÍNEZ; GABALDÓN, 2009), o modelo de substituição de aminoácidos foi escolhido com o programa ModelTest-NG (LG+I+G4 para PB1, PB2 e GP; LG+G4 para PA, NP e ML) (DARRIBA et al., 2020). As árvores de máxima verossimilhança foram construídas com o programa RaxML-NG (DARRIBA et al., 2020) com 1000 bootstraps e estas foram visualizadas com o programa Figtree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>), onde foram enraizadas em ponto médio.

Os peptídeos sinal para AcMNPV, ATHOV-1 e MediTHOV-1 foram previstos utilizando o SignalP 6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0>) (TEUFEL et al., 2022). O alinhamento múltiplo de sequências entre as glicoproteínas de baculovírus e thogotovírus foi gerado com o MAFFT v7.489, e o alinhamento resultante foi destacado pela hidropatia usando o Texshade (BEITZ, 2000; KATO; STANDLEY, 2014).

### 4.3 Análise Filodinâmica

Foi gerada uma filogenia calibrada no tempo para glicoproteínas de baculovírus e thogotovírus utilizando o BEAST v2.7.7 (BOUCKAERT et al., 2019). Usamos um modelo de especiação de Yule e um ponto de calibração normalmente distribuído na raiz da árvore, baseado na origem dos Holometabola descrita por Misof et al., 2014 (média de 345 milhões de anos atrás, sigma de 35 Mya) (MISOF et al., 2014).

Além disso, utilizamos o modelo de substituição LG, um relógio relaxado log-normal e uma árvore inicial UPGMA, escolhida com o BEAUti v2.7.7 (DRUMMOND et al., 2012). O modelo resultante foi executado com uma Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) de 10 milhões de estados. A conversão e o Tamanho Efetivo da Amostra (ESS), aceito como maior que 200 para os parâmetros, foram avaliados usando o Tracer v1.7.2 (RAMBAUT et al., 2018).

Uma árvore de Credibilidade Máxima de Clados (MCC) foi construída com o TreeAnnotator após um Burn-in de 10% (<https://www.beast2.org/treeannotator/>) e renderizada utilizando o Figtree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

### 4.4 Clonagem molecular e construção de baculovírus recombinantes

A sequência codificadora da glicoproteína de envelope do thogotovirus Apis thogotovirus 1 (GenBank: OP628251.1) (DA SILVA et al., 2023), e do novo putativo thogotovirus de lepidóptera (*Melitaea didyma thogotovirus 1*), foram quimicamente sintetizadas pela Integrated DNA Technologies (IDT) na forma de fragmentos gênicos (*gBlocks*). As sequências foram amplificadas por PCR utilizando pares de oligonucleotídeos (*primers*) específicos para cada gene (Band Purification Kit (Cytiva).

**Tabela 1**), sendo adicionadas extensões contendo sítios de restrição para as enzimas *ApaI* e *NotI*, nas extremidades 5' e 3' respectivamente. Também foi adicionada sequência de cauda de hexa-histidina (His-tag) nos *primers* reversos para posterior imunodeteção das proteínas expressas. Foram realizadas reações de PCR para ambos os genes contendo: 25 µl GoTaq Long PCR Master Mix (Promega); 1 µl *primer forward* (10 µM) 1 µl *primer reverse* (10 µM); 1 µM DNA molde *gBlocks* (10 ng/µl) e 22 µl de água MilliQ *nuclease*

*free* para um volume final de reação de 50 µl. Após otimização das condições da reação, o protocolo de PCR utilizado para amplificação da GP de *Apis thogotovirus 1* foi: 95 °C por 2 min, 35 ciclos de 95 °C por 20 s (desnaturação), 55 °C por 20 s (anelamento), 72 °C por 1:45 min (extensão) seguido de uma etapa de extensão final a 72 °C por 4 min. Para amplificação da GP de *Melitaea didyma thogotovirus 1* foi utilizado o mesmo protocolo alterando a temperatura de anelamento para 57 °C. Os produtos de PCR de tamanho esperado obtidos (Band Purification Kit (Cytiva).

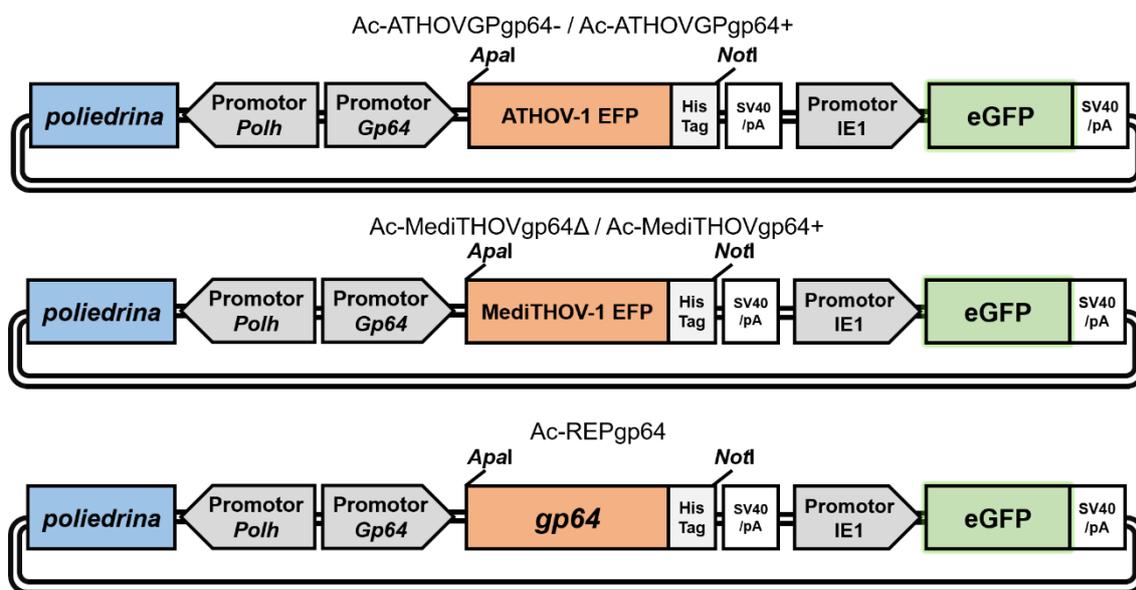
**Tabela 1)** foram purificados de gel de agarose 0,8% (p/v), após separação eletroforética, conforme descrito em (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) utilizando o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Cytiva).

**Tabela 1.** Primers utilizados para amplificação de genes codificadores de glicoproteínas de envelope viral. Sequências de anelamento nas extremidades 5' e 3' da *Open Reading Frame* (ORF) dos genes das EFPs estão destacadas em negrito.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>	<i>Tamanho do produto</i>
<b>ApisTHOV_GP_NEW _ApaI FWD</b>	5'- TATGGGCCCAATGACCATTATGAGTCCCGAAG C -3'	1596 pb
<b>ApisTHOV_GP_6xhis_ NotIREV</b>	5'- CTAGCGGCCCGCAGCTTAATGGTGATGGTGATGG TGGAAAATTCTACGGGA -3'	
<b>MdTHOV_ApaI FWD</b>	5'- TATGGGCCCGATGGTTGATGAGCTCCATGA - 3'	1419 pb
<b>MdTHOV_GP_6xhis_ NotI REV</b>	5'- ATAGCGGCCCGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGA CCATAATGGGGGGAGGATA -3'	

Os produtos de PCR foram então sequencialmente digeridos utilizando as enzimas de restrição *ApaI* (Promega) e *NotI* (Invitrogen), de acordo com as especificações do fabricante, e purificados novamente conforme descrito acima. Os produtos digeridos foram ligados ao plasmídeo vetor pFB-*Acgp64*-pA-PG (ARDISSON-ARAÚJO et al., 2016), digerido com as mesmas enzimas, clonando os genes sob o controle do promotor

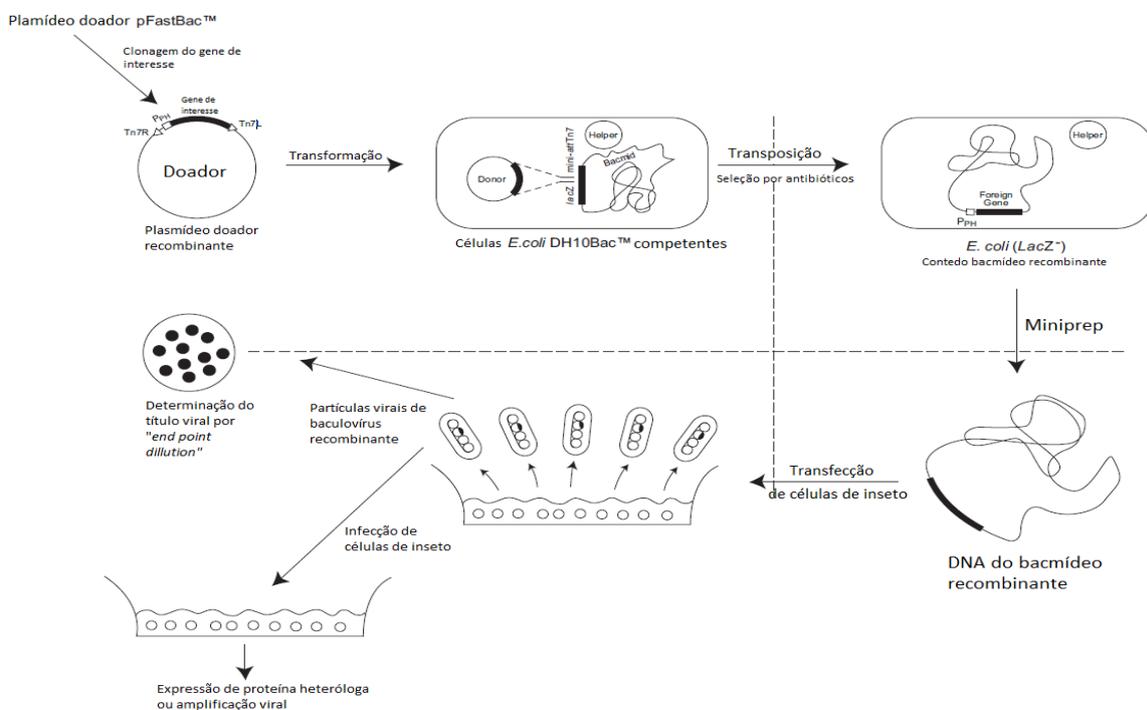
do gene *gp64* de AcMNPV. Este plasmídeo também contém o gene que codifica a proteína poliedrina sob o controle de seu promotor nativo, que leva a formação de corpos de oclusão nucleares nas fases tardias de infecção (indicando a progressão do ciclo infeccioso), assim como o gene repórter eGFP sob o controle do promotor precoce *ie1* (Figura 6), capaz de promover expressão gênica em linhagens celulares de insetos de diferentes ordens (MASUMOTO et al., 2012).



**Figura 6.** Representação esquemática do plasmídeo vetor contendo o gene codificante para glicoproteínas de fusão de envelope de thogotovirus, mostrando os genes da poliedrina (retângulo azul), glicoproteína de thogotóvírus (retângulo em laranja) e proteína fluorescente verde (retângulo em verde) sob o comando de diferentes promotores (setas em cinza). SV40/pA = sinal de poliadenilação do vírus SV40; His Tag= sequência de 6 histidinas. Retângulo laranja indica sítio de clonagem dos genes de EFP de thogotóvírus (ATHOV-1 e MediTHOV-1) e *gp64* de AcMNPV para o vírus controle. Enzima de restrição utilizadas para clonagem estão indicadas.

Os plasmídeos foram transformados pelo método de eletroporação, como descrito em (SAMBROOK; RUSSELL, 2001), em células *E. coli* DH10B eletrocompetentes, também preparadas de acordo com (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Colônias transformadas contendo os genes de resistência foram confirmadas para presença dos genes de interesse pelo método de PCR de colônias, utilizando os *primers* específicos para detecção dos genes das EFPs (utilizando as mesmas condições de reação para amplificação dos genes já descritas).

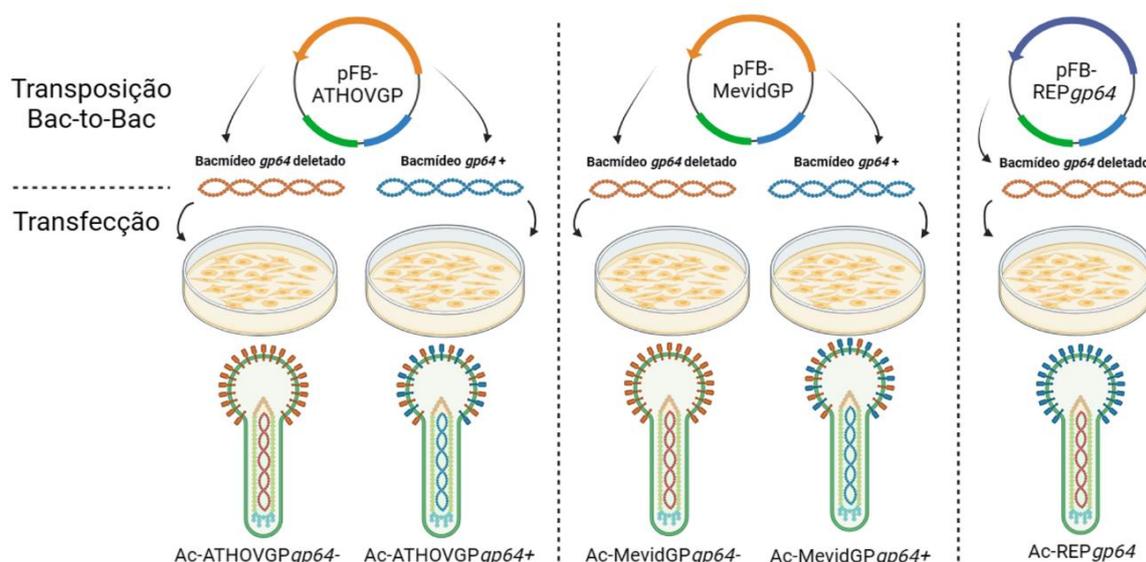
Em seguida, colônias confirmadas por PCR foram crescidas em 10 mL de meio LB líquido sob agitação por 16 h (*overnight*) a 37 °C, e o DNA plasmidial purificado por mini preparação ou *miniprep* utilizando o kit de extração Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). O plasmídeo purificado foi então digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI, *Bgl*II e *Hind*III para confirmação do padrão de restrição previsto, e submetidos a sequenciamento Sanger. Os plasmídeos gerados contendo os genes das GPs de *Apis thogotovirus 1* e *Melitaea didyma thogotovirus 1* foram nomeados pFB-ATHOVGP e pFB-MevidGP, respectivamente. Esses plasmídeos doadores foram utilizados para produção de baculovirus AcMNPV recombinantes, utilizando o sistema Bac-to-Bac™ Expression System (Invitrogen). Brevemente, o plasmídeo denominado doador é transformado na linhagem bacteriana DH10Bac, aonde ocorre a transposição sítio específica da sequência gênica de interesse para o genoma de AcMNPV estavelmente transformado (Bacmídeo), com um auxílio de um plasmídeo ajudante denominado *helper*, também presente na linhagem. Esse plasmídeo codifica a enzima transposase do sistema transposon Tn7, reconhecendo sequencias específicas no plasmídeo doador. A transposição ocorre internamente ao gene *LacZ* presente no bacmídeo, interrompendo a sua expressão e possibilitando seleção azul e branco (LUCKOW et al., 1993) (Figura 7).



**Figura 7.** Esquema mostrando processo de produção de baculovirus recombinantes utilizando o sistema Bac-to-Bac™. Adaptado de *User Guide Bac-to-Bac Baculovirus Expression System*, disponível em:

[http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/bactobac\\_man.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/bactobac_man.pdf). Acesso em: 27 jul. 2023.

Os plasmídeos doadores construídos foram utilizados para gerar baculovírus recombinantes carregando o gene da glicoproteína de *Apis thogotovirus 1* e *Melitaea didyma thogotovirus 1*, porém sem o gene *gp64* nativo, através da transposição para um bacmídeo *gp64* deletado (gentilmente cedido pelo professor Gary W. Blissard da Universidade de Cornell, Estados Unidos). Baculovírus recombinantes possuindo tanto o gene para GP de thogotovirus e *gp64* também foram construídos a partir de transposição para Bacmídeo possuindo *gp64*. Finalmente, um baculovírus recombinante com o gene *gp64* selvagem de AcMNPV, também inserido sob o controle do promotor do gene *gp64* e transposto para um bacmídeo *gp64* deletado (denominado Ac-REP*gp64*), foi utilizado para comparação nos ensaios (Figura 8 e Tabela 2).



**Figura 8.** Esquematisação do processo de construção dos baculovírus recombinantes gerados e utilizados no trabalho. Nomes dados aos vírus gerados se encontra abaixo da representação gráfica das partículas virais e sua composição de EFPs.

**Tabela 2.** Lista de baculovírus recombinantes gerados e utilizados no trabalho, discriminado suas proteínas de fusão de envelope.

Vírus	Proteína de fusão de envelope
Ac-ATHOVGP <i>gp64</i> -	EFP de <i>Apis thogotovirus 1</i>
Ac-ATHOVGP <i>gp64</i> +	EFP de <i>Apis thogotovirus 1</i> e <i>gp64</i> de AcMNPV

Ac-MevidGP $gp64^-$	EFP de <i>Melitaea didyma thogotovirus 1</i>
Ac-MevidGP $gp64^+$	EFP de <i>Melitaea didyma thogotovirus 1</i> e $gp64$ de AcMNPV
Ac-REP $gp64$	$gp64$ de AcMNPV

Para confirmação da transposição sítio específica e construção dos bacmídeos recombinantes, foram realizadas PCRs de colônias brancas isoladas pelo método de esgotamento em placa de Petri, como no método descrito por (BERGKESSEL; GUTHRIE, 2013). Para isso, foi utilizado uma combinação de três oligonucleotídeos para amplificação eficiente, devido ao grande tamanho da região transposta. Os oligonucleotídeos utilizados foram: M13 Forward (5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3') e M13 Reverse (5'-AGCGGATAACAATTCACACAGG-3'), com sítios de anelamento no gene *LacZ*, e o oligonucleotídeo *forward* específico do respectivo gene da EFP, permitindo a verificação da correta transposição.

#### 4.5 Ensaios de transfecção e infecção

Para avaliação da produção de partículas virais, um total de 1,3 µg de DNA dos bacmídeos recombinantes: Ac-ATHOVGP $gp64^-$ , Ac-ATHOVGP $gp64^+$ , Ac-MevidGP $gp64^-$ , Ac-MevidGP $gp64^+$  foram transfectados em duplicatas em  $8 \times 10^5$  células Sf-21 em placas de 6 poços (Cellstar; Greiner Bio-One) usando o reagente de transfecção FuGENE® HD (Promega) de acordo com as especificações do fabricante. As células transfectadas foram monitoradas diariamente para a aparência de fluorescência do gene repórter de infecção precoce eGFP, bem como para a formação de poliedros como repórter para infecção em estágio tardio.

O sobrenadante da cultura de células transfectadas (denominado P0) foi coletado 7 dias pós transfecção (dpt) e clarificado por centrifugação a 5000 g por 6 minutos, e 200 µl de inóculo (denominado P0) usados para infectar  $8 \times 10^5$  células Sf-21 em placas de 6 poços. Esta primeira passagem foi monitorada diariamente para o surgimento de efeitos citopáticos e formação de focos de infecção. O inóculo viral proveniente destas infecções (denominado P1) foi coletado e clarificado 7 dias pós infecção (dpi) para os vírus  $gp64$  deletados (Ac-ATHOVGP $gp64^-$  e Ac-MevidGP $gp64^-$ ) e 72 horas pós infecção (hpi) para os vírus que possuíam  $gp64$  (Ac-ATHOVGP $gp64^+$  e Ac-MevidGP $gp64^+$ ). Da mesma

maneira, 200 µl de inoculo P1 foi passado em células Sf-21 para observação da propagação da infecção e coleta de sobrenadante de cultura (P2) nos mesmos tempos pós infecção observados para primeira passagem. Todos os sobrenadantes das passagens foram titulados em triplicatas utilizando células Sf9 Easy Titer (ET) pelo método *end-point dilution* para estabelecer a *median tissue culture infectious dose* (TCID<sub>50</sub>) (REED; MUENCH, 1938) e dados analisados utilizando o *software* GraphPad Prism 8.0.2.

#### 4.6 Análise de expressão de proteínas

A expressão de EFPs de thogotovirus foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) seguido de coloração com Azul de Coomassie, e por Western blotting (KURIEN; SCOFIELD, 2015). Extratos de células infectadas, bem como de partículas virais recombinantes concentradas do sobrenadante de cultura foram analisadas para presença de EFP de thogotovirus. Células Tn5B foram infectadas a uma multiplicidade de infecção (MOI) 10 em garrafas T75 e o sobrenadante de culturas coletados 10 dias pós-infecção (dpi) para Ac-ATHOVGP $gp64^-$  e 72 horas pós-infecção (hpi) para Ac-THOVGP $gp64^+$  e Ac-REP $gp64$ . O sobrenadante de cultura foi clarificado por centrifugação a 5.000 x g por 6 minutos, filtrado através de um filtro de seringa de 0,22 µm (Millipore), seguido de concentração de partículas virais por ultracentrifugação a 26.000 RPM por 1 hora e 20 minutos (rotor SW28, Beckman Coulter).

Para Western blot, as amostras foram desnaturadas em tampão de carregamento contendo β-mercaptoetanol a 95 °C por 10 minutos, submetidas a SDS-PAGE utilizando o equipamento Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad). Proteínas foram então transferidas para uma membrana de PVDF (Imobilon) utilizando o equipamento Power Blotter XL System (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A membrana foi bloqueada em 3% de albumina sérica bovina (BSA) em solução salina tamponada com fosfato (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, pH 7,4) (PBS) por 1 hora em temperatura ambiente, lavada uma vez por 5 minutos com PBS e, em seguida, incubada com anticorpo monoclonal de camundongo Anti-6X His tag (H8, Invitrogen) em uma diluição de 1:3000, ou com anticorpo monoclonal Anti gp64 (AcV5, Invitrogen) a 1:1000 em PBS *overnight* a 4 °C. A membrana foi então lavada 5 x 5 minutos com PBST (PBS contendo 0,05% de Tween

20) e incubada com anticorpo secundário de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) em diluição de 1:10000 por 1 hora em temperatura ambiente. A membrana foi posteriormente lavada 5 x 5 minutos com PBST e as proteínas foram detectadas usando o substrato BCIP/ (Promega).

#### **4.7 Atividade fusogênica induzida por pH**

Células Sf21 semeadas em uma placa de 12 poços foram infectadas em triplicatas com baculovírus recombinantes em MOI 10. Após 8 dias de infecção com o vírus ATHOVGP<sup>gp64-</sup>, e 72 hpi com o vírus Ac-REP<sup>gp64</sup> e para células não infectadas, o meio de cultura foi substituído por meio TC-100 acidificado (pH 4,5) não suplementado, e incubado por 10 minutos. Em seguida, células foram lavadas uma vez com meio TC-100 não acidificado (pH 6,0), e, após 1 hora, a formação de sincícios foi observada por microscopia de campo claro e de fluorescência. Micrografias foram adquiridas utilizando câmera AxioCam MRc acopladas ao microscópio invertido Zeiss Axiovert 100, utilizando o software Zenn (versão 3.1, Zeiss).

#### **4.8 Análise de cinética de crescimento viral por qPCR**

Células Sf-21 foram infectadas em MOI 1, MOI 10 e MOI 100 em duplicatas em placas de 96 poços com 50% de confluência. O sobrenadante de cultura foi coletado em 5 tempos pós infecção: 1 hpi, 24 hpi, 96 hpi, 8 dpi e 12 dpi para o vírus Ac-ATHOV<sup>gp64-</sup> e 1 hpi, 24 hpi, 48 hpi, 72 hpi e 96 hpi, para os vírus Ac-ATHOV<sup>gp64+</sup> e AcREP<sup>gp64</sup>. O volume total de sobrenadante de cada poço foi clarificado por centrifugação a 4000 x g por 6 minutos e o DNA total extraído utilizando o kit QIAmp Viral RNA Kit (Quiagen) seguindo as recomendações do fabricante. Todas amostras do mesmo tempo de coleta de infecções dos três vírus foram extraídas simultaneamente, e eluídas em volume final de 60 µl de tampão AVE (H<sub>2</sub>O ultrapura RNase free, com 0,04% azida sódica).

Inicialmente foi estabelecida uma curva padrão para determinação de quantidade de número total de cópias de DNA. Para isso foi utilizado o plasmídeo pCR2.1-TOPOAcIE1, que contém o gene *ie1* de AcMNPV, utilizando os primers: AcIE1FWR (5'-CCATCGCCCAGTTCTGCTTA-3') e AcIEREV (5' CTGTTCAAGGGTTGCACAGC 3') produzindo um produto esperado de 198 pb.

Após estabelecimento da curva padrão, foram feitas reações de qPCR em duplicatas experimentais para cada amostra, utilizando o reagente LightCycler 480 SYBR

Green I Master (Roche) com 1 µl de DNA eluído como molde. As reações foram realizadas no termociclador QuantStudio 5 (Thermo Fisher), sob o seguinte programa de ciclagem: Uma etapa de ativação da DNA polimerase a 95 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 10 segundos, 72 °C por 20 segundos, seguido por uma etapa de curva de desnaturação. A leitura foi feita no comprimento de onda de SYBR Green e os dados analisados usando o *software* QuantStudio Design & Analysis Software (versão 1.5.1; Thermo Fisher).

#### **4.9 Fluorimetria de transdução em células de mosquito**

Células C6/36, U4.4, Aag2 e Sf21 foram transduzidas em triplicatas em placa de 24 poços em MOI 5 com os vírus Ac-ATHOV $gp64+$  e Ac-REP $gp64$ . Células foram acompanhadas para presença de fluorescência e, 48 hpi lavadas na placa uma vez com PBS, e em seguida ressuspensas e lisadas em 150 µl de tampão RIPA modificado (Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM; EDTA 5 mM; Triton x-100 1%) sob agitação por 30 minutos a 4 °C. O lisado celular foi clarificado por centrifugação a 17,000 x g por 20 minutos a 4 °C, o sobrenadante coletado, e 100 µl transferidos para uma placa de leitura preta. A fluorescência foi lida com filtro de excitação 475 nm (azul) e filtro de emissão 500-550 nm no equipamento GloMax® Discover (Promega).

#### **4.10 Citometria de fluxo de transdução em células de mosquito**

Células C6/36 foram transduzidas com os vírus Ac-ATHOV $gp64+$  e Ac-REP $gp64$  em MOI 10, por 48 horas. Após este período as células foram lavadas uma vez com PBS, desaderidas e adquiridas por citometria de fluxo no canal SSC (granulosidade celular) FSC (tamanho celular) e o canal de fluorescência FL1 (530/30). Os dados de citometria foram obtidos no FACSCalibur (BD Bioscience) e foram analisados com o software Flowjo (Tree Star Inc.).

#### **4.11 Análise ultraestrutural por Criomicroscopia eletrônica (Cryo-EM)**

Estoques virais de Ac-ATHOV $gp64-$  (200 ml), Ac-ATHOV $gp64+$  (50 ml) e AcREP $gp64$  (50 ml) foram filtrados através de filtros de seringa de 0,22 µm (Millipore), em seguida concentrados por ultracentrifugação através de um colchão de sacarose a 25% diluída em PBS 1X, pH 7,4, a 100.000 x g por 1 h e 20 min. Os pellets virais foram

ressuspendidos em 100 µl de PBS e armazenados a 4 °C até o uso. Grades para criomicroscopia eletrônica foram preparadas por congelamento rápido em etano líquido utilizando o sistema Vitrobot II (Thermo Fisher Scientific), a 22 °C, com volume de amostra de 3 µl, utilizando grades de filme de carbono QUANTIFOIL® Holey Carbon Film R2/2 #200. As grades preparadas foram então analisadas no microscópio eletrônico de transmissão Titan Krios G3i (Thermo Fisher Scientific) no LNNano – Laboratório Nacional de Nanotecnologia (CNPEM/MCTI).

## 5. Resultados e discussão

### 5.1 *Melitaea didyma thogotovirus 1* (MediTHOV-1), um possível novo thogotovírus de lepidóptera

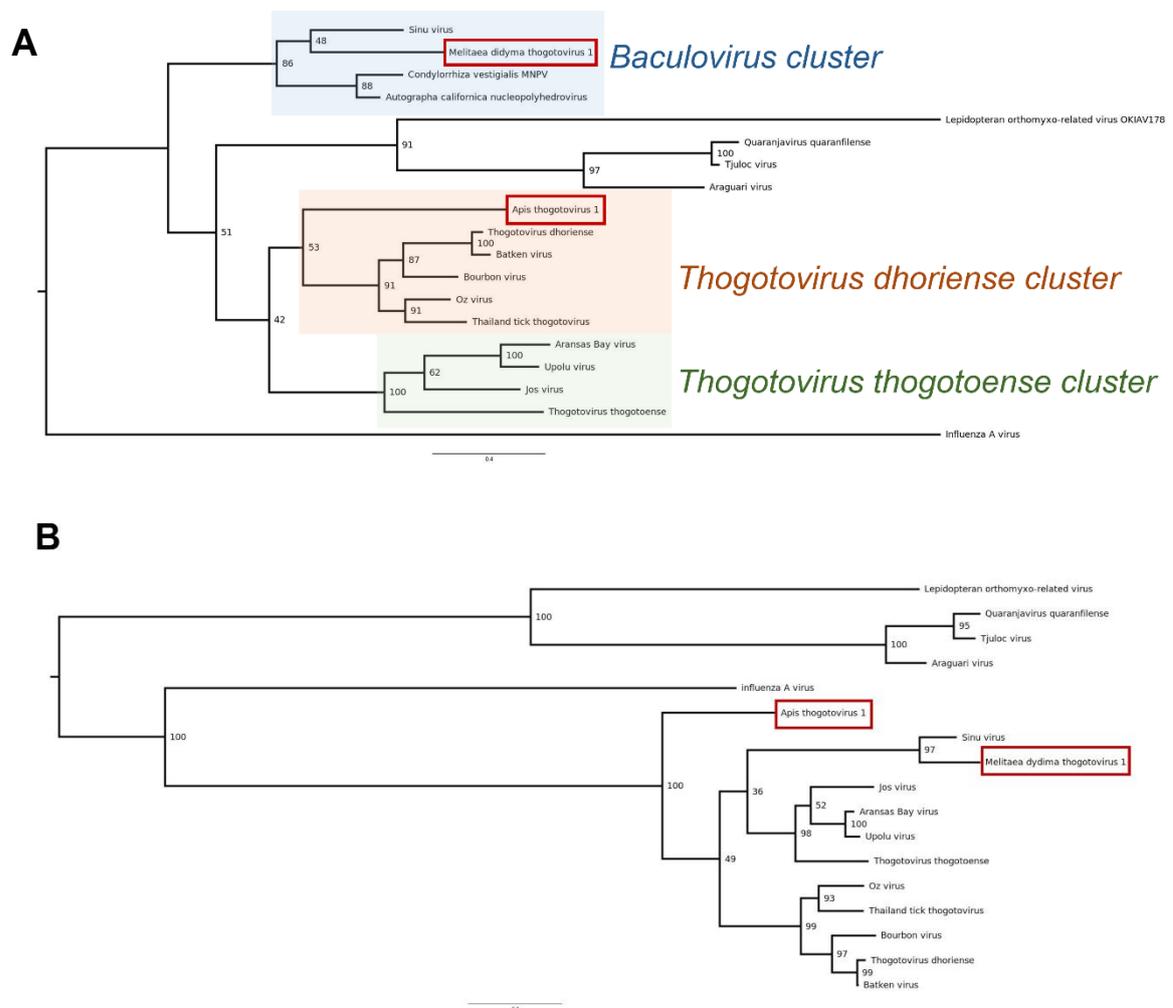
A partir da mineração de dados, foi possível a identificação de um genoma completo e inédito com seis segmentos de um orthomyxovirus de lepidoptera evolutivamente próximo aos thogotovirus. Este vírus será chamado neste trabalho de *Melitaea didyma thogotovirus 1* (MediTHOV-1). Todos os segmentos apresentaram cobertura média de leituras (reads) maior que 20. O genoma possui um total de 10634 nucleotídeos, sendo que o menor segmento possui 810 nucleotídeos (segmento 6) e o maior possui 2310 nucleotídeos (Segmento 1) ( Tabela 3). Os segmentos apresentaram sequências terminais conservadas, as quais são 5' AGTAGTAACAAGAGG/ATTA e 3' AAAAAT/CCTCTTTGTTACTACTCCCG.

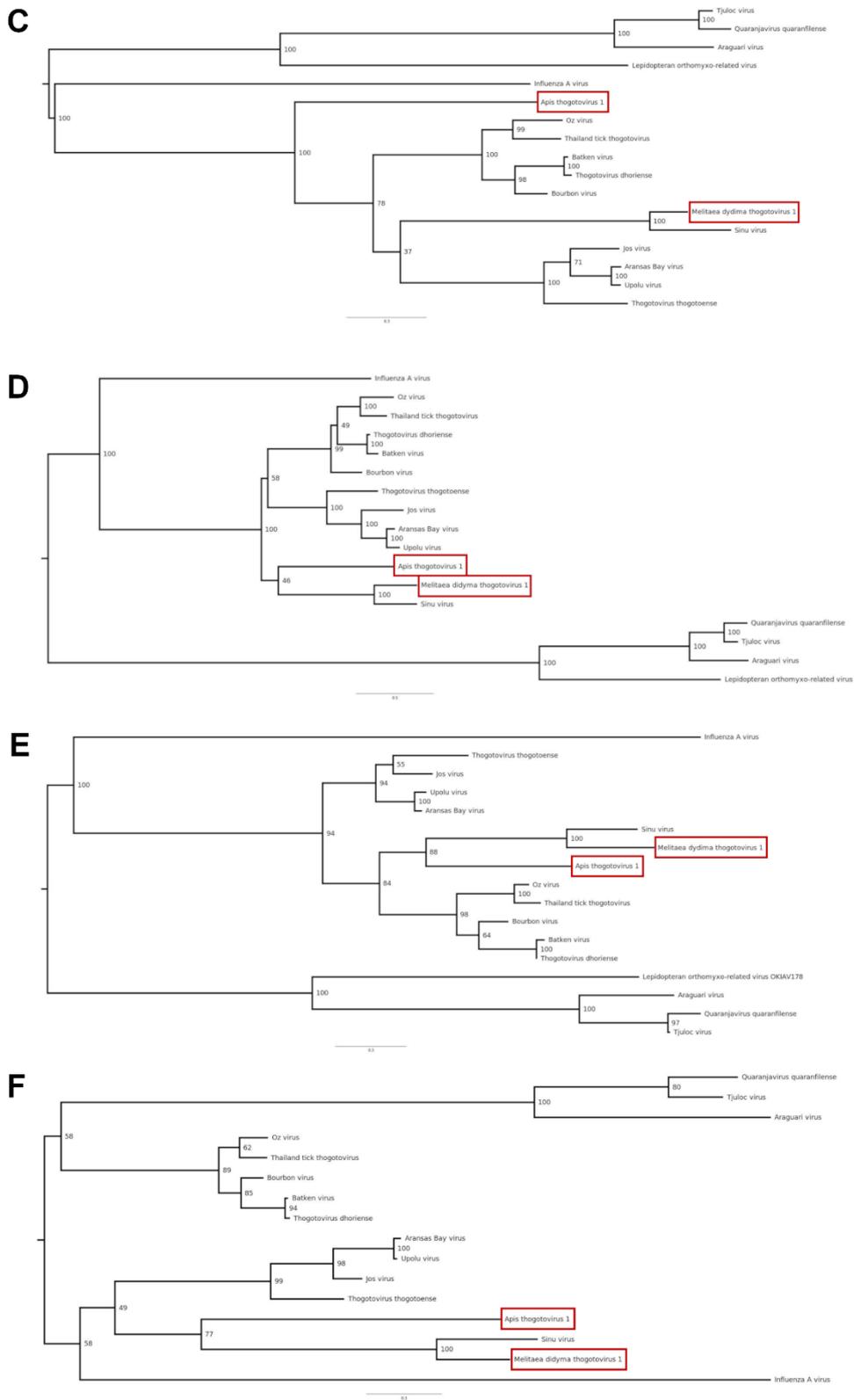
**Tabela 3.** Características gerais do genoma de *Melitaea didyma thogotovirus 1* (MediTHOV-1). Descrição dos segmentos genômicos, incluindo número de segmentos, comprimento de segmentos, comprimento de ORFs, comprimento de UTRs e relações de homologia com *Thogotovirus thogotoense*.

Segmento genômico, profundidade de cobertura média	Tamanho (nts)	Comprimento extremidade 5' UTR (nts)	ORF (nts)	ORF (AAs)	Comprimento extremidade 3' UTR (nts)	Proteína homóloga em thogotovirus
S1, 22 x	2378	36	2310 (37-2346)	769	32	PB2
S2, 46 x	2235	56	2136 (57-2192)	711	43	PB1
S3, 59 x	1995	80	1902 (81-1982)	633	13	PA

<b>S4</b> , 55 x	1419	29	1380 (30-1409)	459	10	GP
<b>S5</b> , 26 x	1556	50	1416 (51-1466)	471	90	NP
<b>S6</b> , 53 x	1051	79	810 (80-889)	269	162	M-like

Nas análises filogenéticas das proteínas codificadas pelos segmentos entre membros da família *Orthomyxoviridae*, todas as proteínas de MediTHOV-1 se agrupam com as proteínas de Sinu Vírus. Para a filogenia da proteína GP, foram incluídas as sequências de AcMNPV e BmNPV. Nesta última filogenia, a proteína GP de MediTHOV-1 se agrupa com Sinu Virus, ainda que com valores baixos de bootstrap (Figura 9).





**Figura 9.** Filogenias de máxima verossimilhança das proteínas de *Melitaea didyma thogotovirus 1* e membros virais da família *Orthomyxoviridae*. **(A)** GP, **(B)** PB1, **(C)** PB2, **(D)** PA, **(E)** NP, **(F)** ML.

Já havia sido descrito um orthomyxovirus completo em lepidópteros, denominado Lepidopteran orthomyxo-related virus OKIAV178 (KÄFER et al., 2019). No entanto, análises filogenéticas das proteínas de seus segmentos mostram que esse vírus é relativamente distante evolutivamente aos thogotovirus. A família *Orthomyxoviridae* tem passado por recentes revisões filogenéticas, e o comitê internacional de Taxonomia de Virus ainda não apresenta critérios objetivos para a demarcação do gênero *Thogotovirus* ([https://ictv.global/report\\_9th/RNAneg/Orthomyxoviridae](https://ictv.global/report_9th/RNAneg/Orthomyxoviridae)). No presente trabalho, foi identificado o genoma de um orthomyxovirus de lepidoptera evolutivamente próximo dos thogotovirus, sendo este o primeiro vírus descrito para a borboleta *M. didyma*. Essa abordagem demonstra que a mineração de dados pode ser combinada com hipóteses sobre eventos de transferência horizontal de genes (HGT) não somente para a descoberta de novos vírus, mas também para inferir os contextos evolutivos e fisiológicos em que esses vírus desempenham papéis relevantes (GUPTA et al., 2024).

A identificação desse vírus, cuja glicoproteína se agrupa com as proteínas GP64 de baculovírus e de Sinu vírus em análises filogenéticas, oferece maior suporte à hipótese de que a proteína GP64 dos baculovirus surgiu por meio de transferência horizontal de genes a partir de um orthomyxovirus ancestral. No entanto, enquanto alphabaculovirus infectam majoritariamente larvas de lepidópteros, MediTHOV-1 foi encontrado em indivíduos adultos. Ainda não está claro se esses vírus poderiam ter coinfestado o hospedeiro no mesmo estágio de desenvolvimento.

Tea et al. (2021) descreveram o hábito de borboletas da subfamília *Danainae* de raspar e consumir, pela espirotromba, a hemolinfa de larvas de borboletas. Esse comportamento foi interpretado pelos autores como estratégia para ingestão de compostos tóxicos, especialmente alcaloides, que são utilizados como defesa química pelos indivíduos adultos e servem como precursores de feromônios. É plausível que esse tipo de comportamento também possa facilitar o contato entre borboletas adultas e baculovírus presentes em larvas infectadas.

Apesar de infectar majoritariamente animais em estágio larval, também foi observada a presença de baculovírus em indivíduos adultos de forma oculta, caracterizada pela ausência de sinais visíveis de infecção (WILLIAMS et al., 2017). Esse tipo de infecção pode acontecer em decorrência de infecções subletais durante o seu desenvolvimento larval, possibilitando também a ocorrência de transmissão vertical (CABODEVILLA et al., 2011; ILYINYKH, 2019). Esta ocorrência poderia propiciar um evento de coinfeção

entre um ancestral baculovírus e thogotovírus em um mesmo indivíduo adulto. Ainda, também é possível que orthomyxovirus evolutivamente próximos a MediTHOV-1 e que infectam larvas existam.

Além disso, ainda não está elucidado como borboletas adultas podem ter sido expostas a MediTHOV-1. Dado que thogotovirus dependem de carrapatos, ácaros e mosquitos como seus vetores (CONTRERAS-GUTIÉRREZ et al., 2017; LEVIN et al., 2019; ROCHLIN; TOLEDO, 2020), que o *Varroa orthomyxovirus 1* é transmitido a abelhas por meio do ácaro parasita *Varroa destructor* (LI et al., 2023) e que ácaros parasitas de lepidópteros já foram descritos (TREAT, 1975), é provável que um ácaro parasita de Lepidoptera seja vetor de MediTHOV-1, no entanto estudos de viromas nesses ácaros são necessários para validar essa hipótese.

## 5.2 Análise Filodinâmica

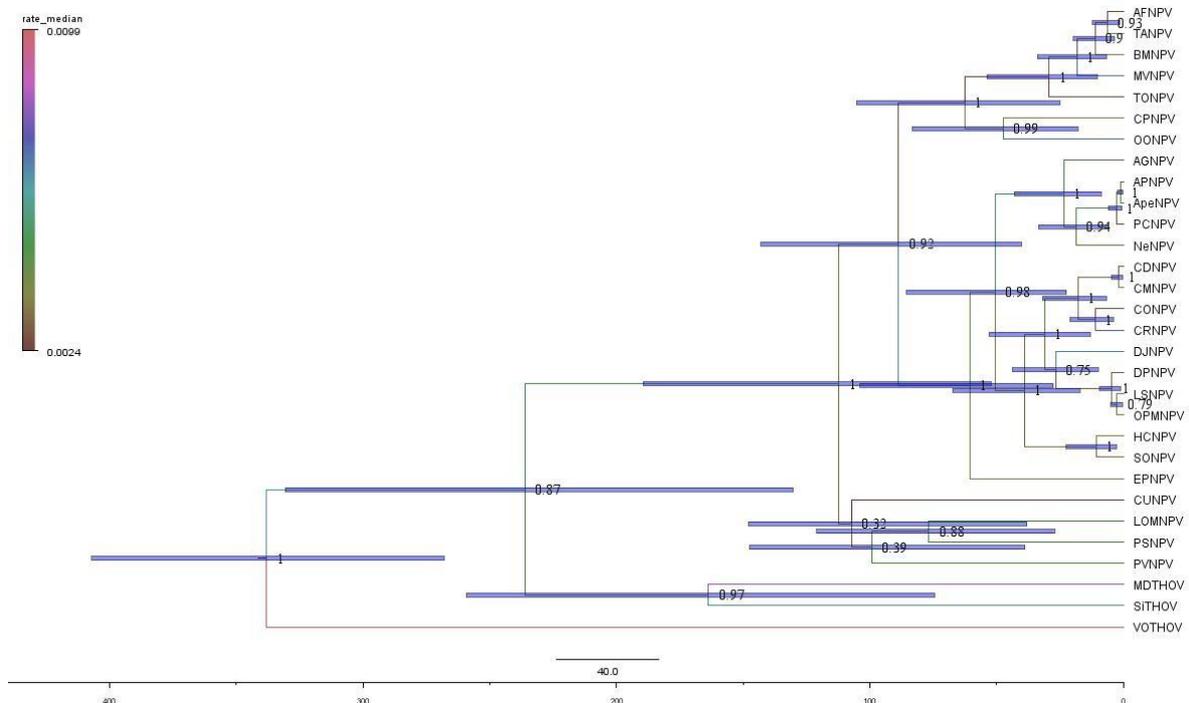
Para realizar a análise filodinâmica da história compartilhada das glicoproteínas de alphabaculovirus e thogotovirus, analisamos um conjunto de dados composto por 30 glicoproteínas, sendo 27 de espécies de baculovírus e três das glicoproteínas de thogotovírus mais estreitamente relacionadas: *Apis thogotovirus 1*, *Melitaea didyma thogotovirus-1* e *Sinu virus* (Tabela 4 Além disso, assumimos uma co-divergência com os hospedeiros ao longo do tempo geológico. Assim, utilizamos um único ponto de calibração, correspondente à época de origem do superordem Holometabola, cerca de 345 milhões de anos atrás (MISOF et al., 2014).

**Tabela 4.** Lista de sequências utilizadas para análise filodinâmica.

Vírus	Abreviação	Número de acesso
Dione juno nucleopolyhedrovirus	DJNPV	YP_010799788.1
Hyphantria cunea nucleopolyhedrovirus	HCNPV	UIX56302.1
Bombyx mori nucleopolyhedrovirus	BMNPV	QRM12746.1
Catopsilia pomona nucleopolyhedrovirus	CPNPV	YP_009255283.1
Troides aeacus nucleopolyhedrovirus	TANPV	QCF61100.2
Lonomia obliqua multiple nucleopolyhedrovirus	LOMNPV	YP_009666390.1
Neophasia sp. alphabaculovirus	NeNPV	QBC76009.1
Antheraea proylei nucleopolyhedrovirus	APNPV	AYW35375.1
Choristoneura rosaceana nucleopolyhedrovirus	CRNPV	YP_008378382.1
Maruca vitrata nucleopolyhedrovirus	MVNPV	YP_950827.1
Epiphyas postvittana nucleopolyhedrovirus	EPNPV	NP_203281.1
Choristoneura occidentalis alphabaculovirus	CONPV	GR56918.1
Parapoynx stagnalis nucleopolyhedrovirus	PSNPV	UZE89697.1

<i>Orgyia pseudotsugata</i> multiple nucleopolyhedrovirus	OPMNPV	YP_046282.1
<i>Leucoma salicis</i> nucleopolyhedrovirus	LSNPV	WZI19419.1
<i>Dasychira pudibunda</i> nucleopolyhedrovirus	DPNPV	WHM28332.1
<i>Palpita vitrealis</i> nucleopolyhedrovirus	PVNPV	USC25963.1
<i>Cyclophragma undans</i> nucleopolyhedrovirus	CUNPV	YP_010086628.1
<i>Oxyplax ochracea</i> nucleopolyhedrovirus	OONPV	YP_009666553.1
<i>Choristoneura murinana</i> nucleopolyhedrovirus	CMNPV	YP_008992122.1
<i>Antheraea pernyi</i> nucleopolyhedrovirus	ApeNPV	YP_611000.1
<i>Philosamia cynthia ricini</i> nucleopolyhedrovirus virus	PCNPV	FY62837.1
<i>Anticarsia gemmatalis</i> nucleopolyhedrovirus	AGNPV	AAM82816.1
<i>Choristoneura diversana</i> nucleopolyhedrovirus	CDNPV	BU37509.1
<i>Thysanoplusia orichalcea</i> nucleopolyhedrovirus	TONPV	YP_007250533.1
<i>Anagrapha falcifera</i> MNPV	AFNPV	AAB53360.1
<i>Spilosoma obliqua</i> nucleopolyhedrosis virus	SONPV	AUR45058.1
<i>Varroa orthomyxovirus-1</i>	VOTHOV	UDY81368.1
<i>Sinu</i> virus	SiTHOV	APP91608.1
<i>Melitaea dydima</i> orthomyxovirus 1	MDTHOV	GenBank: BK068795-BK068800

Na árvore MCC resultante, as densidades posteriores mais altas de 95% (HPD) para a altura do nó que separa as glicoproteínas de alphabaculovirus e thogotovirus estão entre 330-130 milhões de anos atrás (Fig. 10).



**Figura 10.** Dinâmica temporal da evolução de glicoproteínas entre thogotovirus e alphabaculovirus. As barras nos nós representam o intervalo HPD de 95% para a idade, os rótulos dos nós indicam as probabilidades posteriores, e o eixo do tempo está em

milhões de anos atrás. Os rótulos dos ramos estão coloridos pelos valores medianos das taxas de substituição.

Tézé et al. (2011) encontraram um intervalo HPD de 189-10 milhões de anos para a divergência entre alphabaculovirus e betabaculovirus. Assim, há uma sobreposição de HPDs para a origem de alphabaculovirus e a aquisição da *gp64* de aproximadamente 60 milhões de anos, abrangendo do final do período Jurássico ao início do Cretáceo. Isso indica uma aquisição relativamente precoce da glicoproteína pelos alphabaculovirus, que também ocorreu durante um período de radiação nos Holometabola, o qual, por sua vez, coincide com a diversificação das plantas com flores (MISOF et al., 2014; THÉZÉ et al., 2011).

Dadas as análises filodinâmicas, acreditamos que a aquisição do gene *gp64* no início da evolução dos alphabaculovirus contribuiu para sua dispersão entre várias espécies de lepidópteros. Posteriormente, esses vírus coevoluíram com seus hospedeiros até os dias atuais, impondo pressões de seleção negativa sobre o gene *gp64*. De fato, os genomas de alphabaculovirus atuais possuem as menores taxas de substituição não-sinônimas para sinônima (Ka/Ks) em seus genes *gp64* (JIANG et al., 2009). Isso explicaria por que esse grupo de vírus é o mais diverso dentro da família *Baculoviridae*, apesar de a maioria dos vírus do gênero serem específicos para seus hospedeiros.

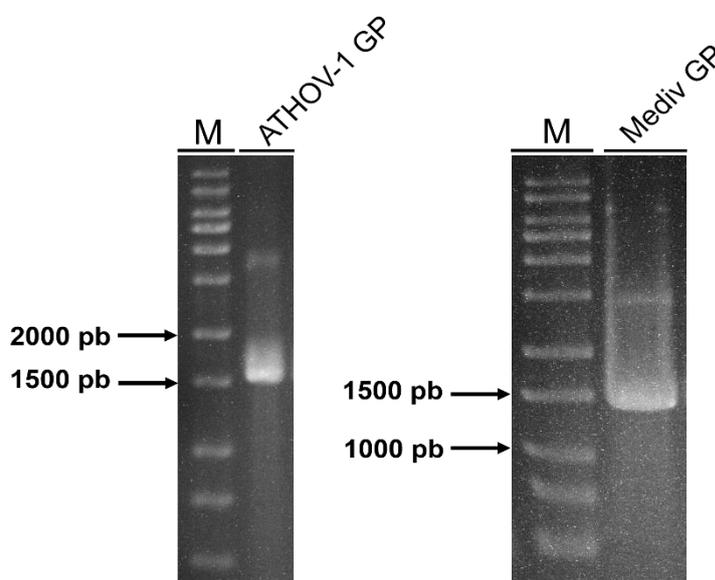
No entanto, não podemos excluir outras hipóteses para a maior diversidade observada de espécies de vírus em *Alphabaculovirus* em comparação com o restante da família. Em particular, alphabaculovirus e betabaculovirus têm sido usados no controle biológico de pragas agrícolas (ROHRMANN, 2019a), o que tem incentivado a descoberta de novos vírus para combater novas pragas. Além disso, é possível que os ancestrais do Apis orthomyxovirus-1 tenham se originado de ácaros e posteriormente se espalhado para as abelhas em tempos geológicos posteriores ao nosso ponto de calibração assumido.

De modo geral, a primeira hipótese aparenta ser mais provável, pelo menos ao comparar a diversidade dos vírus G1- $\alpha$  e G2- $\alpha$ . Ardisson-Araújo et al. (2016) descrevem uma proteína homóloga à *gp64* (*disa118*) codificada por um membro do gênero *Betabaculovirus*, denominado *Diatraea saccharalis granulovirus* (DisaGV). Esta proteína foi demonstrada como uma proteína de fusão funcional, substituindo parcialmente a capacidade de infecção de um AcMNPV deletado para *gp64*. Em análises filogenéticas *disa118* agrupa mais proximamente com *gp64* de alphabaculovirus do grupo I, indicando que provavelmente surgiu de um evento de HGT de um ancestral deste grupo. Apesar de

não ser conhecido sua atividade biológica para infecções naturais por DisaGV, este gene parece ter se fixado no genoma da espécie, e representa um exemplo de ocorrência de troca génica na família *Baculoviridae* que pode ter implicações evolutivas importantes.

### 5.3 Clonagem molecular e construção de baculovírus recombinantes

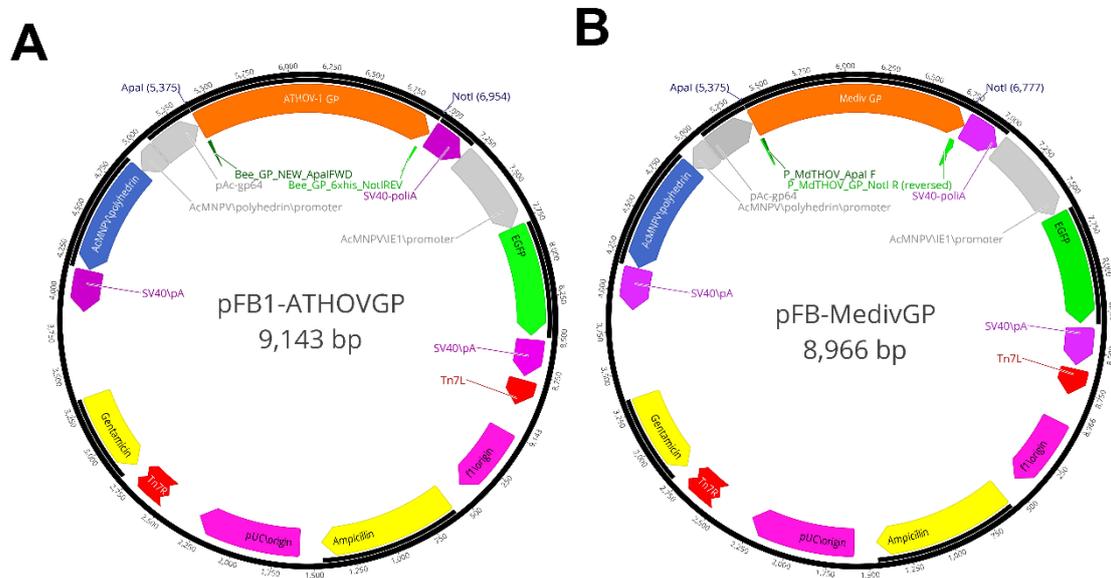
Os genes codificadores para EFP de *Apis thogotovirus 1* (ATHOV-1) e *Melitaea didyma thogotovirus 1* (MediTHOV-1) foram amplificados por PCR a partir dos *gBlocks* sintetizados. Foram obtidos fragmentos de tamanhos esperados de 1572 pb e 1404 pb, respectivamente, correspondentes aos genes contendo as extensões presentes nos oligonucleotídeos (Figura 11). Foram adicionados sítios de restrição para as enzimas *ApaI* e *NotI* além de cauda de histidina na extremidade 3' de cada gene para imunodeteccção.



**Figura 11.** Amplificação dos genes das EFPs de thogotovirus. Produtos de PCR em gel de agarose 0,8%, indicando fragmentos obtidos de tamanhos esperados para GP de ATHOV-1 (1572 pb) e MediTHOV-1 (1404 pb) M: Marcador molecular ladder 1 kb (Ludwig).

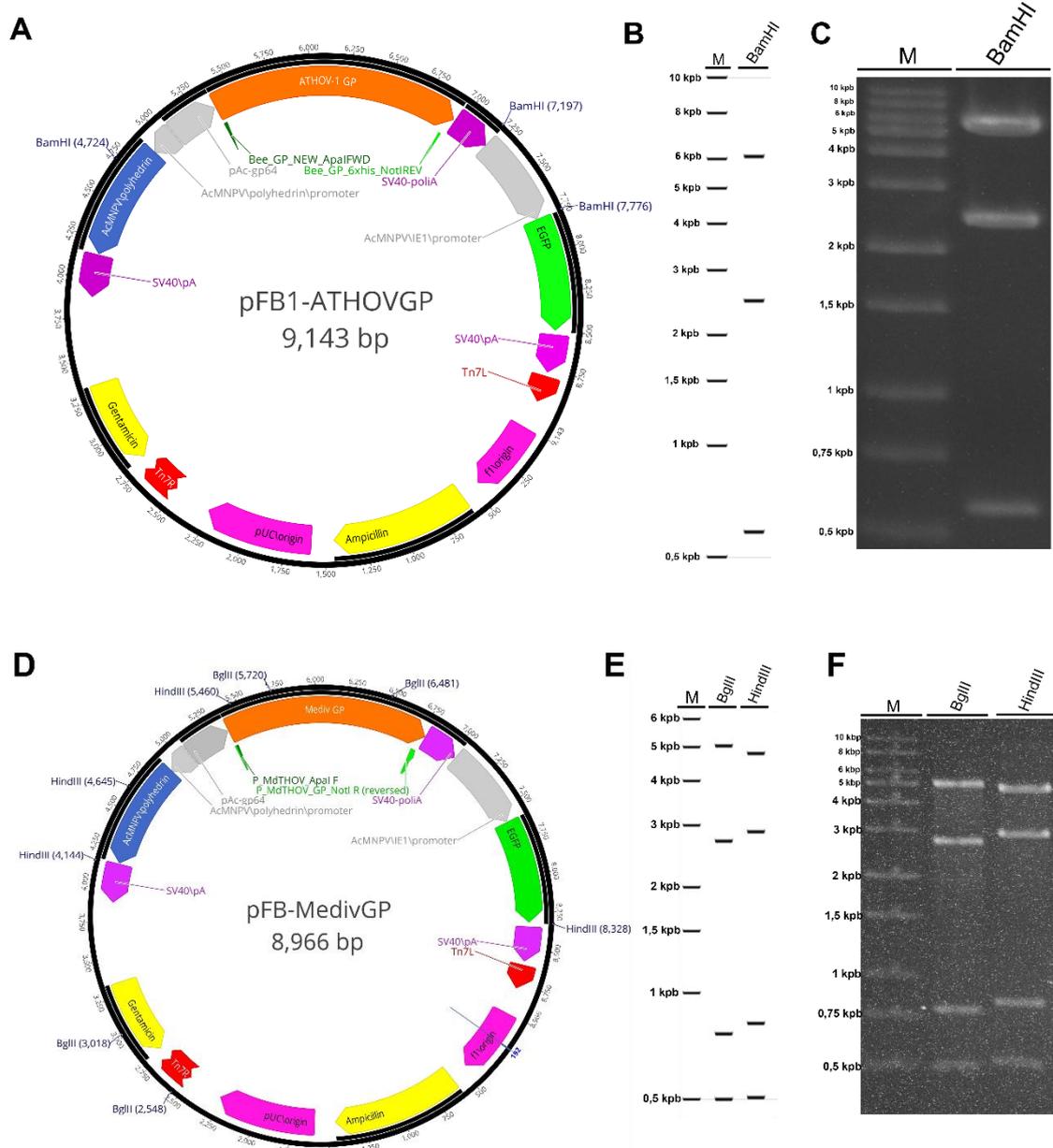
Os genes foram clonados no plasmídeo doador pFB-*Acgp64*-pA-PG, gerando o plasmídeo contendo o gene da EFP de ATHOV-1, denominado pFB-ATHOVGP (Figura 12 A), e o plasmídeo contendo o gene da EFP de MediTHOV-1, denominado pFB-MediTHOVGP (Figura 12 B). Ambos foram clonados sob o controle do promotor nativo

de *gp64* de AcMNPV, de forma a recapitular os níveis e tempo de expressão da GP nativa do vírus.



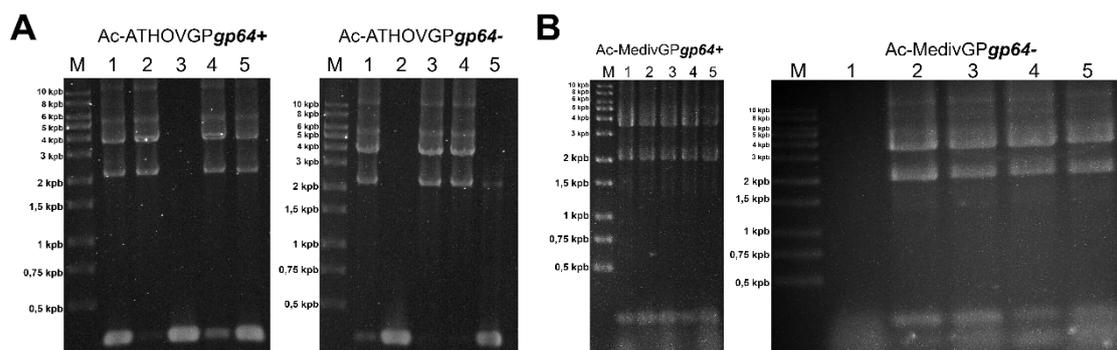
**Figura 12.** Mapa vetor dos plasmídeos vetores gerados. Em destaque as sequências das EFPs de ATHOV-1 (A) e MediTHOV-1 (B) (em laranja), sob o controle do promotor do gene *gp64* de AcMNPV (em cinza). Gene poliedrina em azul sob o controle de seu promotor nativo, e gene repórter eGFP (em verde) sob controle do promotor ie1. Mapa gerado utilizando o *software* Geneious versão 11.1.5 (Biomatters).

Colônias transformantes foram confirmadas por PCR de colônia utilizando os oligonucleotídeos específicos para cada gene. Um clone confirmado foi crescido em meio líquido, e os plasmídeos purificados foram confirmados por ensaio de restrição utilizando as enzimas *Bam*HI, *Bgl*III e *Hind*III, sendo obtido o padrão de restrição previsto (Figura 13 C e F).



**Figura 13.** Confirmação da clonagem por ensaio de digestão por enzimas de restrição. Mapa vetor dos plasmídeos pFB-ATHOVGP anotado para o sítio de restrição para *BamHI* (A) e plasmídeo pFB-MedivGP (D) anotado para os sítios das enzimas *BglII* e *HindIII*. Simulações do perfil de restrição esperado para reações com as enzimas selecionadas (B e E). Imagens de gel de agarose 0,8% das digestões obtidas dos respectivos plasmídeos com as mesmas enzimas selecionadas (C e F), demonstrando obtenção dos perfis de digestão esperados. M: Marcador molecular ladder 1 kb (Ludwig) Mapas e simulações geradas utilizando o *software* Geneious versão 11.1.5 (Biomatters).

A construção dos genomas recombinantes de AcMNPV (bacmídeos) por transposição sítio específica, contendo as EFPs de thogotovirus, foi confirmada através de PCR de colônias (Figura 14). A presença de fragmentos maiores corresponde à amplificação de produto do tamanho esperado oligonucleotídeos *forward* específico para a respectiva EFP e M13 Reverse, indicando a correta transposição dos genes de interesse para os bacmídeos.



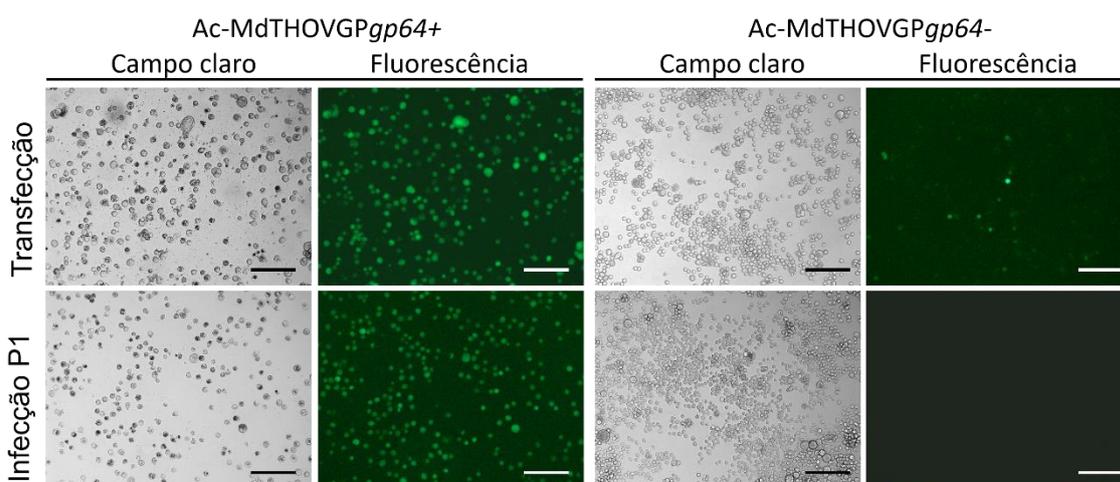
**Figura 14.** PCR de colônia de bacmídeos recombinantes contendo EFPs de thogotovirus. Resultado de eletroforese em géis de agarose 0,8% de reações utilizando DNA de colônias de bacmídeos com e sem *gp64*. **A)** O DNA de 5 colônias *gp64+* e *gp64-* contendo a EFP de ATHOV-1 foram amplificados por PCR utilizando os oligonucleotídeos M13 Forward, M13 Reverse e ApisTHOV\_GP\_NEW\_ApaI FWD. Fragmentos de ~4000 pb representam tamanho esperado para confirmação da transposição sítio específica, enquanto fragmento de amplificação de 300 pb em colônias 1, 3, 4 e 5 representa presença de bacmídeo não transposto. Colônia 2 foi selecionada para subsequente purificação. **B)** Eletroforese de reações de PCR de 5 colônias de *gp64+* e *gp64-* contendo a EFP de MediTHOV utilizando os oligonucleotídeos M13 Forward, M13 Reverse e MediTHOV\_ApaI FWD. Fragmentos de ~3800 pb esperados para amplificação entre primer específico do gene e M13 Reverse, indicando correta transposição. Foram observados pequenos fragmentos de amplificação inespecífica após duas séries de esgotamento de colônia em placa de Petri.

#### 5.4 A EFP de MediTHOV-1 não é capaz de recuperar infectividade de AcMNPV *gp64 null*

A proteína de fusão de envelope (EFP) *gp64* é essencial para o brotamento de partículas virais de alphabaculovírus do Grupo I em seu fenótipo vírus brotado (BV),

assim como para sua entrada em novas células. Sendo assim, sua ausência impede eventos de infecção célula a célula e a propagação da infecção (BLISSARD; THEILMANN, 2018). Assim, avaliamos a capacidade de genes codificadores de EFPs de thogotovírus em restaurar a infectividade do baculovírus AcMNPV, cujo gene *gp64* nativo foi deletado.

Foi observado que, apesar do maior grau de identidade entre a GP do vírus *Melitaea didyma thogotovirus 1* e *gp64*, sua EFP não foi capaz de resgatar infectividade de AcMNPV deletado para o gene *gp64* nativo. O DNA infeccioso dos baculovírus recombinantes Ac-MevidGP $gp64+$  e Ac-MevidGP $gp64-$  foram transfectados em células Sf21, que foram observadas para expressão dos genes repórteres de infecção. Células transfectadas com ambos os vírus apresentaram sinal de eGFP, porém não foi possível recuperar partículas virais infecciosas provenientes do sobrenadante de cultura da transfecção do bacmídeo Ac-MevidGP $gp64-$ , apenas no vírus Ac-MevidGP $gp64+$  contendo também *gp64* (Figura 15).



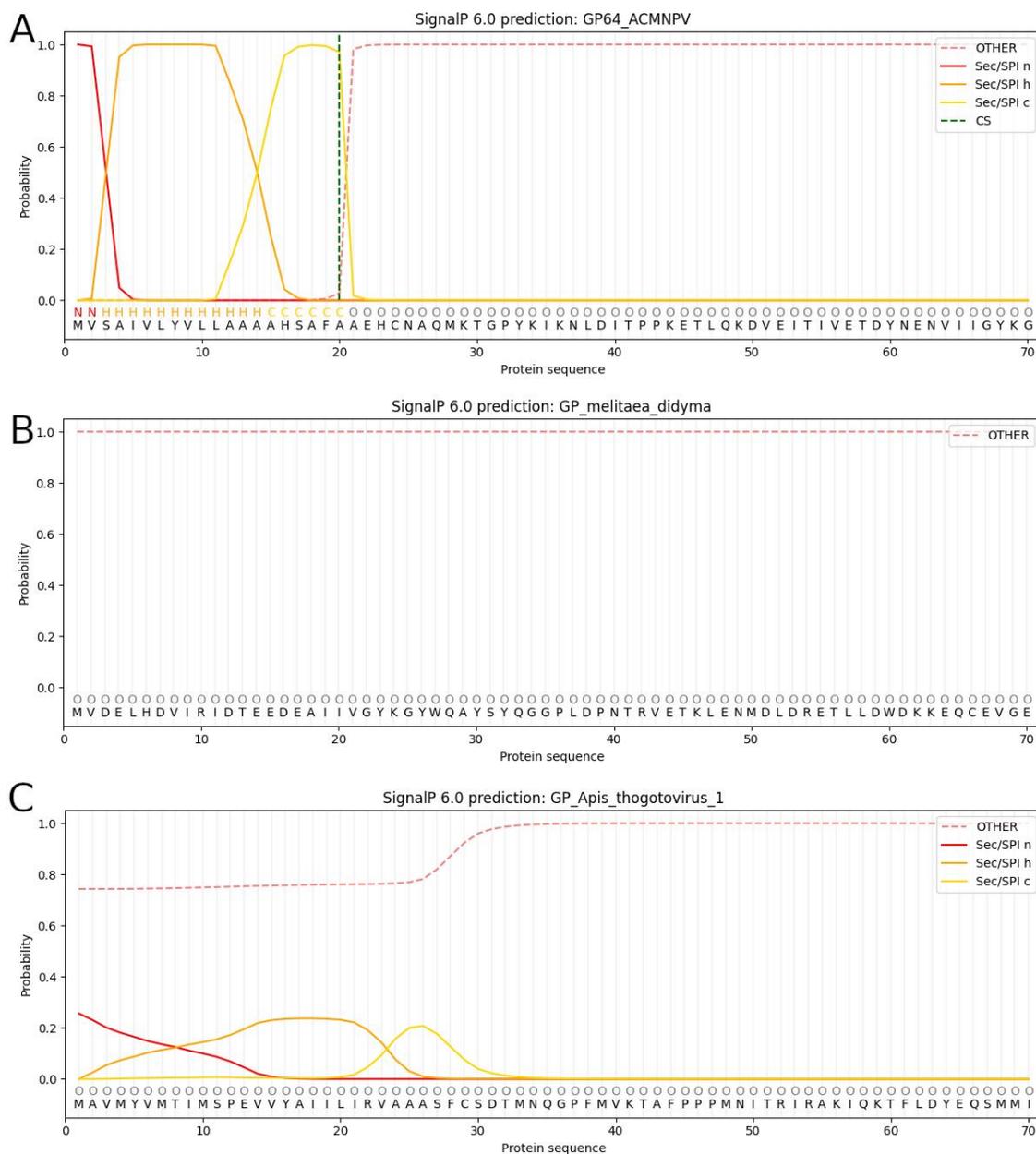
**Figura 15.** Proteína de fusão de envelope de MediTHOV-1 não é capaz de substituir *gp64* de AcMNPV. Microscopia de fluorescência de células Sf21 7 dias pós transfecção, e 72 hpi da primeira passagem de infecção em série (P1) de Ac-MediTHOVGP $gp64+$ , e 7 dpi do vírus Ac-MediTHOVGP $gp64-$ . Barra de escala 250  $\mu$ m.

De forma similar, Lung et al. (2002) reportaram que a EFP de Thogotovirus thogotoense não foi capaz de recuperar a infectividade de AcMNPV *gp64 null*, além de ser incapaz de induzir fusão de membranas em células de inseto quando expressa transientemente. Interessantemente, esta mesma EFP foi capaz de provocar fusão celular

quando expressa na linhagem celular de mamífero CHO, indicando uma maior adaptação a hospedeiros mamíferos.

Esta observação ilustra como apesar de possuir relativa alta porcentagem de 46% de identidade de aminoácidos entre as GP de MediTHOV-1 e *gp64* de AcMNPV (um indicativo importante de relação filogenética entre MediTHOV-1 e os alphabaculovírus), este não é o único determinante para a atividade de EFPs heterólogas durante a infecção por baculovírus pseudotipados. Estudos de mutação de resíduos de aminoácidos, em regiões determinadas como críticas para atividade de fusão de membrana e incorporação de GP64 ao envelope viral demonstram que tais mutações podem abolir completamente a infectividade de AcMNPV. Dong & Blissard (2012) realizaram a substituição dos aminoácidos presentes nos loops de fusão 1 (aminoácido Y75 a T86) e 2 (N149 a H156) por alanina, resultando em mutantes incapazes de mediar fusão de membrana por inibição na formação de hemifusão entre membranas, e por inibição da expansão de poro necessária para liberação do nucleocapsídeo no citoplasma.

Ademais, a GP prevista codificada por esse vírus não possui um peptídeo sinal previsto evidente (Fig. 16).



**Figura 16.** Predição de peptídeos sinais utilizando SignalP para as glicoproteínas de envelope de (A) ACMNPV, (B) MediTHOV and (C) ATHOV-1

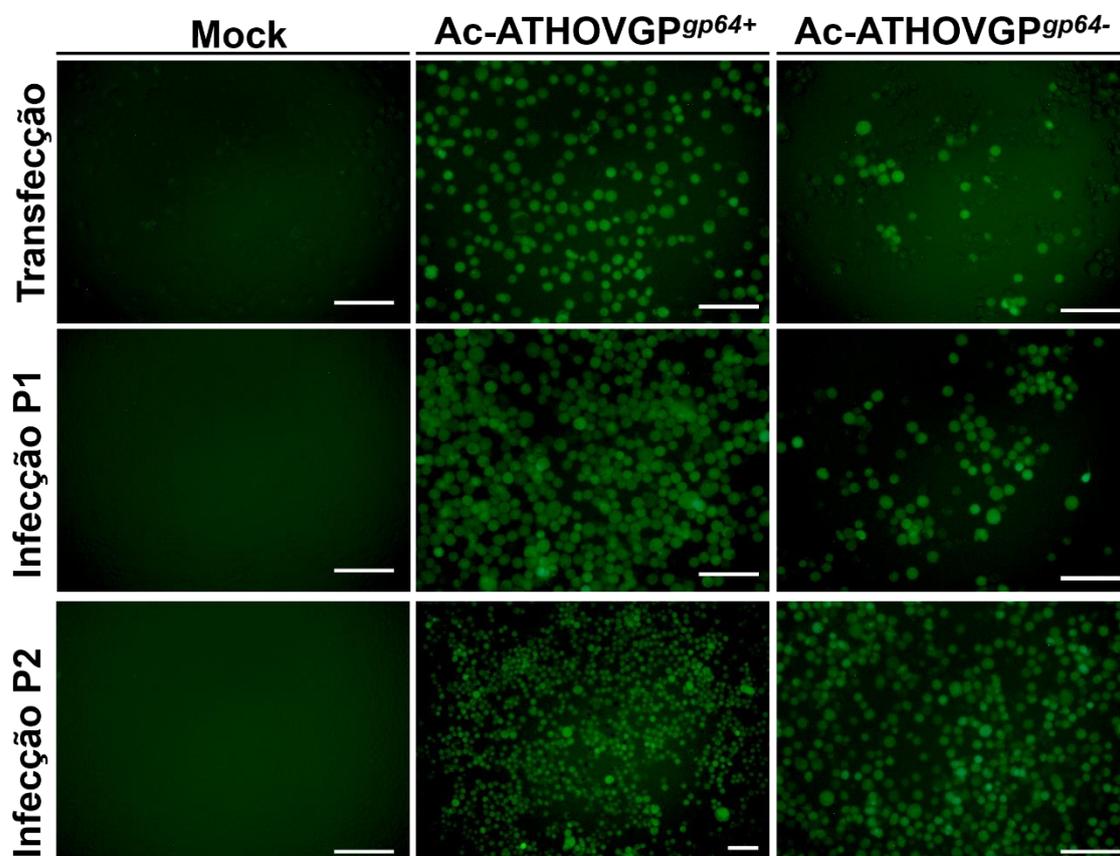
Além disso, Yu e colegas (2020) demonstraram que o resíduo 388Y no domínio IV da GP64 é necessário para gerar títulos virais de AcMNPV na linhagem celular Sf9 (YU et al., 2020). Enquanto todas as sequências de baculovírus analisadas neste estudo apresentam este resíduo, alguns thogotovírus, incluindo o MediTHOV-1, possuem um resíduo 388F, enquanto o ATHOV-1 apresenta o resíduo 388Y (Fig. 17).



Sendo assim, as complexas relações filogenéticas entre lepidópteros, como *Autographa californica* na família Noctuidae e *Melitaea didyma* na família Nymphalidae, podem levar a caminhos evolutivos divergentes para os vírus que os infectam ao longo do tempo.

### 5.5 A proteína de fusão de envelope de *Apis thogotovirus 1* é capaz de resgatar a infectividade de *AcMNPV gp64 null*

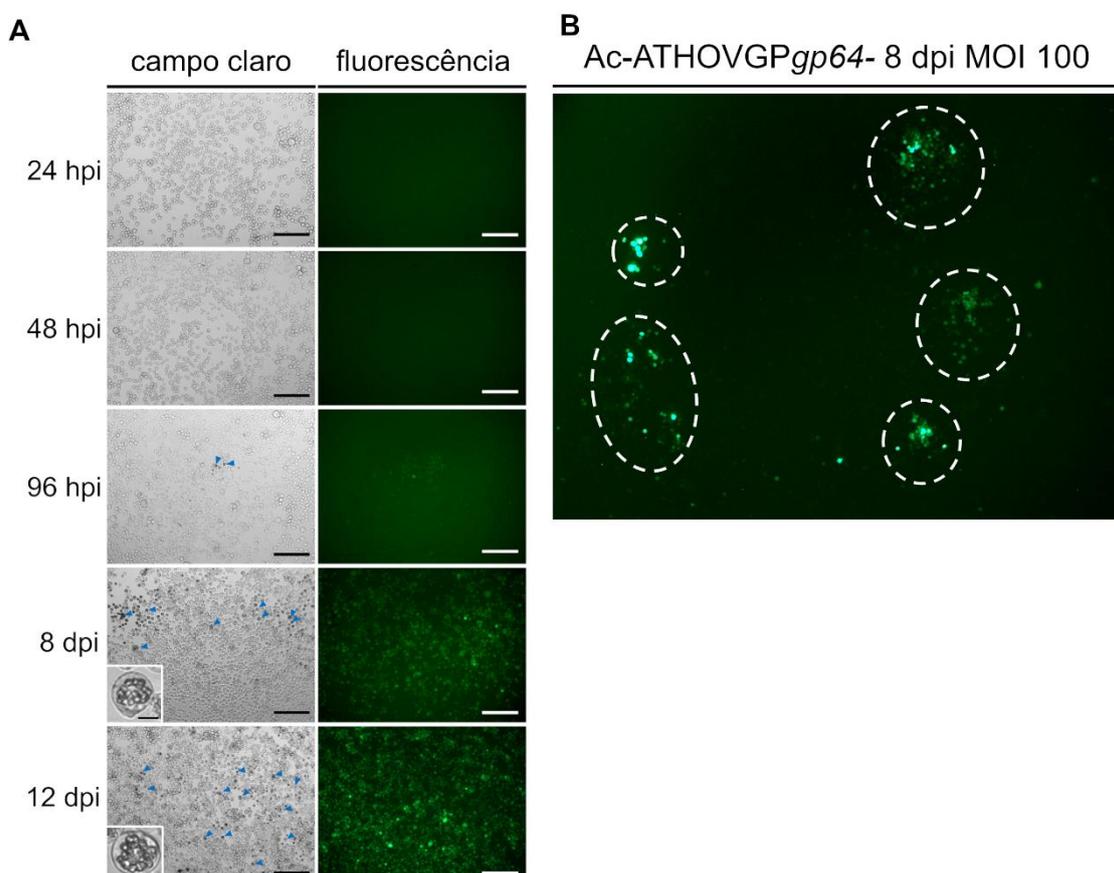
Entre as proteínas testadas, a glicoproteína de envelope do vírus *Apis thogotovirus 1* foi capaz de resgatar a infectividade de *AcMNPV gp64 null*. O vírus *Ac-ATHVOGP<sub>gp64+</sub>*, pseudotipado com esta GP, produziu partículas virais infecciosas a partir da transfecção do seu genoma em cultura de células, e a infecção foi propagada em passagens consecutivas em células Sf21 (Figura 18). Isto foi observado pela expressão do gene repórter eGFP, sob o controle do promotor precoce ie1, assim como pela expressão da proteína muito tardia poliedrina (sob controle de seu promotor nativo) indicando que o ciclo de infecção se deu de forma completa (Figura 18 e Figura 19).



**Figura 18.** Proteína de fusão de envelope de ATHOV-1 é capaz de substituir *gp64* de *AcMNPV*. Microscopia de fluorescência de células Sf21 7 dias pós transfecção, e 72 hpi

de duas passagens de infecção em série (P1 e P2) de Ac-ATHOVGP $gp64+$ , e 7 dpi do vírus Ac-ATHOVGP $gp64-$ . Barra de escala: 125  $\mu$ m.

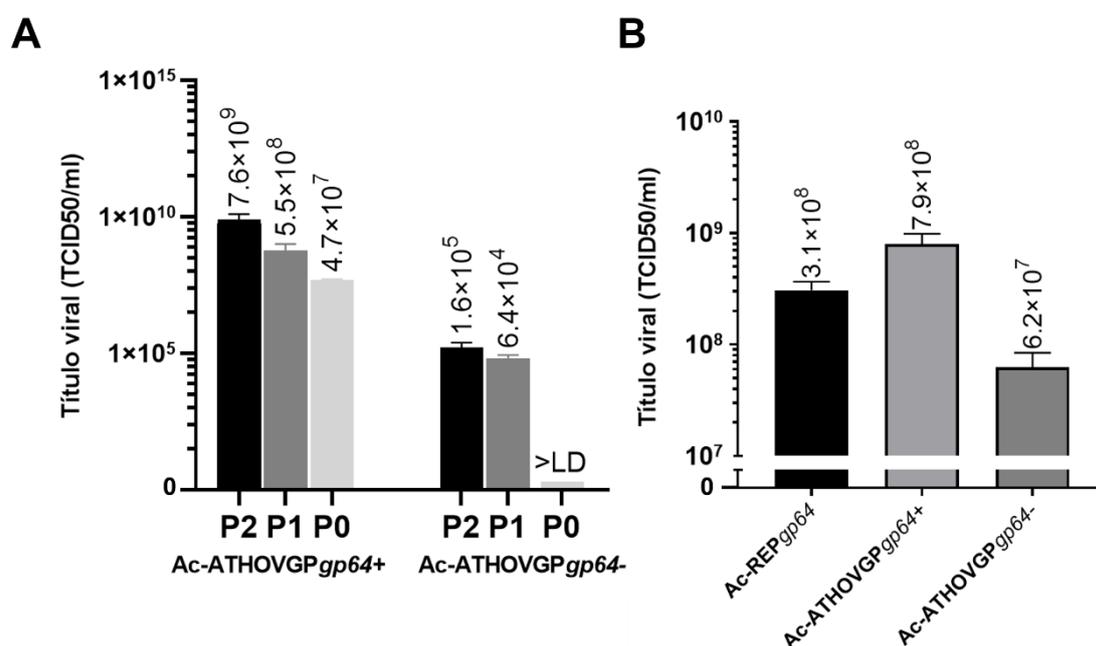
O vírus Ac-ATHVOGP $gp64-$  apresentou uma cinética de replicação atrasada em relação a AcMNPV portando  $gp64$ , com espalhamento da infecção ocorrendo a partir de 96 hpi, atingindo a totalidade de células infectadas apenas por volta 10 dpi, a depender da multiplicidade de infecção (Figura 19 A). Em infecções com Ac-ATHOVGP $gp64-$  foi possível observar focos de infecção isolados em até 8 dpi (Figura 199 B), indicando a capacidade do gene de induzir o espalhamento da infecção célula a célula, porém em menor eficiência se comparado a vírus que possuem  $gp64$ .



**Figura 19.** Cinética de infecção por Ac-ATHOVGP $gp64-$ . **(A)** Microscopia de fluorescência e campo claro de células SF21 infectadas expressando o gene repórter eGFP e poliedrina (massas escuras intracelulares, setas azuis e ampliação) indicando progressão da infecção ao longo do tempo. **(B)** Células Sf21 8 dpi, círculos pontilhados demarcam regiões de focos de infecção isolados. Barra de escala: 250  $\mu$ m.

Esta cinética estendida de progressão *in vitro* foi observada em todas as infecções realizadas no trabalho, com espalhamento máximo da infecção em cultura ocorrendo em média no período de 12 a 14 dpi. Comparativamente, infecções *in vitro* pelo vírus AcMNPV selvagem (e por recombinantes contendo o gene *gp64*) é possível observar 100% das células infectadas em 24 hpi.

Além deste padrão de cinética de crescimento, foram obtidos menores títulos virais de inóculos de Ac-ATHOVGP $gp64^-$  (média em torno de  $1 \times 10^6$ ) se comparado aos vírus que possuem *gp64*, Ac-THOVGP $gp64^+$  e o vírus Ac-REP $gp64$  ( $> 1 \times 10^8$ ) (Figura 20 A). A quantidade de partículas virais infecciosas obtidas 7 dpt (P0) estava abaixo do limite de detecção (LD) da titulação pelo método de *end-point dilution*. Porém foi observado o espalhamento da infecção e a presença de focos delimitados células GFP positivas durante a transfecção. Desta forma, passagens subsequentes em células Sf21 levaram a um aumento considerável do título viral em P1 e P2, entretanto, este se manteve significativamente menor do que títulos obtidos por AcMNPVs contendo *gp64* (20 A e B).



**Figura 20.** Titulação de baculovírus recombinantes pseudotipados. **A)** Título obtido a partir de transfecção (P0) 7 dpt, e de passagens em série (P1 e P2) em 72 hpi para AcATHOV $gp64^+$  e 7 dpi para AcATHOV $gp64^-$ . LD: limite de detecção. **(B)** Títulos obtidos de infecção em Sf21 para inóculos de trabalho para AcATHOV $gp64^+$  e AcREP $gp64$  72 hpi e AcATHOV $gp64^-$  14 dpi.

Para obtenção de maior título viral de AcATHOV $gp64^-$  (20 B) garrafas T25 com células Sf21 em 50% de confluência foram infectadas, após 7 dias desaderidas do fundo da placa e transferidas para garrafa T75, e coletadas mais 7 dias após a passagem, permitindo obtenção de título de  $6,2 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml.

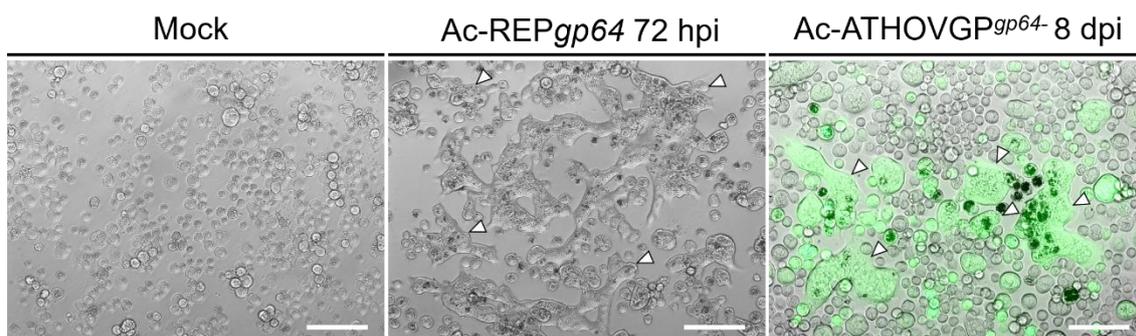
Foi observado que consistentemente títulos maiores do vírus AcATHOV $gp64^+$  em relação ao vírus AcREP $gp64$  foram obtidos, indicando a possibilidade de a adição da EFP de ATHOV-1 agir de forma complementar a GP64 nativa, aumentando a eficiência de produção de partículas de BV infecciosas *in vitro*.

## 5.6 Ensaio de fusão mediado por pH

A liberação do nucleocapsídeo dos alphabaculovirus no citoplasma celular ocorre após endocitose mediada por receptor, e depende da atividade de indução de fusão de membranas da proteína GP64 (HEFFERON et al., 1999). Este evento acontece em decorrência de sua mudança conformacional dependente de pH e, durante a infecção, é ocasionado pela acidificação do endossomo contendo partícula viral após endocitose. Análises de indução de fusão mediada por GP64 indicam que exposição ao pH 5,5 ou menor por 5 minutos é suficiente para acarretar fusão de membranas (BLISSARD; WENZ, 1992), indicando que o processo provavelmente ocorre no endossomo tardio (BLISSARD; THEILMANN, 2018).

Para avaliar se este mecanismo pode estar envolvido na atividade da GP de ATHOV-1 durante a entrada do vírus Ac-ATHOV $gp64^-$  em células de inseto, foi realizado ensaio de fusão de membranas mediado por pH. A acidificação do meio de cultura de células leva a ativação de GPs expostas na membrana plasmática de células infectadas, levando a formação de grandes células multinucleadas denominadas sincícios (LEIKINA; ONARAN; ZIMMERBERG, 1992).

Células infectadas com Ac-ATHOV $gp64^-$  submetidas a meio de cultura acidificado tiveram a formação de grandes sincícios indicando mecanismo semelhante de funcionamento da GP de ATHOV-1 no contexto de infecção por baculovírus (Figura 21).



**Figura 21.** GP de ATHOV-1 é capaz de induzir fusão de membrana de células de lepidóptera. Células Sf21 infectadas com vírus controle *Ac-REPgp64* e pelo vírus *Ac-ATHOVGPgp64-* após exposição a baixo pH. Sincícios estão indicados por setas brancas. Sobreposição de fluorescência e campo claro demonstra sincícios compostos por células que expressam o gene repórter eGFP. Barra de escala: 125  $\mu$ m.

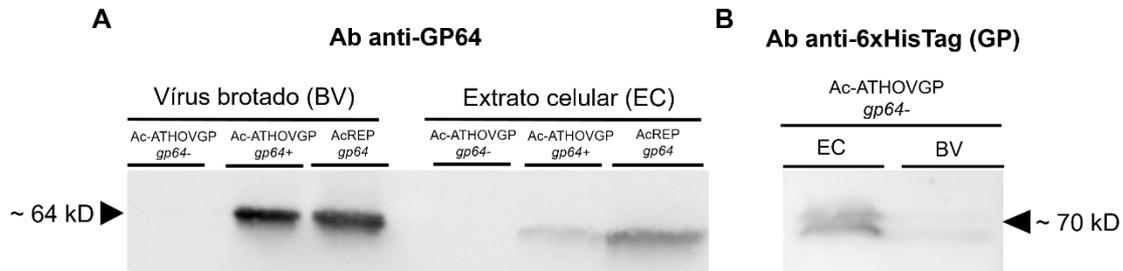
A indução da formação de sincícios em células infectadas com *Ac-ATHOVGPgp64-* só ocorreu após tempo suficiente para espalhamento da infecção (8 dpi), provavelmente devido a necessidade de contato físico próximo entre células infectadas expressando GP de envelope em quantidades suficientes para mediar a fusão entre células adjacentes.

## 5.7 Análise da expressão de proteínas por Western blot

Para o resgate da infectividade do *AcMNPV gp64 null* é esperado que a GP recombinante seja expressa por células infectadas, e incorporada ao envelope de virions em seu fenótipo vírus brotado (BV). Durante o ciclo de infecção de *AcMNPV* a proteína GP64 é adquirida pelo BV durante o processo brotamento da membrana plasmática, e também é determinante para eficiência deste processo (OOMENS; BLISSARD, 1999).

Análises de Western blot utilizando anticorpo contra cauda de histidina fusionada a GP de ATHOV-1 detectou a presença de proteína com peso molecular próximo ao esperado no extrato células infectadas, assim como em partículas virais concentradas do sobrenadante de cultura, indicando sua correta expressão e incorporação ao BV (Figura 22 B). Imunomarcagem utilizando anticorpo contra a proteína GP64 confirmam sua ausência tanto no extrato de células infectadas com vírus *Ac-ATHOVGPgp64-*, quanto

no concentrado de sobrenadante de cultura (BV), enquanto a presença de GP64 foi confirmada nos vírus contendo o gene (Figura 22 A).



**Figura 22.** Análise de expressão de proteínas por Western blot. Extrato de células Tn5B infectadas, e vírus brotados concentrados do sobrenadante de cultura (BV) marcados com anticorpos anti-GP64 (A) e anti-6xHisTag (B), indicando a expressão e incorporação de GP heteróloga ao BV.

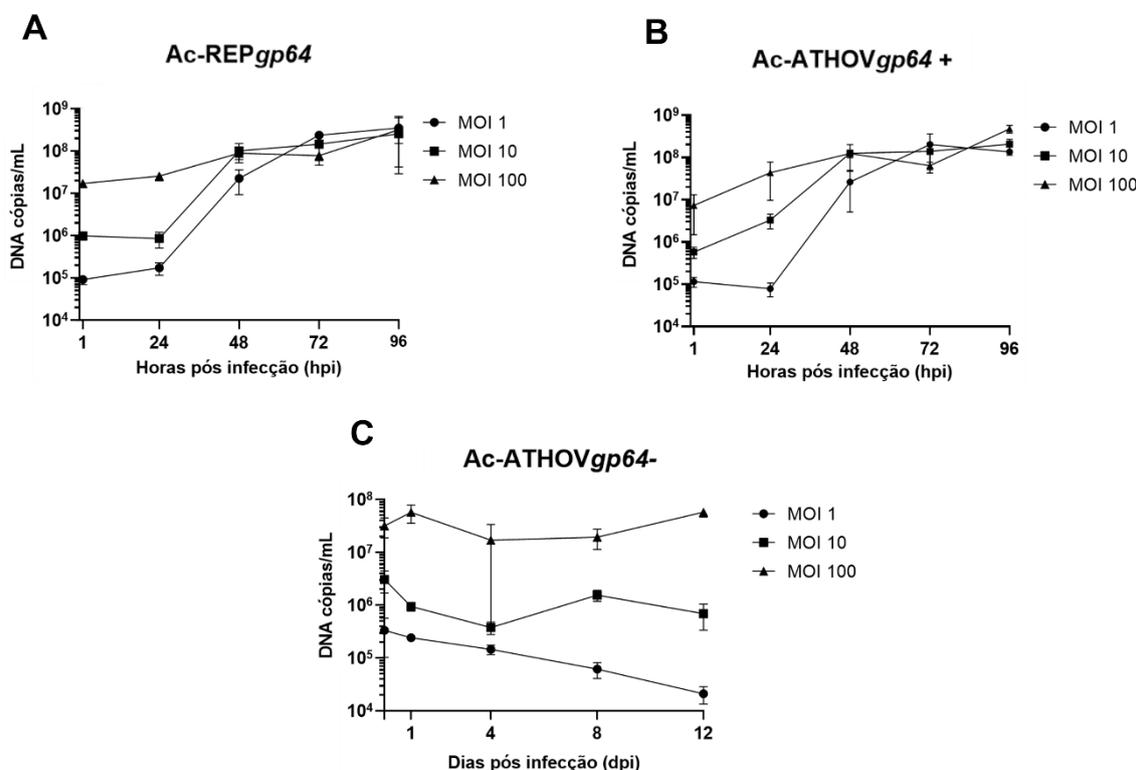
### 5.8 Cinética de replicação viral por qPCR

Foi realizado ensaio de PCR quantitativa (qPCR) para análise da cinética de replicação viral e produção de partículas virais. A curva de crescimento foi avaliada durante um período de 96 h para o vírus Ac-ATHOVGP*gp64+* (contendo ambos *gp64* e EFP de ATHOV-1) e o vírus controle Ac-REP*gp64* (contendo apenas *gp64* nativa de AcMNPV). Esta cinética revelou um curso de infecção similar entre ambos os vírus, com cinética de produção de partículas virais comparáveis, e acúmulo de vírus brotados no sobrenadante de cultura em quantidades de  $\sim 5 \times 10^8$  cópias de DNA/mL (

Figura 23 A e B). O curso de infecção do vírus Ac-ATHOVGP*gp64-* (Contendo apenas a EFP de ATHOV-1) foi avaliado durante um período de 12 dias, em função de menor velocidade de espalhamento da infecção. Interessantemente, foi observado que a

quantidade de cópias do genoma viral no sobrenadante de cultura se manteve estável ao longo do curso da infecção em MOI 100 e 10, e apresentou leve queda em MOI 1 (

Figura 233 C).



**Figura 23.** Curva de crescimento por qPCR. Células Sf21 foram infectadas em diferentes MOIs (1, 10 e 100) e carga viral do sobrenadante de cultura analisado em 5 tempos pós infecção. Quantificação absoluta de vírus controle reparado (A), AcMNPV contendo *gp64* e GP de ATHOV-1 (B) e vírus com apenas GP de ATHOV-1 (C).

Essa observação indica que apesar da produção de partículas virais infecciosas no sobrenadante de cultura e espalhamento da infecção *in vitro*, não há acúmulo de grandes quantidades de BV extracelulares. Um mecanismo de infecção célula a célula por contato entre células adjacentes, mediado pela EFP de ATHOV-1 pode estar envolvido no espalhamento da infecção, corroborando o padrão de progressão lento, e a ocorrência de focos de infecção isolados observados em cultura.

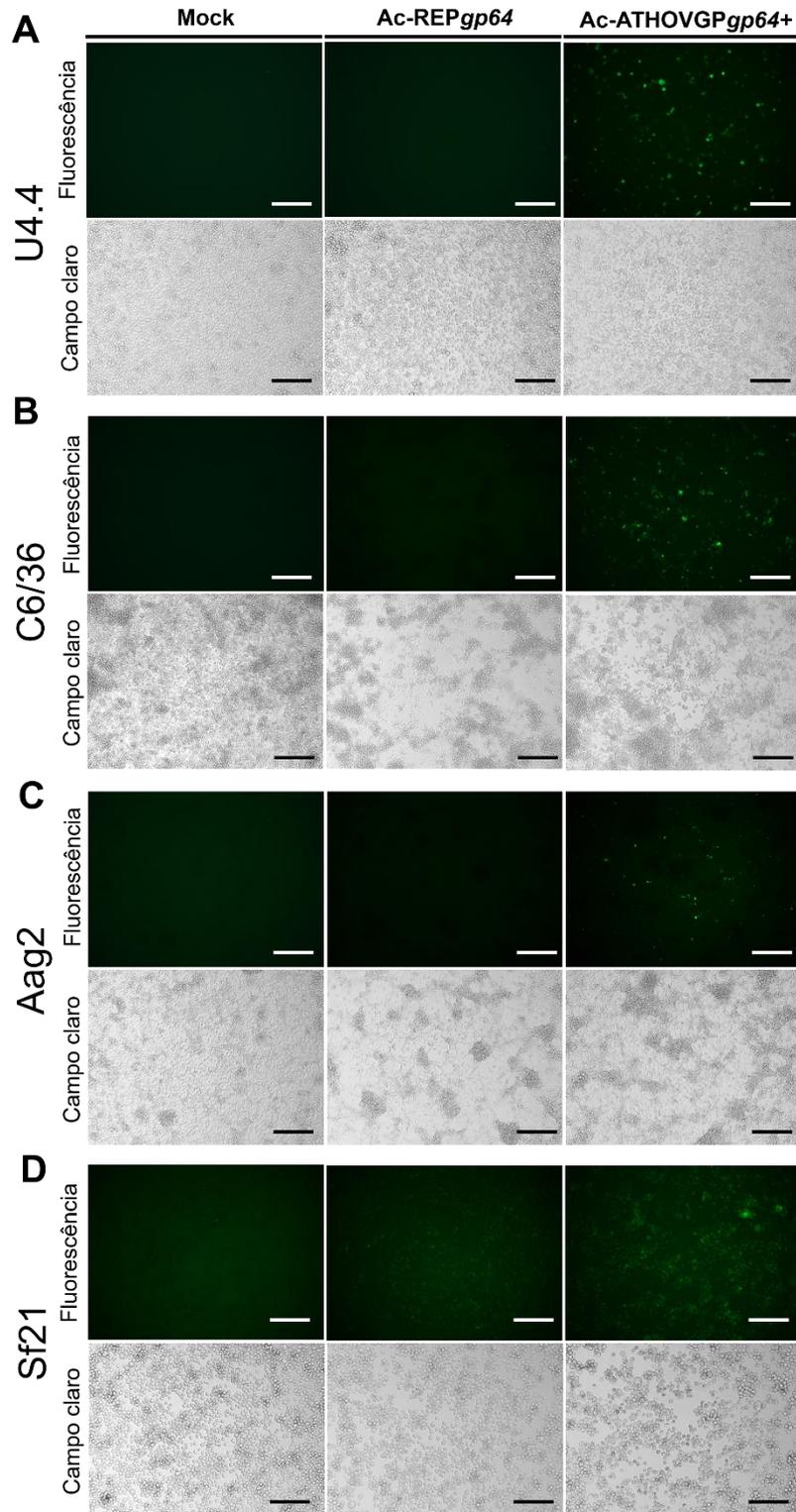
## 5.9 Transdução em linhagens celulares de mosquito

A capacidade de entrada promíscua do AcMNPV em diversas linhagens celulares, não tão somente em linhagens de lepidóptera permissivas a sua replicação, possibilita sua utilização para a entrega de genes e produção de proteínas em uma ampla variedade de

linhagens celulares (MANSOURI; BERGER, 2018). Desta forma, a incorporação de EFPs de outros vírus ao envelope de AcMNPV já vem sendo explorada como uma forma de aumentar sua eficiência de entrada e de entrega gênica (*gene delivery*), especialmente em linhagens celulares de mamífero (BARSOUM et al., 1997; HU et al., 2019; KOLANGATH et al., 2014; TANI et al., 2003). Hu et al. (2019) reportou baculovírus AcMNPV pseudotipados com GP de THOV e DHOV foram capazes de aumentar a sua taxa de transdução de 4 a 12 vezes em seis linhagens de mamífero testadas, se comparado ao vírus AcMNPV selvagem.

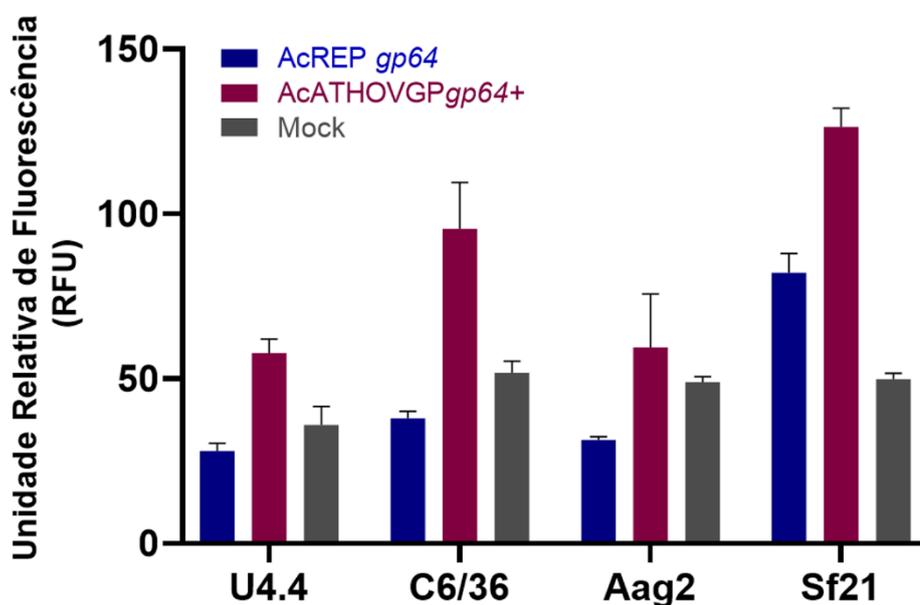
Linhagens celulares de mosquito apresentam diversas vantagens de cultivo, especialmente seu custo reduzido, crescimento em altas densidades, sem necessidade de atmosfera controlada e com maior tolerância a variação de temperatura (KURTTI; MUNDERLOH, 1984). Além disso, a expressão de genes exógenos nestas linhagens é um método utilizado para o estudo de vias metabólicas e repostas celulares a infecções virais e outros fatores estressores (GU et al., 2011; LOMBARDO et al., 2009; NANDA et al., 2009).

Sendo assim avaliamos a capacidade da EFP de ATHOV-1 de aumentar a entrada de AcMNPV nas linhagens celulares de mosquitos C6/26, U4.4 e Aag2, não permissivas a sua replicação, assim como na linhagem permissiva Sf21. Para avaliar a capacidade de entrada e transdução nestas linhagens, a expressão de eGFP foi avaliada sob o controle do promotor *ie1* de AcMNPV, ativo em células de mosquito (ANDERSON et al., 2010). O vírus Ac-ATHOVGP $gp64+$  apresentou maiores níveis de transdução do gene repórter eGFP em todas as linhagens testadas, sendo observado através de microscopia de fluorescência (Figura 24).



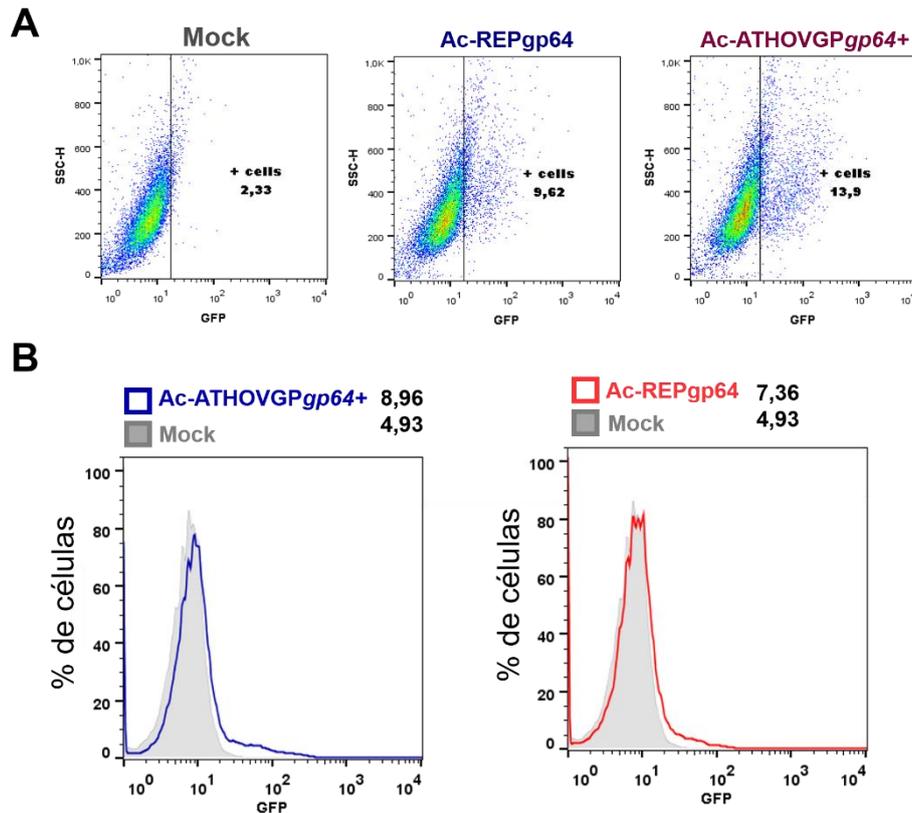
**Figura 24.** Microscopia de fluorescência de transdução em linhagens celulares de mosquito. Células U4.4 (A), C6/36 (B), Aag2 (C), e Sf21 (D), inoculadas em MOI 5 com vírus *Ac-REPgp64* e *AcATHOVGPgp64+*, e não infectadas (Mock) observadas por microscopia de campo claro e fluorescência para presença do gene repórter eGFP 48 hpi. Barra de escala: 250  $\mu$ m.

A eficiência de transdução foi quantificada através de ensaio de fluorimetria, sendo observado que a presença da EFP de ATHOV-1 (*AcATHOVGPgp64+*) levou ao aumento da produção de eGFP todas linhagens testadas, sendo maior aumento relativo visto em células C6/36 com de 2,5 vezes em relação ao vírus *AcREPgp64* (Figura 25).



**Figura 25.** A EFP de ATHOV-1 aumenta a eficiência de transdução em células de mosquito. Quantidade total de fluorescência emitida pela proteína repórter eGFP de células lisadas foi medida 48 hpi em MOI 5.

Para análise do aumento da proporção da população de células eGFP positivas transduzidas pelo vetor contendo a EFP de ATHOV-1, células C6/36 foram submetidas à análise por citometria de fluxo. Foi observado um aumento sutil na proporção de células GFP positivas transduzidas com o vírus *Ac-ATHOVGPgp64+* (13,9 %) em comparação ao vírus controle *Ac-REPgp64* (9,6 %) (Figura 266).

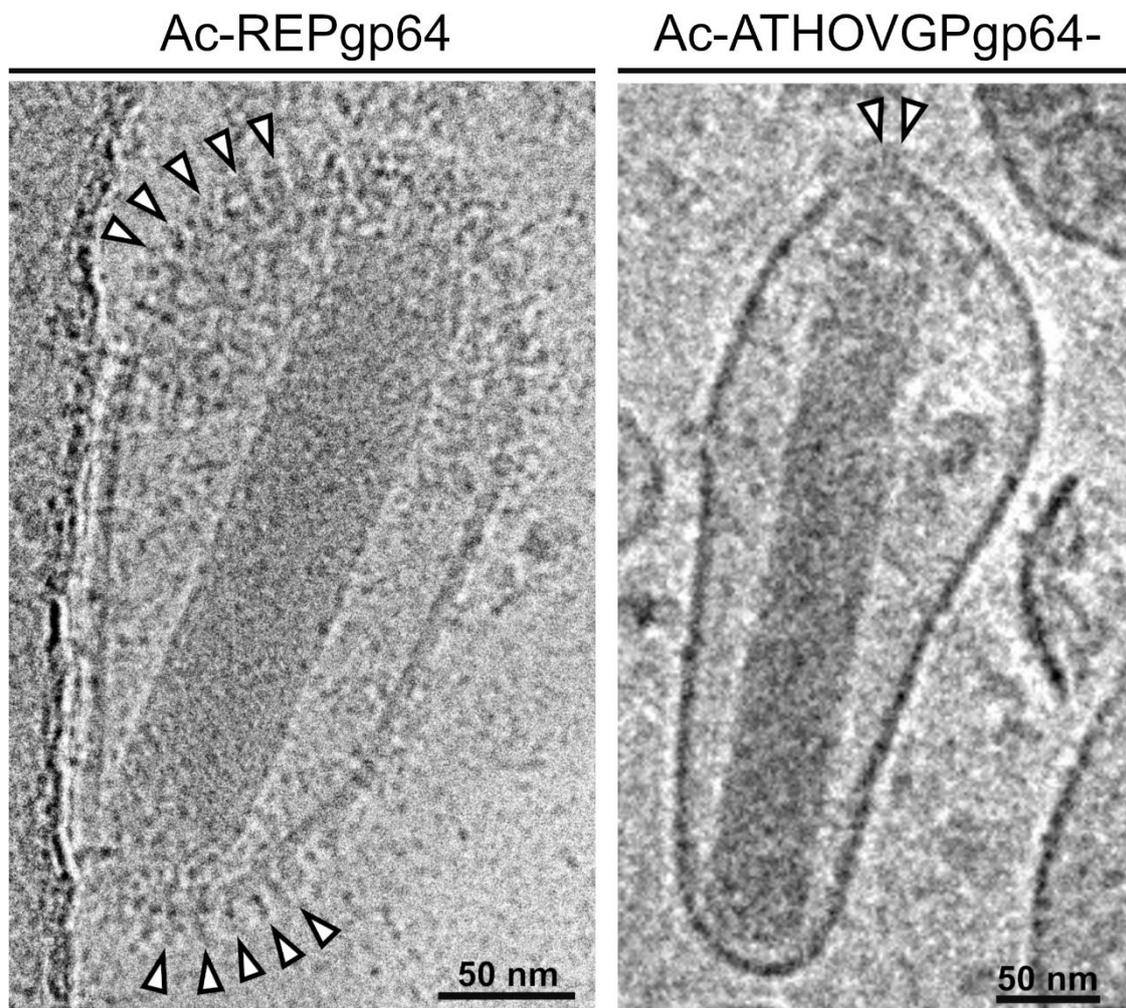


**Figura 26.** Análise de transdução em células C6/36 por citometria de fluxo. Células foram transduzidas em MOI 5 com vírus indicados e leitura realizada 48 hpi. **A)** Gráfico de dispersão indicando população de células GFP positivas transduzidas com vírus Ac-REPgp64 (9,6 %) e Ac-ATHOVGPgp64+ (13,9 %) **B)** Histograma ressaltando área sob pico de intensidade de GFP, indicando maior intensidade de fluorescência para Ac-ATHOVGPgp64+ (8,96) em relação a REPgp64 (7,36).

O aumento da eficiência de transdução utilizando o vetor AcMNPV contendo a EFP de ATHOV-1 foi observado nas três linhagens celulares de mosquito testadas, com o maior aumento relativo em células C6/36. Esta linhagem é particularmente capaz de crescer em alta confluência, tornando-a uma plataforma promissora para expressão de proteínas heterólogas quando combinada a elevada capacidade de transdução pelo vetor Ac-ATHOVGPgp64+. Baculovírus são capazes de comportar grandes sequências de DNA exógeno em seu genoma (~30 kbp) (HU; YAO; WU, 2008), tornando-o interessante para produção de complexos proteicos como *Virus Like Particles* (VLPs) com alto potencial vacinal (GOPAL; SCHNEEMANN, 2018; PIDRE et al., 2023), que pode ser explorada em células C6/36 utilizando o vetor Ac-ATHOVGPgp64+.

## 5.10 Análise ultraestrutural por criomicroscopia eletrônica

Vírus brotados de AcMNPV reparados para GP64 nativa e o vírus recombinante contendo apenas a GP de ATHOV-1 foram analisados por criomicroscopia eletrônica. Observou-se um nível significativamente menor de incorporação da EFP heteróloga de ATHOV-1 nos envelopes virais em comparação à GP64 do tipo selvagem (Fig. 27). Os BVs de AcREPgp64 apresentaram muitas cópias de peplômeros protuberantes bem definidos ao longo do envelope, enquanto as partículas virais de AcATHOVGPgp64- exibiram poucas ou nenhuma estrutura discernível correspondente à EFP de ATHOV-1 (Fig. 27). Quando presentes, essas estruturas estavam predominantemente localizadas nas extremidades dos BVs, de forma semelhante à distribuição observada para GP64 (WANG et al., 2016).

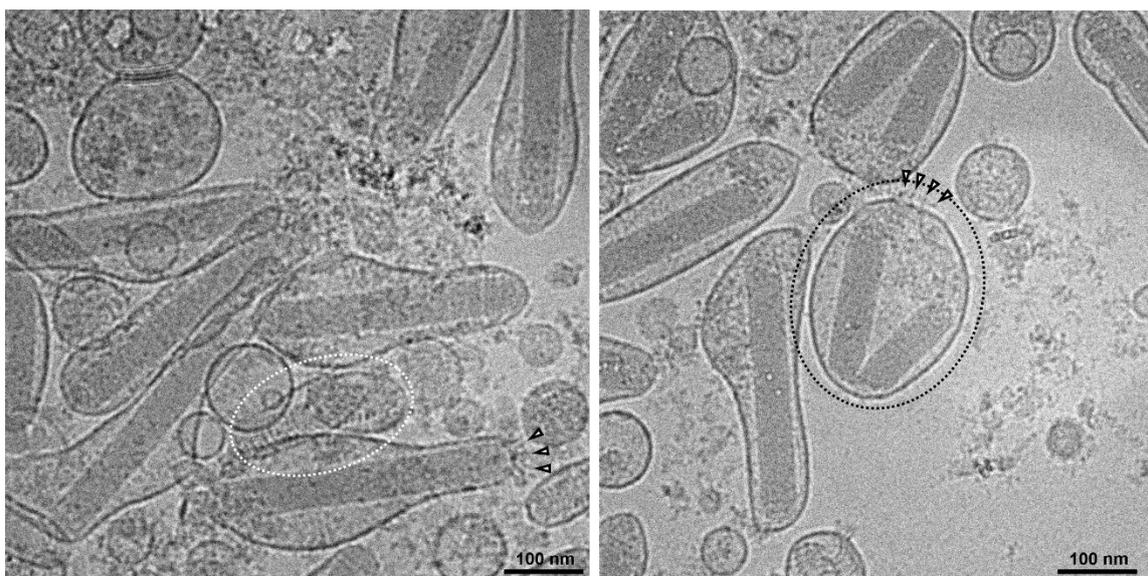


**Figura 27.** Comparação por Cryo-EM entre BV de AcMNPV deletado para *gp64*, resgatado com seu gene *gp64* nativo (Ac-REPgp64), e BV com a EFP heteróloga

ATHOV-1 (Ac-ATHOVgp64-). Setas brancas indicam peplômeros visíveis compostos por glicoproteínas do envelope.

Essa observação reforça os dados cinéticos de crescimento viral e sugere que um fator crítico para a capacidade das EFPs heterólogas resgatarem a infectividade de baculovírus *gp64* nulo é a eficiência de incorporação da EFP no envelope viral. Esse processo pode refletir eventos evolutivos necessários para a aquisição de *gp64* pelos baculovírus ancestrais do grupo G1- $\alpha$ .

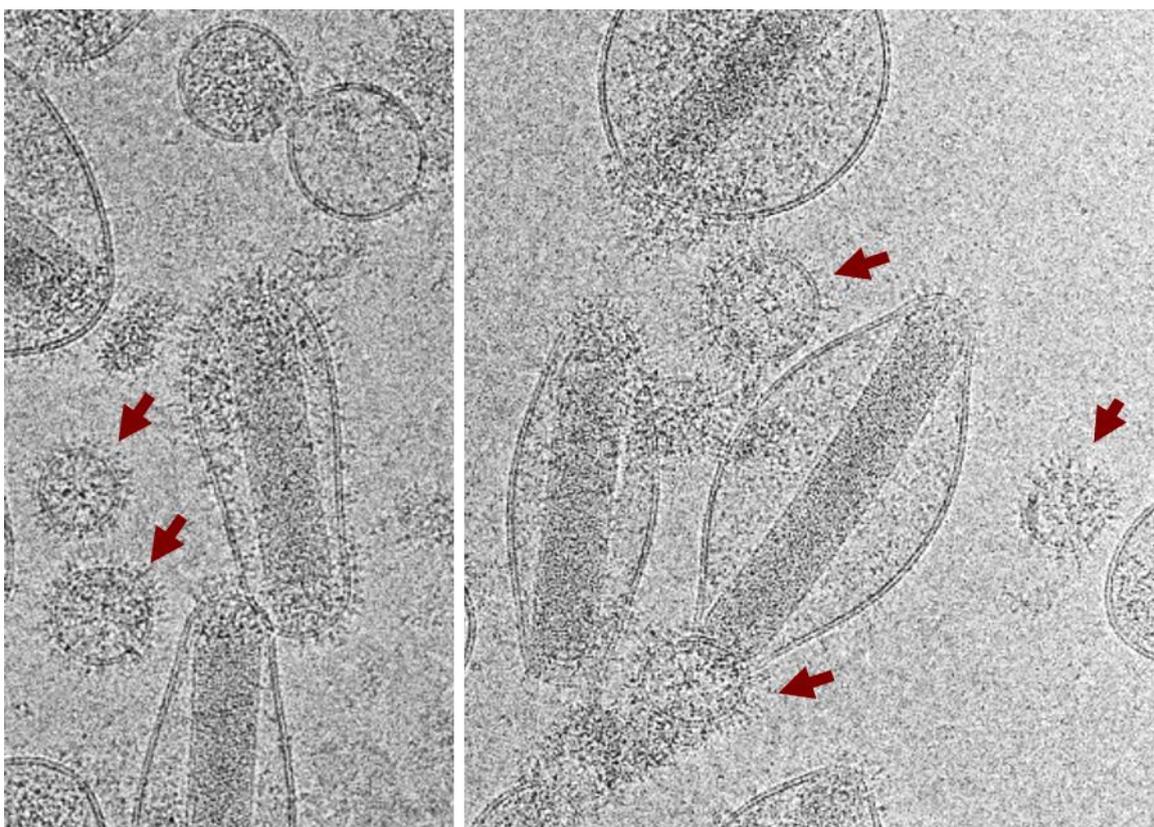
A análise ultraestrutural dos vírus brotados identificados neste trabalho replicou diversas características descritas previamente em estudos de baculovírus por Cryo-EM (WANG et al., 2016). Entre essas características, destaca-se a presença de virions com laterais alongadas, nucleocapsídeos em conformação relaxada e BVs contendo múltiplos capsídeos (Fig. 28). No trabalho de Wang et al. (2016), foi evitada a ultracentrifugação de partículas virais antes do processamento para Cryo-EM, devido a possibilidade de impactos na estabilidade e morfologia dos BVs. No entanto, nas análises conduzidas aqui, a morfologia geral de BVs permaneceu claramente discernível, assim como as mesmas estruturas relatadas por Wang et al. (2016), mesmo após utilização de ultracentrifugação em colchão de sacarose para concentração de partículas virais. Essas observações indicam que os BVs são estruturalmente estáveis e capazes de suportar o pré-processamento sem alterações morfológicas evidentes.



**Figura 28.** Micrografias de Cryo-EM de vírus brotados Ac-ATHOVgp64-. As setas brancas indicam peplômeros projetados do envelope viral, possivelmente compostos pela EFP de ATHOV-1. O círculo branco tracejado mostra uma partícula viral com

nucleocapsídeo em forma relaxada e o círculo preto tracejado indica uma partícula viral envelopada contendo dois nucleocapsídeos.

Além disso, as micrografias revelaram a presença de diversas vesículas membranosas compostas por bicamadas lipídicas presentes no sobrenadante de cultura infectada com o vírus Ac-REP $gp64$ . Interessantemente, muitas dessas estruturas exibiam projeções que se assemelham morfológicamente às EFPs presentes nos envelopes virais (Fig. 29).



**Figura 29.** Crioelétron micrografias de sobrenadante de cultura infectada com vírus Ac-REP $gp64$ . Setas vermelhas indicam vesículas membranosas com proteínas de superfície protuberantes.

Essa observação sugere a possibilidade de brotamento dessas vesículas de forma independente da interação direta com nucleocapsídeos virais. Isso levanta questões sobre o mecanismo pelo qual poderia esse brotamento poderia ocorrer, envolvendo a incorporação de glicoproteínas de fusão de membranas. É sabido que vírus podem induzir diversas alterações na dinâmica de membranas celulares durante o processo infeccioso, afetando também a resposta antiviral dos hospedeiros (DE ARMAS-RILLO et al., 2016). Proteínas virais, incluindo proteínas não estruturais, são capazes de interagir com

proteínas celulares de membrana e influenciar diretamente a produção de partículas virais (DASILVA et al., 2009). Portanto, é plausível que essas estruturas observadas desempenhem algum papel biológico durante o ciclo infeccioso, possivelmente interagindo com membranas células não infectadas e influenciando propagação do vírus de célula a célula. Contudo, experimentos específicos serão necessários para avaliar essa hipótese e elucidar a possível função dessas vesículas no contexto da infecção.

Durante o ciclo de infecção por baculovírus o brotamento e aquisição de glicoproteínas de envelope ocorrem na membrana plasmática das células hospedeiras (BLISSARD; THEILMANN, 2018), embora o mecanismo exato que induz o brotamento viral ainda não esteja completamente elucidado. No vírus AcMNPV foi identificado que, durante a fase tardia de infecção, uma proteína viral denominada Me53 se localiza na membrana plasmática de células infectadas, e requer a presença prévia de GP64 ancorada a essa membrana para formação de sítios de brotamento viral (JONG et al., 2011). O gene que codifica a proteína Me53 é altamente conservado e está presente na maioria dos baculovírus de lepidópteros. Sua deleção reduz drasticamente a produção de vírus brotados em cultura de células, em mais de 1000 vezes (DE JONG et al., 2009). No estudo de De Jong et al. (2011), foi observado que, em tempos tardios pós-infecção, Me53 forma focos distintos na membrana celular, cuja formação depende da presença de GP64 e colocaliza com essa glicoproteína. Essas observações sugerem que Me53 pode atuar como um intermediário funcional entre o envelope viral e o nucleocapsídeo de baculovírus. Nesse contexto, Me53 nos sítios de brotamento pode exercer uma função análoga à proteína de matriz de vírus da família *Orthomyxoviridae*, que também participa ativamente do processo de brotamento viral (ROSSMAN; LAMB, 2011).

Assim, uma hipótese para a formação das vesículas observadas seria a interação direta entre Me53 e GP64 na membrana plasmática, desencadeando o processo de brotamento de maneira independente da presença de nucleocapsídeos virais. Porém experimentos específicos são necessários para avaliar essa possibilidade.

No contexto da aquisição de GP64 pelos alphabaculovírus do grupo I, é plausível que uma compatibilidade mínima entre a proteína GP64 e Me53 fosse necessária para permitir a incorporação de GP64 no envelope viral. Essa compatibilidade teria conferido uma vantagem evolutiva, facilitando a fixação dessa glicoproteína na população viral e contribuindo para o sucesso adaptativo dos alphabaculovirus do grupo I.

## 6. Conclusões

Neste trabalho, descrevemos o primeiro thogotovirus identificado em um hospedeiro lepidóptero, que pode representar o membro mais próximo do ancestral responsável pela origem da GP64 nos alphabaculovirus do grupo I. A glicoproteína de envelope desse thogothovirus não foi capaz de substituir funcionalmente a GP64 em baculovírus, sugerindo que, apesar do alto grau de identidade, diferenças em resíduos-chave são determinantes para essa capacidade funcional.

Por outro lado, demonstramos que a inserção da sequência codificadora da glicoproteína de envelope do *Apis thogotovirus 1* (recentemente descoberto em abelhas) no genoma de um baculovírus desprovido do gene *gp64*, foi suficiente para restaurar sua infectividade *in vitro*. Esses dados fornecem evidências experimentais adicionais que reforçam a hipótese que a glicoproteína de envelope GP64 dos alphabaculovirus do grupo I se originou por meio de um evento de transferência horizontal de genes, possivelmente durante coinfeção envolvendo ancestrais distantes de baculovírus e thogotovírus.

Esses achados contribuem para o entendimento da complexa história evolutiva compartilhada pelas glicoproteínas de envelope desses vírus filogeneticamente distantes. Ainda assim, muitas perguntas permanecem sobre os ancestrais mais recentes desses vírus e sobre as interações ecológicas que levaram a emergência de *gp64* em baculovírus.

## 7. Referências

- ANDERSON, M. A. E. et al. Validation of novel promoter sequences derived from two endogenous ubiquitin genes in transgenic *Aedes aegypti*. **Insect Molecular Biology**, v. 19, n. 4, p. 441–449, 2010.
- ARDISSON-ARAÚJO, D. M. P. et al. A Betabaculovirus-Encoded gp64 Homolog Codes for a Functional Envelope Fusion Protein. **Journal of Virology**, v. 90, n. 3, p. 1668–1672, 1 fev. 2016.
- BACKOVIC, M.; JARDETZKY, T. S. Class III viral membrane fusion proteins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 19, n. 2, p. 189–196, abr. 2009.
- BARSOUM, J. et al. Efficient transduction of mammalian cells by a recombinant baculovirus having the vesicular stomatitis virus G glycoprotein. **Human Gene Therapy**, v. 8, n. 17, p. 2011–2018, 20 nov. 1997.
- BEAS-CATENA, A. et al. Baculovirus biopesticides: An overview. **Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 24, n. 2, p. 362–373, 2014.
- BEITZ, E. TeXshade: shading and labeling of multiple sequence alignments using LaTeX2e. **Bioinformatics**, v. 16, n. 2, p. 135–139, 1 fev. 2000.
- BERGKESSEL, M.; GUTHRIE, C. Colony PCR. Em: **Methods in Enzymology**. [s.l.] Academic Press Inc., 2013. v. 529p. 299–309.
- BLISSARD, G. W.; THEILMANN, D. A. Baculovirus Entry and Egress from Insect Cells. **Annual Review of Virology**, v. 5, n. 1, p. 113–139, 2018.
- BLISSARD, G. W.; WENZ, J. R. Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. **Journal of Virology**, v. 66, n. 11, p. 6829–6835, nov. 1992.
- BOUCKAERT, R. et al. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. **PLOS Computational Biology**, v. 15, n. 4, p. e1006650, 8 abr. 2019.
- BUCHFINK, B.; REUTER, K.; DROST, H.-G. Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND. **Nature Methods**, v. 18, n. 4, p. 366–368, abr. 2021.
- BUSHMANOVA, E. et al. maSPAdes: a de novo transcriptome assembler and its application to RNA-Seq data. **GigaScience**, v. 8, n. 9, p. giz100, 1 set. 2019.
- BUTENKO, A. M. et al. [Dhori virus--a causative agent of human disease. 5 cases of laboratory infection]. **Voprosy Virusologii**, v. 32, n. 6, p. 724–729, 1987.
- CABODEVILLA, O. et al. Occlusion body pathogenicity, virulence and productivity traits vary with transmission strategy in a nucleopolyhedrovirus. **Biological Control**, v. 56, n. 2, p. 184–192, 1 fev. 2011.

- CAPELLA-GUTIÉRREZ, S.; SILLA-MARTÍNEZ, J. M.; GABALDÓN, T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 25, n. 15, p. 1972–1973, 1 ago. 2009.
- CONDREAY, L. D.; BROWN, D. T. Exclusion of superinfecting homologous virus by Sindbis virus-infected *Aedes albopictus* (mosquito) cells. **Journal of Virology**, v. 58, n. 1, p. 81–86, abr. 1986.
- CONTRERAS-GUTIÉRREZ, M. A. et al. Sinu virus, a novel and divergent orthomyxovirus related to members of the genus *Thogotovirus* isolated from mosquitoes in Colombia. **Virology**, v. 501, p. 166–175, 15 jan. 2017.
- COX, M. M. J. Recombinant protein vaccines produced in insect cells. **Vaccine**, v. 30, n. 10, p. 1759–1766, 27 fev. 2012.
- DA SILVA, L. A. et al. Exploring viral infections in honey bee colonies: insights from a metagenomic study in southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2 ago. 2023.
- DARRIBA, D. et al. ModelTest-NG: A New and Scalable Tool for the Selection of DNA and Protein Evolutionary Models. **Molecular Biology and Evolution**, v. 37, n. 1, p. 291–294, jan. 2020.
- DASILVA, L. L. P. et al. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef Protein Targets CD4 to the Multivesicular Body Pathway. **Journal of Virology**, v. 83, n. 13, p. 6578–6590, jul. 2009.
- DE ARMAS-RILLO, L. et al. Membrane dynamics associated with viral infection. **Reviews in Medical Virology**, v. 26, n. 3, p. 146–160, maio 2016.
- DE JONG, J. et al. *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus me53 (ac140) Is a Nonessential Gene Required for Efficient Budded-Virus Production. **Journal of Virology**, v. 83, n. 15, p. 7440–7448, ago. 2009.
- DONG, S.; BLISSARD, G. W. Functional Analysis of the *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus GP64 Terminal Fusion Loops and Interactions with Membranes. **Journal of Virology**, v. 86, n. 18, p. 9617–9628, set. 2012.
- DRUMMOND, A. J. et al. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, n. 8, p. 1969–1973, ago. 2012.
- EDGAR, R. C. et al. Petabase-scale sequence alignment catalyses viral discovery. **Nature**, v. 602, n. 7895, p. 142–147, fev. 2022.
- EJIRI, H. et al. Characterization of a novel thogotovirus isolated from *Amblyomma testudinarium* ticks in Ehime, Japan: A significant phylogenetic relationship to Bourbon virus. **Virus Research**, v. 249, p. 57–65, 2 abr. 2018.
- FELBERBAUM, R. S. The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. **Biotechnology Journal**, v. 10, n. 5, p. 702–714, maio 2015.

- GOPAL, R.; SCHNEEMANN, A. Production and Application of Insect Virus-Based VLPs. Em: **Methods in Molecular Biology**. [s.l: s.n.]. v. 1776p. 125–141.
- GU, J. et al. Development of an Efficient Recombinant Mosquito Dengue Virus-Mediated RNA Interference System and Its Preliminary Application in Mosquito Control. **PLOS ONE**, v. 6, n. 6, p. e21329, 16 jun. 2011.
- GUO, J. et al. Structural transition of GP64 triggered by a pH-sensitive multi-histidine switch. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, p. 7668, 3 set. 2024.
- GUPTA, P. et al. A parasite odyssey: An RNA virus concealed in *Toxoplasma gondii*. **Virus Evolution**, v. 10, n. 1, p. veae040, 28 maio 2024.
- HAIG, D. A.; WOODALL, J. P.; DANSKIN, D. Thogoto Virus: a Hitherto Undescribed Agent Isolated from Ticks in Kenya. **Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 389–394, 1965.
- HARRISON, R. L. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Baculoviridae. **Journal of General Virology**, v. 99, n. 9, p. 1185–1186, 2018.
- HEFFERON, K. L. et al. Host Cell Receptor Binding by Baculovirus GP64 and Kinetics of Virion Entry. **Virology**, v. 258, n. 2, p. 455–468, 5 jun. 1999.
- HOPKINS, R. F.; ESPOSITO, D. A rapid method for titrating baculovirus stocks using the Sf-9 Easy Titer cell line. **BioTechniques**, v. 47, n. 3, p. 785–788, set. 2009.
- HSIEH, Y.-C. et al. Influenza Pandemics: Past, Present and Future. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 105, n. 1, p. 1–6, 1 jan. 2006.
- HU, L. et al. Improving Baculovirus Transduction of Mammalian Cells by Incorporation of Thogotovirus Glycoproteins. **Virologica Sinica**, v. 34, n. 4, p. 454–466, 2019.
- HU, Y.-C.; YAO, K.; WU, T.-Y. Baculovirus as an expression and/or delivery vehicle for vaccine antigens. **Expert Review of Vaccines**, v. 7, n. 3, p. 363–371, abr. 2008.
- ILYINYKH, A. V. Vertical Transmission of Baculoviruses. **Biology Bulletin**, v. 46, n. 3, p. 302–310, 1 maio 2019.
- JIANG, Y. et al. Evidence of a major role of GP64 in group I alphabaculovirus evolution. **Virus Research**, v. 142, n. 1, p. 85–91, 1 jun. 2009.
- JONG, J. DE et al. Immediate-Early Protein ME53 Forms Foci and Colocalizes with GP64 and the Major Capsid Protein VP39 at the Cell Membranes of *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus-Infected Cells. **Journal of Virology**, v. 85, n. 19, p. 9696, out. 2011.
- KADLEC, J. et al. The postfusion structure of baculovirus gp64 supports a unified view of viral fusion machines. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 15, n. 10, p. 1024–1030, out. 2008.
- KÄFER, S. et al. Re-assessing the diversity of negative strand RNA viruses in insects. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 12, p. e1008224, 12 dez. 2019.

- KATAOKA, C. et al. Baculovirus GP64-Mediated Entry into Mammalian Cells. **Journal of Virology**, v. 86, n. 5, p. 2610–2620, mar. 2012.
- KATOH, K.; ASIMENOS, G.; TOH, H. Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 537, p. 39–64, 2009.
- KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT: Iterative Refinement and Additional Methods. Em: RUSSELL, D. J. (Ed.). **Multiple Sequence Alignment Methods**. Totowa, NJ: Humana Press, 2014. p. 131–146.
- KOLANGATH, S. M. et al. Baculovirus mediated transduction: analysis of vesicular stomatitis virus glycoprotein pseudotyping. **Virusdisease**, v. 25, n. 4, p. 441–446, dez. 2014.
- KOSOY, O. I. et al. Novel Thogotovirus Associated with Febrile Illness and Death, United States, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 5, p. 760–764, maio 2015.
- KOST, T. A.; CONDREAY, J. P.; JARVIS, D. L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 5, p. 567–575, maio 2005.
- KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. Western Blotting: An Introduction. Em: KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. (Eds.). **Western Blotting: Methods and Protocols**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer, 2015. p. 17–30.
- KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G. Mosquito Cell Culture. Em: MARAMOROSCH, K. (Ed.). **Advances in Cell Culture**. [s.l.] Elsevier, 1984. v. 3p. 259–302.
- LAN, Q.; FALLON, A. M. Small heat shock proteins distinguish between two mosquito species and confirm identity of their cell lines. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 43, n. 6, p. 669–676, 1 dez. 1990.
- LEIKINA, E.; ONARAN, H. O.; ZIMMERBERG, J. Acidic pH induces fusion of cells infected with baculovirus to form syncytia. **FEBS Letters**, v. 304, n. 2–3, p. 221–224, 15 jun. 1992.
- LEVIN, S. et al. New Viruses from the Ectoparasite Mite *Varroa destructor* Infesting *Apis mellifera* and *Apis cerana*. **Viruses**, v. 11, n. 2, p. 94, 24 jan. 2019.
- LI, N. et al. Nationwide genomic surveillance reveals the prevalence and evolution of honeybee viruses in China. **Microbiome**, v. 11, n. 1, p. 6, 11 jan. 2023.
- LOMBARDO, F. et al. Analysis of apyrase 5' upstream region validates improved *Anopheles gambiae* transformation technique. **BMC Research Notes**, v. 2, n. 1, p. 24, 19 fev. 2009.
- LONG, G. et al. Functional Entry of Baculovirus into Insect and Mammalian Cells Is Dependent on Clathrin-Mediated Endocytosis. **Journal of Virology**, v. 80, n. 17, p. 8830–8833, set. 2006.

LUCKOW, V. A. et al. Efficient Generation of Infectious Recombinant Baculoviruses by Site-Specific Transposon-Mediated Insertion of Foreign Genes into a Baculovirus Genome Propagated in *Escherichia coli*. v. 67, n. 8, p. 4566–4579, 1993.

LUNG, O. et al. Pseudotyping *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AcMNPV): F proteins from group II NPVs are functionally analogous to AcMNPV GP64. **Journal of virology**, v. 76, n. 11, p. 5729–36, 2002.

LUNG, O. Y.; CRUZ-ALVAREZ, M.; BLISSARD, G. W. Ac23, an Envelope Fusion Protein Homolog in the Baculovirus *Autographa californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus, Is a Viral Pathogenicity Factor. **Journal of Virology**, v. 77, n. 1, p. 328–339, jan. 2003.

MANSOURI, M.; BERGER, P. Baculovirus for gene delivery to mammalian cells: Past, present and future. **Plasmid**, v. 98, n. May, p. 1–7, 2018.

MAREK, M. et al. Baculovirus VP80 protein and the F-actin cytoskeleton interact and connect the viral replication factory with the nuclear periphery. **Journal of Virology**, v. 85, n. 11, p. 5350–5362, jun. 2011.

MASUMOTO, M. et al. A Baculovirus Immediate-Early Gene, *ie1*, Promoter Drives Efficient Expression of a Transgene in Both *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e49323, 13 nov. 2012.

MISOF, B. et al. Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. **Science**, v. 346, n. 6210, p. 763–767, 7 nov. 2014.

MONSMA, S. A.; BLISSARD, G. W. Identification of a membrane fusion domain and an oligomerization domain in the baculovirus GP64 envelope fusion protein. **Journal of Virology**, v. 69, n. 4, p. 2583–2595, abr. 1995.

MOORE, D. L. et al. Arthropod-borne viral infections of man in Nigeria, 1964-1970. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 69, n. 1, p. 49–64, mar. 1975.

MORSE, M.; MARRIOTT, A.; NUTTALL, P. The glycoprotein of Thogoto virus (a tick-borne orthomyxo-like virus) is related to the baculovirus glycoprotein GP64. **Virology**, v. 186, n. 2, p. 640–646, 1992.

NAIK, N. G. et al. Baculovirus as an efficient vector for gene delivery into mosquitoes. **Scientific Reports**, v. 8, p. 17778, 12 dez. 2018.

NANDA, K. et al. A high capacity Alphavirus heterologous gene delivery system. **Virology**, v. 390, n. 2, p. 368–373, 1 ago. 2009.

OOMENS, A. G. P.; BLISSARD, G. W. Requirement for GP64 to Drive Efficient Budding of *Autographa californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus. **Virology**, v. 254, n. 2, p. 297–314, 15 fev. 1999.

PEARSON, M. N.; ROHRMANN, G. F. Transfer, Incorporation, and Substitution of Envelope Fusion Proteins among Members of the Baculoviridae, Orthomyxoviridae, and Metaviridae (Insect Retrovirus) Families. **Journal of Virology**, v. 76, n. 11, p. 5301–5304, jun. 2002.

- PENG, R. et al. Structures of human-infecting Thogotovirus fusogens support a common ancestor with insect baculovirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 42, p. E8905–E8912, 17 out. 2017.
- PIDRE, M. L. et al. The Magic Staff: A Comprehensive Overview of Baculovirus-Based Technologies Applied to Human and Animal Health. **Viruses**, v. 15, n. 1, p. 80, jan. 2023.
- RAMBAUT, A. et al. Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. **Systematic Biology**, v. 67, n. 5, p. 901–904, 1 set. 2018.
- REED, L. J.; MUENCH, H. A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS<sup>12</sup>. **American Journal of Epidemiology**, v. 27, n. 3, p. 493–497, maio 1938.
- RIBEIRO, B. M. et al. Baculovírus para expressão de proteínas recombinantes em células de insetos. **Biotecnologia aplicada à saúde-fundamentos e aplicações**, v. 2, p. 255, 2015.
- ROCHLIN, I.; TOLEDO, A. Emerging tick-borne pathogens of public health importance: a mini-review. **Journal of Medical Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 781–791, jun. 2020.
- ROHRMANN, G. F. **Baculovirus Molecular Biology**. 4th. ed. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 2019a.
- ROHRMANN, G. F. The baculovirus replication cycle: Effects on cells and insects. Em: **Baculovirus Molecular Biology [Internet]. 4th edition**. [s.l.] National Center for Biotechnology Information (US), 2019b.
- ROMIGUIER, J. et al. Comparative population genomics in animals uncovers the determinants of genetic diversity. **Nature**, v. 515, n. 7526, p. 261–263, nov. 2014.
- ROSSMAN, J. S.; LAMB, R. A. Influenza virus assembly and budding. **Virology**, Special Reviews Issue 2011. v. 411, n. 2, p. 229–236, 15 mar. 2011.
- SAHA, S.; DAVIS, W. W. The need for a One Health approach for influenza surveillance. **The Lancet Global Health**, v. 10, n. 8, p. e1078–e1079, 1 ago. 2022.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. **Molecular cloning: a laboratory manual**, n. Ed. 2, 1989.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, NY, 2001. v. 1
- SINGH, K. R. P. Cell Cultures Derived from Larvae of Aedes Albopictus (skuse) and Aedes Aegypti (l.). **Current Science**, v. 36, n. 19, p. 506–508, 1967.
- SREE, K. S.; VARMA, A. An Introduction to Entomopathogenic Microorganisms. Em: SREE, K. S.; VARMA, A. (Eds.). **Biocontrol of Lepidopteran Pests: Use of Soil Microbes and their Metabolites**. Soil Biology. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 1–10.

- SUMMERS, M. D. Milestones Leading to the Genetic Engineering of Baculoviruses as Expression Vector Systems and Viral Pesticides. Em: **Advances in Virus Research**. Insect Viruses: Biotechnological Applications. [s.l.] Academic Press, 2006. v. 68p. 3–73.
- TANI, H. et al. In Vitro and In Vivo Gene Delivery by Recombinant Baculoviruses. **Journal of Virology**, v. 77, n. 18, p. 9799–9808, 15 set. 2003.
- TEA, Y.-K. et al. Kleptopharmacophagy: Milkweed butterflies scratch and imbibe from Apocynaceae-feeding caterpillars. **Ecology**, v. 102, n. 12, p. e03532, 2021.
- TEUFEL, F. et al. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. **Nature Biotechnology**, v. 40, n. 7, p. 1023–1025, jul. 2022.
- THÉZÉ, J. et al. Paleozoic origin of insect large dsDNA viruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 38, p. 15931–15935, 20 set. 2011.
- TRAN, N. T. B. et al. Zoonotic Infection with Oz Virus, a Novel Thogotovirus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 28, n. 2, p. 436–439, fev. 2022.
- TREAT, A. E. **Mites of moths and butterflies**. [s.l.] Comstock Publishing Associates, Cornell University Press., 1975.
- VAN OERS, M. M. et al. Developments in the classification and nomenclature of arthropod-infecting large DNA viruses that contain pif genes. **Archives of Virology**, v. 168, n. 7, p. 182, 2023.
- VAN OERS, M. M.; VLAK, J. M. Baculovirus genomics. **Current Drug Targets**, v. 8, n. 10, p. 1051–1068, out. 2007.
- VAUGHN, J. L. et al. The establishment of two cell lines from the insect spodoptera frugiperda (lepidoptera; noctuidae). **In Vitro**, v. 13, n. 4, p. 213–217, 1977.
- WANG, M. et al. Unraveling the Entry Mechanism of Baculoviruses and Its Evolutionary Implications. **Journal of Virology**, v. 88, n. 4, p. 2301–2311, 15 fev. 2014.
- WANG, Q. et al. Budded baculovirus particle structure revisited. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 134, p. 15–22, fev. 2016.
- WANG, R. et al. Proteomics of the Autographa californica Nucleopolyhedrovirus Budded Virions. **Journal of Virology**, v. 84, n. 14, p. 7233–7242, 15 jul. 2010.
- WICKHAM, T. J. et al. Screening of Insect Cell Lines for the Production of Recombinant Proteins and Infectious Virus in the Baculovirus Expression System. **Biotechnology Progress**, v. 8, n. 5, p. 391–396, 1992.
- WILLIAMS, T. et al. Covert Infection of Insects by Baculoviruses. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.
- YU, Q. et al. Critical Residues and Contacts within Domain IV of Autographa californica Multiple Nucleopolyhedrovirus GP64 Contribute to Its Refolding during Membrane Fusion. **Journal of Virology**, v. 94, n. 19, p. 10.1128/jvi.01105-20, 15 set. 2020.



## Experimental and evolutionary evidence for horizontal transfer of an envelope fusion protein gene between thogotoviruses and baculoviruses

Bruno Milhomem Pilati Rodrigues,<sup>1</sup> Luis Janssen,<sup>1</sup> Leonardo Assis da Silva,<sup>1</sup> Suzane Suliane Vitorino Gomes Acacio,<sup>1</sup> Mariana Tigano Magalhães,<sup>1</sup> Bergmann Morais Ribeiro<sup>1</sup>

**AUTHOR AFFILIATION** See affiliation list on p. 17.

**ABSTRACT** Baculoviruses are insect-specific viruses with large, double-stranded DNA genomes classified into four genera. Alphabaculoviruses, which infect lepidoptera, are further divided into group I (G1- $\alpha$ ) and group II (G2- $\alpha$ ). The GP64 protein, essential for cell attachment and viral entry in G1- $\alpha$  baculoviruses, is thought to have originated through horizontal gene transfer (HGT) from thogotoviruses (family *Orthomyxoviridae*). This study investigates the functional substitution of GP64 by thogotovirus fusion proteins. Through RNA-seq data mining, we identified a novel thogotovirus, *Melitaea didyma* thogotovirus 1 (MediTHOV-1), in lepidopteran hosts. Phylodynamic analysis of G1- $\alpha$  baculovirus and thogotovirus glycoproteins suggests that the HGT event occurred during the Mesozoic era. To test functional substitution, we constructed recombinant *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) carrying either the envelope fusion protein (EFP) genes from MediTHOV-1 or *Apis* thogotovirus 1 (ATHOV-1), while deleted for its native *gp64* gene. Our results show that, while the MediTHOV-1 glycoprotein failed to rescue AcMNPV infectivity, the ATHOV-1 fusion protein (EFP) partially restored infectivity, albeit with reduced efficiency. Cryo-electron microscopy revealed lower incorporation of ATHOV-1 EFP into viral envelopes compared to GP64. The recombinant AcMNPV carrying ATHOV-1 EFP (Ac-ATHOVGPgp64 $\Delta$ ) displayed delayed replication kinetics and lower viral titers. Interestingly, ATHOV-1 EFP significantly enhanced baculovirus entry and gene transduction in mosquito cells. These findings provide experimental support for the HGT hypothesis, demonstrating the functional incorporation of a thogotovirus glycoprotein into a baculovirus. This study sheds light on the evolutionary relationship between baculovirus GP64 and glycoproteins, offering insights into viral evolution and potential biotechnological applications in gene delivery and protein expression.

**IMPORTANCE** Baculoviruses are widely utilized for the biological control of insect pests and as versatile biotechnological tools, with their effectiveness largely dependent on the activity of their envelope fusion proteins (EFPs). Thogotoviruses, in contrast, are emerging vector-borne pathogens of significant concern. In this study, we present the first successful functional substitution of the baculovirus GP64 protein with a thogotovirus EFP, alongside the identification of what appears to be a lepidopteran-associated thogotovirus, *Melitaea didyma* thogothovirus 1. Our work provides functional and phylogenetic insights into the evolutionary relationship between these distantly related viral groups, particularly the hypothesized horizontal gene transfer event that gave rise to baculoviral *gp64* gene. These findings offer a deeper understanding of the determinants underlying the adaptation of baculoviral glycoproteins to novel hosts. Furthermore, the discovery of novel viral genes highlights promising opportunities for

**Editor** Monique M. van Oers, Wageningen University & Research, Wageningen, Netherlands

Address correspondence to Bergmann Morais Ribeiro, [bergmann@unb.br](mailto:bergmann@unb.br).

Bruno Milhomem Pilati Rodrigues and Luis Janssen contributed equally to this article. Author order was determined based on the fact that the work is part of the Ph.D. thesis of the first author.

The authors declare no conflict of interest.

See the funding table on p. 17.

**Received** 3 December 2024

**Accepted** 24 May 2025

**Published** 25 June 2025

Copyright © 2025 Milhomem Pilati Rodrigues et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

biotechnological advancements, including the development of enhanced baculovirus-based gene delivery systems and tools for protein expression.

**KEYWORDS** horizontal gene transfer, baculovirus GP64 protein, thogotovirus fusion proteins, viral evolution and phylogenetics, biotechnological applications in gene delivery

Baculoviruses are insect-specific viruses with large double-stranded DNA genomes that contain numerous genes derived from exogenous sources, including their hosts and of other co-infecting viruses (1, 2). These genes have come to perform a variety of fundamental functions such as control of host physiology (3, 4) and modulation of apoptosis (5, 6), contributing to a complex and rich evolutionary history. The *Baculoviridae* family is divided into four genera, whose members infect insects in different orders: members of the *Alphabaculovirus* and *Betabaculovirus* genera infect lepidopterans, *Gammabaculovirus* members infect hymenoptera, while *Deltabaculovirus* members infect dipterans. Alphabaculoviruses can be phylogenetically further divided into group I (G1- $\alpha$ ) and group II (G2- $\alpha$ ) (7). During the replication of alphabaculoviruses and betabaculoviruses in susceptible insects, two viral phenotypes are produced: the budded virus (BV), which is responsible for cell-to-cell spread of infection within insect larvae, and the occlusion-derived virus (ODV), which is responsible for the infection from insect to insect (8). The major envelope fusion protein of G1- $\alpha$  baculoviruses is GP64 (herein referred to simply as GP64), present on the surface of the BV phenotype, while the F (fusion) protein is the major EFP of G2- $\alpha$  and betabaculoviruses (9). These proteins are crucial for cell attachment, viral entry, and efficient budding from infected insect cells (8, 10, 11).

The *Thogotovirus* genus belongs to the *Orthomyxoviridae* family, a group of segmented negative single-stranded RNA viruses, the latter being widely known for including the influenza viruses (12). Most thogotovirus members have been found in ticks, while a minority of thogotoviruses have also been isolated from mosquitoes (13–16). Albeit this host representation may be biased toward vectors of viral diseases (17), some representatives of the genus, such as *Thogotovirus thogoto* (THOV) and viruses from the Dhori group, have been associated with zoonotic diseases, experimental infections in mice and naturally infected humans, including fatal human cases (16, 18–20), raising concerns about zoonotic outbreaks of thogotovirus infection. Their genomes are usually composed of six segments: three coding for subunits of an RNA-dependent RNA polymerase complex (PB2, PB1, and PA) and three coding for structural components (nucleocapsid protein NP, matrix protein M, and glycoprotein GP).

GP64 is structurally related to the class III viral fusion proteins, such as the G proteins of rhabdoviruses, the gB proteins of herpesviruses, and the glycoproteins (GPs) of thogotoviruses (21–23). Previous studies suggest that the GP64 of baculoviruses may have originated from a horizontal gene transfer (HGT) event from a thogotovirus (24, 25). This hypothesis is supported by the sequence homology and structural similarity between the envelope fusion proteins of these groups (Fig. S1) (24, 25). Additionally, GP-based phylogenies of thogotoviruses consistently group these viruses with G1- $\alpha$  baculoviruses, more closely than with other members of the *Orthomyxoviridae* family, with Sinu virus clustering with baculoviral sequences (25). Therefore, if this horizontal gene transfer event occurred, one could hypothesize that extant thogotovirus fusion proteins could remain functional within the context of a baculovirus infection, potentially substituting GP64 in extant baculoviruses for entry into susceptible insect cells.

To test this possibility, previous research has shown that the fusion proteins of Thogoto virus (26, 27) and Dhori virus (27), when incorporated into the genome of a baculovirus, could not rescue the infectivity of the baculovirus *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) when its native *gp64* gene was deleted.

We hypothesize that if an HGT event occurred, it likely took place during co-infection of a shared host between alphabaculoviruses and orthomyxoviruses. A recently

identified thogotovirus, tentatively named *Apis thogotovirus 1* (ATHOV-1) or *Varroa orthomyxovirus-1* (VOV-1), has been detected in both *Apis mellifera* and the ectoparasitic mite *Varroa destructor* (28–30). Importantly, ATHOV-1 sequences were found in metagenome data sets from *A. mellifera* samples that lacked any reads corresponding to *V. destructor* or other common ectoparasites (28), indicating that bees themselves are likely the primary hosts of this virus. These findings support the hypothesis that ATHOV-1 is a bee-associated virus capable of infecting other invertebrates. These ecological overlaps with lepidopteran hosts may have facilitated the proposed gene transfer event. Furthermore, we utilized data mining in previously published RNA-seq data of the lepidopteran *Melitaea didyma* to describe the genome of a novel thogotovirus. Then, we performed phylogenetic analysis to estimate when this HGT event likely occurred.

To test the hypothesis that an insect thogotovirus fusion protein could functionally substitute GP64, we constructed recombinant AcMNPV lacking GP64 and containing the envelope glycoprotein gene of either *Melitaea didyma thogotovirus 1* or *Apis thogotovirus 1* (ATHOV-1) (28) and analyzed their infectivity in insect cells. We also evaluated the incorporation of EFPs into the viral envelope by cryo-electron microscopy (cryo-EM) and its effects in AcMNPV transduction efficiency *in vitro*.

## RESULTS

### *Melitaea didyma thogotovirus 1* (MediTHOV-1), a putative novel lepidopteran infecting thogotovirus

We first searched for thogotoviruses in lepidoptera-derived sequencing reads, by searching in the Serratus web platform (31) for RNA-dependent RNA polymerase motifs closely related to that of PB1 of Sinu virus. In doing so, we identified a near-complete and novel genome with six segments of a lepidopteran orthomyxovirus evolutionarily close to thogotovirus. This virus was named *Melitaea didyma thogotovirus 1* (MediTHOV-1). All segments showed an average read coverage greater than twenty. The genome comprises a total of 10,634 nucleotides, with the smallest segment containing 810 nucleotides (segment 6) and the largest containing 2,310 nucleotides (segment 1) (Table 1). The segments displayed conserved terminal sequences, specifically 3'AAAAA[T/C]CTC TTTGTTACTACTCCCG and 5'AGTAGTAACAAGAG[G/A]TTA.

In phylogenetic analyses of the proteins encoded by segments among members of the *Orthomyxoviridae* family, all proteins of MediTHOV-1 cluster with Sinu virus proteins (Fig. S2A through E). For the GP protein phylogeny (Fig. 1), sequences of AcMNPV and *Condylorrhiza vestigialis* MNPV (CoveMNPV) were included. In this latter phylogeny, the GP protein of MediTHOV-1 groups with Sinu virus, albeit with low bootstrap values (Fig. 1). This clade clusters closely with G1- $\alpha$  baculoviruses, in a separated clade from that of other thogotoviruses, indicating their close phylogenetic relationship.

There is currently one known near-complete orthomyxovirus genome from Lepidoptera, Lepidopteran orthomyxo-related virus OKIAV178 (32). Nevertheless, phylogenetic analysis shows that this virus is evolutionary distant from the *Thogotovirus* genus.

### Phylogenetic analysis

In order to perform phylogenetic analysis of the shared history of alphabaculovirus and thogotovirus glycoproteins, we analyzed a data set comprising 30 glycoproteins, 27 from baculovirus species and the three most closely related thogotovirus glycoproteins, namely those of *Apis thogotovirus 1*, *Melitaea didyma thogotovirus 1*, and Sinu virus (Table S1). Moreover, we assumed a virus co-diverged with their hosts over geological time scales, a pattern commonly observed in the macroevolution of invertebrate virus macroevolution (33), documented for baculoviruses (34), and proposed as a working hypothesis for the order Articulavirales (35). Thus, we used a single calibration point corresponding to the estimated origin time of the Holometabola superorder, approximately 345 million years ago (mya) (36). For the resulting MCC tree, the 95% highest posterior densities (HPD) interval for the node height separating the alphabaculovirus and thogotovirus glycoproteins is 330–130 mya (Fig. 2).

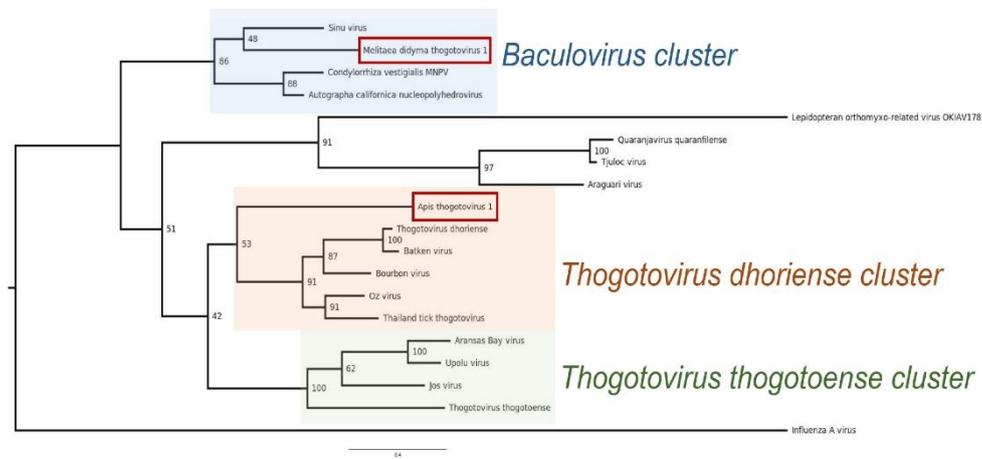
**TABLE 1** General characteristics of the genome of *Melitaea didyma* thogotovirus 1 (MediTHOV-1)

Genome segment, minimum coverage	Length (nts)	Length of 5' UTR	ORF (nts)	ORF (AAs)	Length 3' UTR	Thogotovirus homologous protein
S1, 22x	2,378	36	2,310 (37–2346)	769	32	PB2
S2, 46x	2,235	56	2,136 (57–2192)	711	43	PB1
S3, 59x	1,995	80	1,902 (81–1982)	633	13	PA
S4, 55x	1,419	29	1,380 (30–1409)	459	10	GP
S5, 26x	1,556	50	1,416 (51–1466)	471	90	NP
S6, 53x	1,051	79	810 (80–889)	269	162	M-like

Thezé et al. found a 95% HPD of 189–10 mya for the divergence between alphabaculovirus and betabaculovirus (37). Therefore, there is an overlap of HPDs for the origin of alphabaculoviruses and the acquisition of *gp64* of roughly 60 million years, which spans the late Jurassic to the early Cretaceous periods. This indicates a relatively early acquisition of the glycoprotein by the alphabaculoviruses that also happened during a time of radiation within holometabola, which in turn coincides with flowering plant diversification (36, 37).

**Recombinant virus constructs**

The GP64 envelope fusion protein is essential for the entry of its budded virus from G1- $\alpha$  baculoviruses into new cells and for the efficient budding from infected cells (8). We evaluated the ability of genes encoding for the EFP (fused with a C-terminal His-tag) of two thogotoviruses, one novel virus with a lepidopteran host and one with a hymenopteran host, to rescue the infectivity of an AcMNPV deleted for its native *gp64* gene. A bacmid named Ac-REPgp64, repaired for its native *gp64* gene, was used as infection control. Lepidopteran Sf21 cells were transfected with recombinant bacmids Ac-ATHOV-1 and Ac-MediTHOV-1 (Fig. 3), and the cell culture supernatant was passaged in Sf21 cells to evaluate the production of infectious BVs.



**FIG 1** Maximum likelihood phylogeny based on amino acid sequence of GP of *Melitaea didyma* thogotovirus 1, *Apis thogotovirus 1* and viral members of the *Orthomyxoviridae* and *Baculoviridae* families.

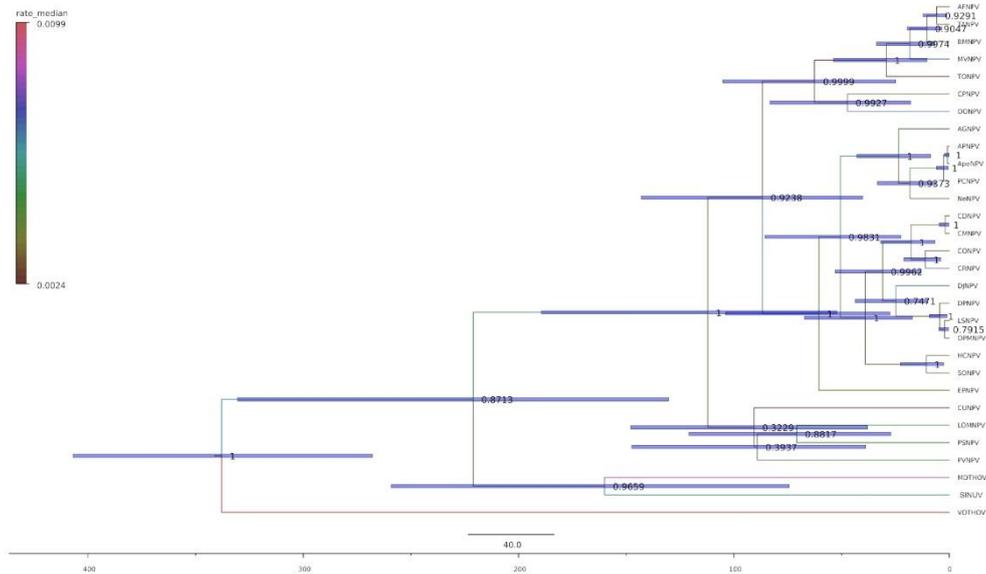


FIG 2 Temporal dynamics of glycoprotein evolution between thogotoviruses and alphabaculoviruses. Node bars depict the 95% HPD interval for age, node labels depict posterior probabilities, and the time axis is in millions of years ago (mya). Branch labels are colored by substitution rate median values.

### MediTHOV EFP infectivity rescue assays

Interestingly, despite the higher percentage of amino acid identity shared between MediTHOV EFP and baculovirus GP64, when compared to other thogotoviruses, this glycoprotein was unable to rescue AcMNPV *gp64 null* infectivity. The cell culture supernatant from Ac-MediTHOV $gp64\Delta$  transfection did not produce subsequent infection in either first (P1) or second (P2) passage in Sf21 cells (Fig. 4).

### ATHOV-1 EFP infectivity rescue assays

In contrast to the inability of MediTHOV EFP to functionally replace baculovirus native GP64, ATHOV-1 EFP could rescue the infectivity of AcMNPV deleted for its native *gp64* gene. The transfection of recombinant bacmid from Ac-ATHOVGP $gp64\Delta$  carrying ATHOV-1 EFP in the absence of native GP64 produced infectious virus particles that were able to produce infection and be serially passaged in Sf21 cells (Fig. 5A).

Lower viral titers were obtained from Ac-ATHOVGP $gp64\Delta$  serial infections, averaging around  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL, compared to the viruses containing *gp64*, AcTHOVGP $gp64+$  and Ac-REP $gp64$ , which had titers greater than  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/mL (Fig. 5B). The quantity of infectious viral particles obtained at 7 days post-transfection (P0) was below the limit of detection (LOD) of titration by the end-point dilution method. However, subsequent passages in Sf21 cells led to a considerable increase in viral titer in passages one (P1) and two (P2) (Fig. 5B).

It was consistently observed that higher titers of AcATHOV $gp64+$  compared to Ac-REP $gp64$  were obtained, indicating the possibility that the incorporation of the ATHOV-1 EFP in addition to native GP64 acts in a synergistic manner, increasing the efficiency of infectious BV particle production *in vitro* (Fig. 5C). Western blot using an antibody against the histidine tail fused to ATHOV-1 EFP detected the presence of a protein with a molecular mass of the expected size in the extract of infected cells and in

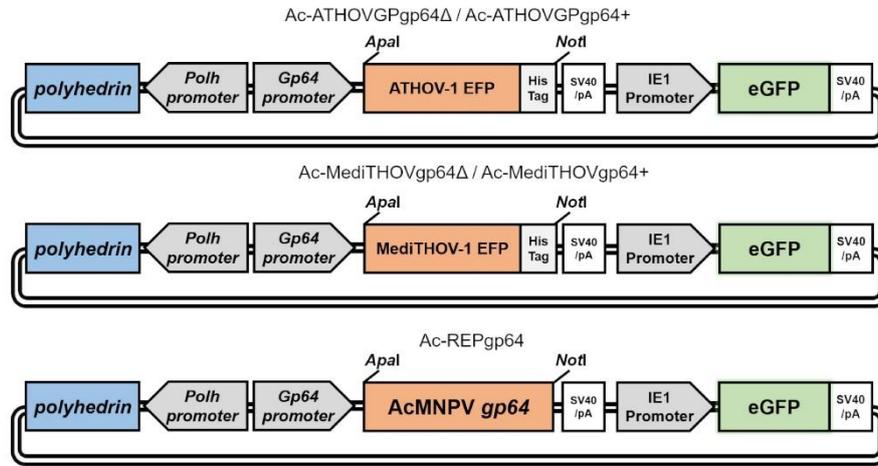


FIG 3 Schematic representation of bacmids Ac-ATHOV-1, Ac-MediTHOV-1, and Ac-REPgp64, constructed carrying heterologous EFP sequences from thogotoviruses, and of control bacmid carrying its native *gp64* gene. The scheme also shows representation of early and late infection reporter genes, eGFP and *polyhedrin*, respectively, as well as regulatory regions and restriction sites utilized for molecular cloning.

concentrated viral particles from the culture supernatant, indicating correct expression and incorporation into the BV (Fig. 5D and E). Immunolabeling using an antibody against the GP64 protein confirmed its absence both in the extract of cells infected with the Ac-ATHOVGPgp64 $\Delta$  virus and in the concentrated culture supernatant (BV) (Fig. 5D), while PCR confirmed the absence of *gp64* in deleted virus stock (Fig. 5F). In contrast, the presence of ATHOV-1 EFP was confirmed in recombinant viruses containing the gene, although at lower concentrations (Fig. 5E).

#### Ac-ATHOVGPgp64 $\Delta$ *in vitro* growth kinetics

The virus Ac-ATHOVGPgp64 $\Delta$  exhibited delayed replication kinetics compared to AcMNPV carrying GP64 (Fig. 6). Isolated foci of infection could be observed up to 8 dpi (Fig. 6B), indicating ATHOV-1 EFP ability to induce cell-to-cell spread of budded viruses, albeit with lower efficiency than viruses carrying GP64. This observation indicates that viral spread in culture may be more efficient between adjacent cells in close physical proximity.

The qPCR analysis indicates that large quantities of extracellular Ac-ATHOVGPgp64 $\Delta$  BVs do not accumulate over the infection course (Fig. 6C) when compared with the GP64 carrying viruses (Fig. 6D). The spread of the infection appears to involve a cell-to-cell infection mechanism mediated by ATHOV-1 EFP, corroborating the slow progression pattern and the occurrence of isolated infection foci observed in culture.

This extended infection kinetics *in vitro* was observed in all infections conducted in this study, with maximum spread in culture occurring on average between 12 and 14 dpi. Comparatively, *in vitro* infections by the wild-type AcMNPV (and by recombinants containing the *gp64* gene) show maximum infection spread at 24 hpi.

#### ATHOV-1 EFP is able to induce membrane fusion

During natural baculovirus infection, AcMNPV GP64 undergoes conformational changes in response to the acidification of late endosomes, catalyzing membrane fusion and virus release in the cytoplasm (23, 38). Cells infected with Ac-ATHOVgp64 $\Delta$  and subjected to acidified culture medium exhibited the formation of large syncytia, indicating a similar

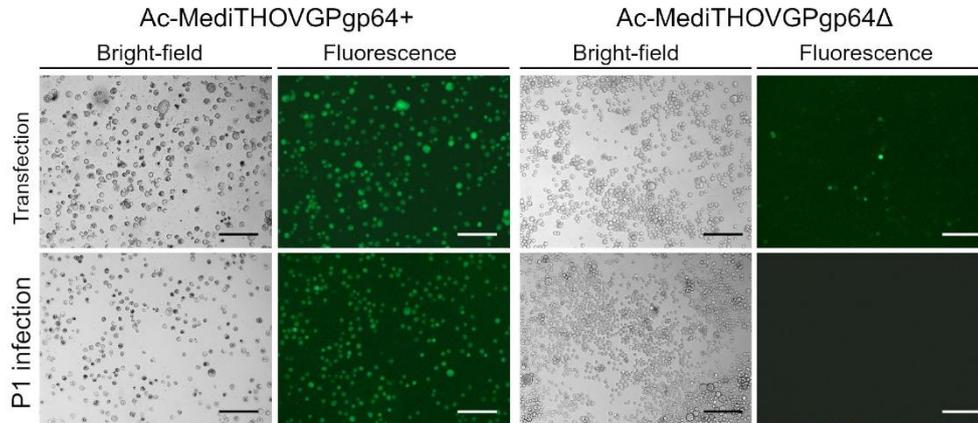


FIG 4 Fluorescence microscopy of Sf21 cells 7 days post-transfection (dpt) and 72 hours post-infection (hpi) of the first serial infection passage (P1) of Ac-MediTHOVgp64+ and 7 dpi of the virus Ac-MediTHOVgp64Δ. Scale bar is 250 μm.

mechanism of action as GP64 of the ATHOV-1 EFP in the context of baculovirus infection (Fig. 7).

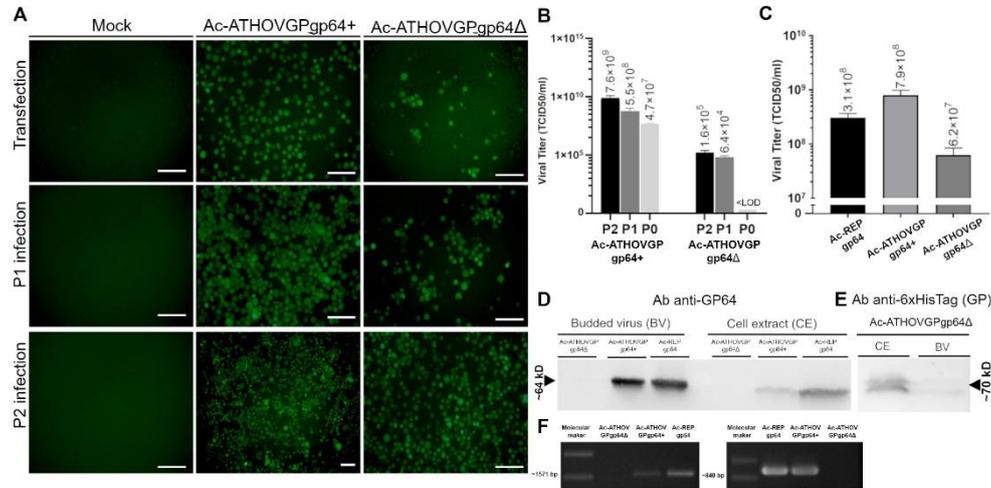
Induced syncytium formation only occurred after sufficient infection spread at 8 dpi, possibly due to the need for close physical contact between infected cells expressing ATHOV-1 EFP in sufficient quantities to mediate fusion between adjacent cell membranes.

#### Enhanced transduction in mosquito cells

The capability of AcMNPV to enter various cell lines and transiently transduce genes enables its use for gene delivery and protein production in a wide range of cell lines (39). We evaluated the capacity of ATHOV-1 EFP to enhance AcMNPV entry into the mosquito cell lines C6/36, U4.4, and Aag2, which are non-permissive to its replication, as well as into permissive Sf21 lepidopteran cell line. To assess entry and transduction capacity in these cell lines, we evaluated eGFP expression under the control of the AcMNPV *ie-1* early gene promoter, which is functional in mosquito cells (40). Interestingly, the Ac-ATHOVGPgp64+ virus showed higher levels of eGFP expression in most tested cell lines, as observed by fluorescence microscopy (Fig. S3). This suggests that the incorporation of the ATHOV-1 envelope fusion protein (EFP) enhances AcMNPV transduction efficiency. Quantification by fluorimetry confirmed significantly increased eGFP levels in C6/36, U4.4, and Sf21 cells when compared to Ac-REPgp64. In Aag2 cells, however, no statistically significant difference was observed despite a visually stronger fluorescence signal. This discrepancy between qualitative (microscopy) and quantitative (fluorimetry) data may reflect differences in cellular autofluorescence or protein expression thresholds across assays (Fig. 8).

#### Cryo-EM shows differential incorporation of EFPs in BV envelope

Cryo-EM analysis of BVs indicates a significantly lower level of incorporation of the heterologous ATHOV-1 EFP in viral envelopes, when compared to the wild-type GP64 (Fig. 9). Ac-REPgp64 BVs displayed many copies of protruding envelope peplomers, while viral particles of Ac-ATHOVGPgp64Δ showed very few copies of such structures composed of ATHOV-1 EFP, or no easily discernible spikes at all (Fig. 9; Fig. S3). When present, these structures localized in the extremities of BVs similarly to the localization of GP64 (40).



**FIG 5** (A) Serial infection showing that the envelope fusion protein of ATHOV-1 is able to rescue *gp64* null AcMNPV. Fluorescence microscopy of Sf21 cells 7 dpt, at 72 hpi of two serial infection passages (P1 and P2) of Ac-ATHOVGPgp64+, and at 7 dpi of the virus Ac-ATHOVGPgp64Δ. Scale bar: 125 μm. (B) Titer obtained from transfection (P0) at 7 days post-transfection (dpt) and from serial passages (P1 and P2) at 72 hours post-infection (hpi) for AcATHOVgp64+ and 7 days post-infection (dpi) for AcATHOVgp64Δ. LOD: limit of detection. (C) Titers obtained from infected Sf21 cells of AcATHOVgp64+ and Ac-REPgp64 at 72 hpi and AcATHOVgp64Δ at 14 dpi. (D) Western blot of the extract of infected Tn5B cells and budded viruses concentrated from the culture supernatant (BV) labeled with anti-GP64 antibodies and (E) antibodies against His-tagged ATHOV EFP. (F) PCR confirmation of the deletion of the *gp64* gene, using two *gp64* specific primer pairs, of recombinant virus stocks.

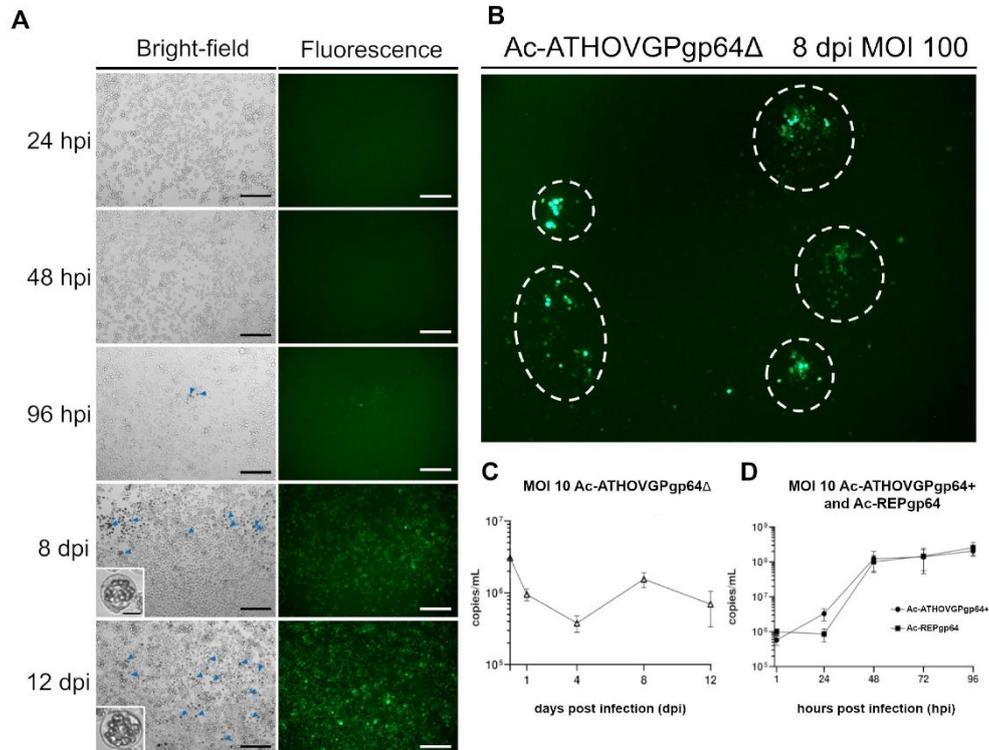
This observation corroborates the viral growth kinetic data and suggests that the critical factor for the capacity of heterologous EFPs to rescue the infectivity of *gp64* null baculovirus may be EFP envelope incorporation. This process could recapitulate evolutionary events necessary for the acquisition of *gp64* by the ancestor G1-α baculoviruses.

## DISCUSSION

All known alphabaculoviruses infect Lepidoptera (9). Therefore, we have searched the Serratus platform for RdRp sequences similar to those of Sinu virus in lepidopteran transcriptome data. This was motivated by the clustering of the Sinu virus glycoprotein with GP64 sequences of baculoviruses in phylogenetic trees. Through this approach, we discovered a novel thogotovirus in the *Melitaea didyma* butterfly, which we have named *Melitaea didyma thogotovirus 1* (MediTHOV-1). This study demonstrates that data mining, combined with inferred HGT events, can be used in a hypothesis-driven manner to discover novel viruses, emphasizing that HTS data should be utilized not only for the discovery of new viruses but also to infer the evolutionary and physiological contexts in which viruses play significant roles (41).

The identification of MediTHOV-1, whose glycoprotein groups closely with baculovirus GP64 and Sinu virus sequences, supports the hypothesis that this baculoviral protein originated from an HGT event involving an ancestral orthomyxovirus. However, the exact mechanism of how a co-infection event might have occurred during the same host developmental stage remains unclear.

Given the phylodynamics, we believe that the *gp64* gene gain early in the evolution of alphabaculoviruses contributed to its dispersal among various lepidopteran species first, and then these viruses have co-evolved with their hosts to the present day, providing



**FIG 6** (A) Fluorescence and bright-field microscopy of Ac-ATHOVGPgp64 $\Delta$  infected Sf21 cells, expressing the reporter gene eGFP and polyhedrin (dark intracellular masses, blue arrows, and insets), indicating the progression of infection over time. (B) Infected Sf21, dotted circles demarcate regions of isolated infection foci still discernible at 8 dpi. Scale bar: 250  $\mu$ m and 15  $\mu$ m. (C) qPCR growth curve of Ac-ATHOVGPgp64 $\Delta$  and of (D) GP64 carrying viruses.

negative selection pressures on *gp64*. Indeed, present-day alphabaculovirus genomes have the lowest non-synonymous to synonymous (Ka/Ks) substitution rates in their *gp64* genes (42). This would explain why this group of viruses is the most diverse within *Baculoviridae* despite most viruses in the genera being species-specific for their hosts. However, we cannot exclude co-occurring hypotheses for the observed higher species diversity of viruses in *Alphabaculovirus* compared to the rest of the family. Namely, alphabaculoviruses and betabaculoviruses have been used for the biological control of agronomic pests (9), thus motivating the discovery of new viruses against new pests. In addition, it is possible that *Apis thogotovirus* 1 ancestors originated from mites and spilled from them into bees at later geological times than our assumed calibration point. Overall, we find the first hypothesis to be more likely, at least when comparing the diversity of G1- $\alpha$  and G2- $\alpha$  viruses.

Although baculoviruses primarily infect insects at the larval stage, they have also been observed in adult individuals in a covert form, characterized by the absence of visible signs of infection (43). This covert infection can result from sublethal infections during larval development and can also enable vertical transmission (44). Such occurrences could facilitate a coinfection event between an ancestral baculovirus and

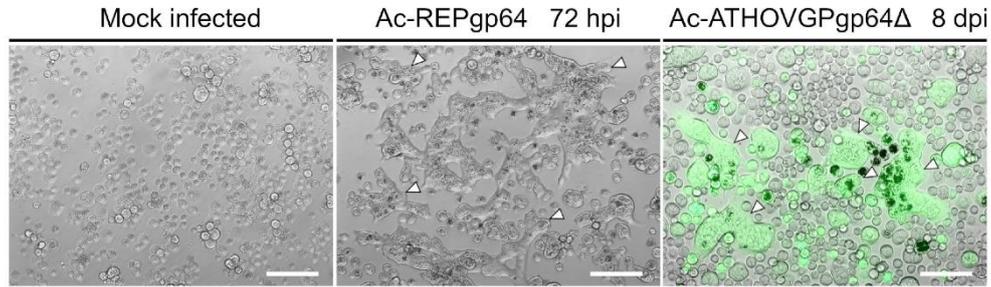


FIG 7 Sf21 cells infected with the control virus Ac-REPgp64 and the virus Ac-ATHOVGPgp64Δ after exposure to low pH. Syncytia are indicated by white arrowheads. Overlay of fluorescence and bright field demonstrates syncytia composed of cells expressing the reporter gene eGFP. Scale bar: 125 μm.

thogotovirus within the same adult individual. Additionally, it is possible that orthomyxoviruses evolutionarily close to MediTHOV-1, which infect larvae, exist.

While baculoviruses have been pseudotyped in numerous studies (26, 39, 45, 46), there are fewer studies on pseudotyping of thogotovirus glycoproteins (47). Lung et al. (26) were able to successfully pseudotype AcMNPV with baculovirus F and VSV F proteins, indicating that pseudotyping is also possible with EFP of unrelated viruses, while evaluating functional compatibility. However, the authors report that Thogoto

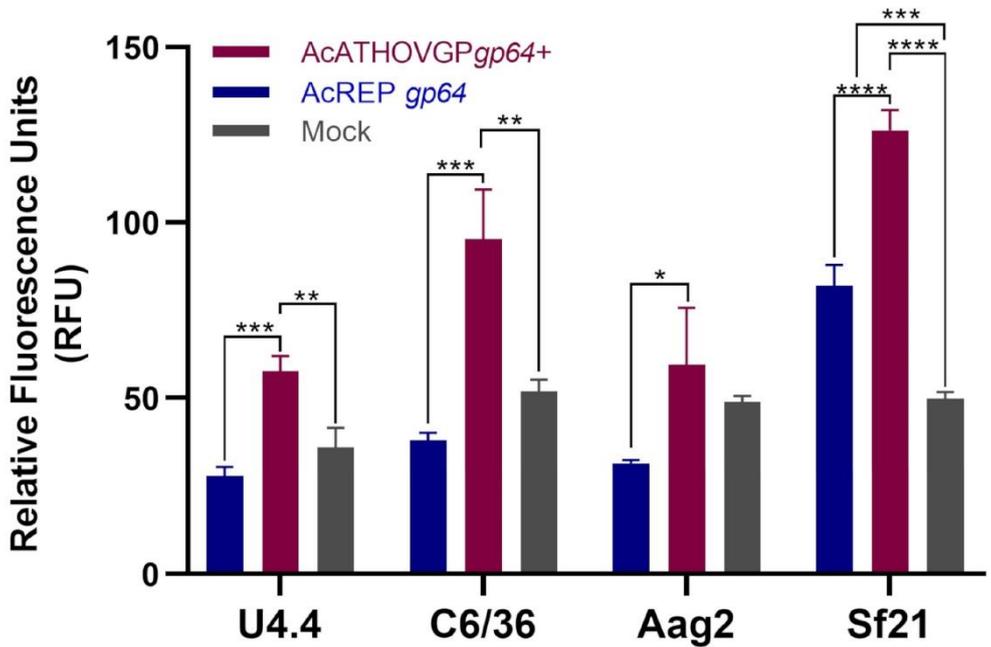
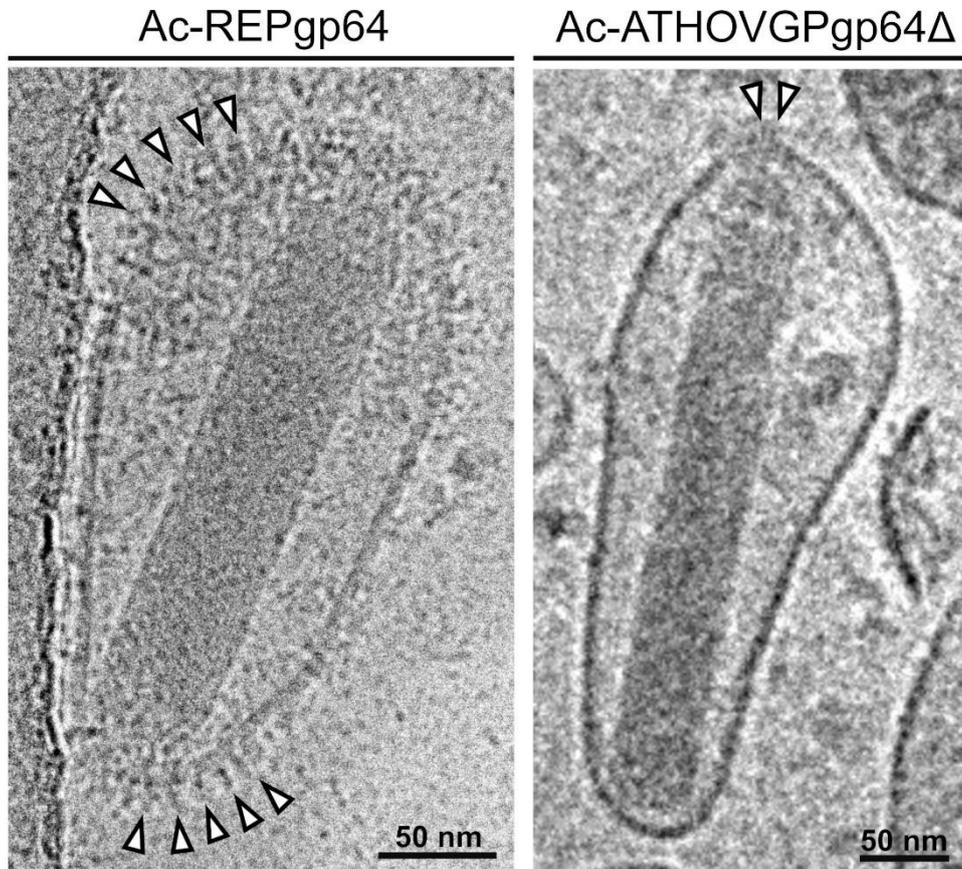


FIG 8 ATHOV-1 EFP enhances transduction efficiency in mosquito cells U4.4 and C6/36, and lepidopteran cell line Sf21. Total fluorescence emitted by the eGFP reporter protein from lysed cells measured at 48 hpi at MOI 5. Significance performed by Tukey post-test: \* $P < 0.03$ , \*\* $P < 0.002$ , \*\*\* $P < 0.0005$ , and \*\*\*\* $P < 0.0001$ .



**FIG 9** Cryo-EM comparison of AcMNPV *gp64* null rescued with its native *gp64* gene (Ac-REPgp64) and with heterologous ATHOV-1 EFP (Ac-ATHOVgp64Δ). White arrowheads indicate visible peplomers composed of envelope glycoproteins.

virus EFP was unable to rescue the infectivity of pseudotyped AcMNPV in insect cell lines (26). Therefore, to the best of our knowledge, this study represents the first description of a successful description of a thogotovirus EFP pseudotyping in a baculovirus that partially replaced native GP64 activity.

The glycoprotein of certain members of the *Thogotovirus* genus, such as those in the Dhori group, allows these viruses to infect both invertebrates and vertebrates (48). Similarly, the GP64 of G1- $\alpha$  baculoviruses enables their use as vectors for gene therapy and other biotechnological applications in mammalian and mosquito cell lines (39, 49).

The insertion of *gp64* within ancestors of G1- $\alpha$  may have been a determining event for the formation of G1- $\alpha$  in a different lineage from G2- $\alpha$ , as it was found to be the protein with the least amino acid changes among the 11 genes present exclusively in G1- $\alpha$  (41). Given its stability over evolutionary time, it is not surprising to encounter difficulties in pseudotyping this protein for orthologs. While it is possible to pseudotype G2- $\alpha$  with GP64 in place of its F protein (44), up until recently, the pseudotyping of thogotovirus

glycoproteins in place of GP64 has only been successful as an enhancer of budded virus transduction in mammalian cells (45).

Here, we describe the successful pseudotyping of a *gp64* null AcMNPV with a bee thogotovirus envelope glycoprotein, resulting in the recombinant baculovirus regaining infectivity in lepidopteran cell lines, albeit less efficiently than the wild-type virus infection. In contrast, pseudotyping with MediTHOV-1 glycoprotein did not rescue AcMNPV *gp64* null infectivity. It has been shown that the domain II and the stalk portion of the domain III baculoviral and thogotoviral proteins changed the most in respect to their electrostatic surface, which could correspond to host-specific tropism (25, 50). Aligned to this notion, we have observed that MediTHOV-1 domains were more positively charged than ATHOV-1, which seemingly relates to the tropism of the former virus to lepidoptera, in similarity to AcMNPV (Fig. S4). In spite of this, the MediTHOV-1 protein failed to rescue its function of AcMNPV.

We believe that certain sequence features in the MediTHOV-1 EFP contribute to the failure in rescuing infectivity. The predicted encoded EFP of this virus does not have an obvious signal peptide (Fig. S5). In addition, Yu and colleagues (51) demonstrated that the 388Y residue in the domain IV of GP64 is necessary for generating viral titers of AcMNPV in the Sf9 cell line (50). While all baculovirus sequences analyzed in their study have this residue, some thogotoviruses, including MediTHOV-1, present a 388F residue, while ATHOV-1 carries the 388Y residue (Fig. S6). The complex phylogenetic relationships among lepidopterans, such as *Autographa californica* in Noctuidae and *Melitaea dydima* in Nymphalidae families, may guide divergent evolutionary paths for their viruses over time.

While ATHOV-1 fusion protein restored infectivity, the infection occurred in localized foci within the cell cultures. The resulting BVs displayed fewer GPs in their surface compared with the wild-type virus, as observed through cryo-EM. The number of EFPs in close physical proximity may play a crucial role in overcoming the energetic barrier for hemifusion between viral and cell membranes, as seen with some class I and class II fusion proteins (52). This could explain the localized infection foci and lack of extensive spread in culture observed during the infection by Ac-ATHOVgp64Δ, which appears to incorporate very few copies of ATHOV-1's EFPs. Consequently, cell-to-cell contact may be required to achieve a sufficient concentration of EFPs to mediate viral spread to adjacent cells.

Hodgson et al. (52) identified various host proteins involved in GP64 trafficking to the plasma membrane, such as Rabs and adaptor proteins associated with endosomal trafficking (52). We find it plausible that, as ATHOV-1 evolved to infect bees and mites, its glycoprotein may have become poorly adapted to interact with the endosomal machinery of lepidopteran cells. This maladaptation could result in suboptimal trafficking from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane and/or enhanced endocytosis of the proteins back into the cell. The transmembrane domain of AcMNPV GP64 is important for complete membrane fusion and pore formation, as well as for sub-cellular transport and virus budding (53). In a substitution assay, replacing the transmembrane domain of AcMNPV GP64 with that of THOV generated infectious BVs and promoted full membrane fusion (53).

We also believe that a minimum compatibility between thogotovirus matrix proteins and their counterparts in baculovirus was necessary for the interchangeability of the envelope glycoprotein between these groups. The deletion of the baculoviral *me53* in AcMNPV results in up to a 1,000-fold reduction of BV yield and is important for virion production (54, 55). During late phase infection, Me53 localizes on the plasma membrane of host cells and requires previously anchored GP64 in the membrane to form budding sites for the virus (56). Me53 in the budding sites may function analogously to the matrix protein of Influenza viruses, members of the *Orthomyxoviridae* family, which recruits other viral proteins to facilitate viral budding (56). In this manner, compatibility between interacting domains of Me53 and acquired EFP could be necessary for its efficient incorporation in the viral G1-α envelope. However, further experiments are

needed to unravel the interaction between thogotovirus EFP with baculovirus and lepidopteran cells.

Our study was able to replicate several observations made by Wang and colleagues (57) in their cryo-EM study of baculoviral budded virus morphology (57). These included virions with stretched sides, the presence of vesicles within the virions, BVs with multiple capsids, and relaxed forms of capsids (Fig. S7) despite using centrifugation prior to cryo-EM to enrich for BVs in our samples.

The incorporation of thogotovirus GPs in the BV envelope has been explored as a strategy to enhance its capacity to enter and transduce genes in mammalian cells (46). Surprisingly, the recombinant baculovirus carrying both its native GP64 and the EFP of ATHOV-1 demonstrated a greatly enhanced ability to transduce reporter genes in mosquito cell lines, indicating its potential as a tool for gene delivery and heterologous protein expression in these cell lineages. Additionally, the increased transduction in the permissive Sf21 lepidopteran cell line suggests a synergistic effect of ATHOV-1 EFP in conjunction with AcMNPV GP64 in enhancing *in vitro* infection. This synergistic effect could recapitulate the evolutionary steps that led to the substitution of F and the main baculovirus fusion protein by GP64 in G1- $\alpha$  (58). These findings further suggest potential applications of this viral vector for heterologous protein expression and gene delivery, which are currently under study by our group.

## MATERIALS AND METHODS

### Bioinformatic analyses

The Sequence Read Archive was explored using the Serratus platform (31) (<https://serratus.io/explorer/rdrp>; accessed on 12 December 2022) to search for data sets containing reads with at least 45% identity with the three catalytic motifs of the RNA-dependent RNA polymerase of Sinu virus, the thogotovirus whose glycoprotein is most similar to those of baculoviruses (25). We identified an RNA-seq data set (59) (SRR1325001) of the spotted fritillary butterfly (*Melitaea didyma*) containing reads with 45% similarity to the conserved domains of RdRp of Sinu virus. After downloading the RNA-seq data set (59), reads were assembled into transcripts using RNAspades v3.15.5 (60). We then performed a BLASTx of the transcripts against a local database containing all thogotovirus proteins from the NCBI protein database (downloaded on 11 October 2022). We identified six nucleotide sequences corresponding to the thogotovirus segments, which were annotated using NCBI ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>; accessed on 15 December 2022). Nucleotide sequence data reported are available in the Third Party Annotation (TPA) section of the DDBJ/ENA/GenBank databases under the accession numbers BK068795-BK068800.

Maximum likelihood phylogenetic trees of each segment were constructed with the protein sequences, trimmed with trimAl v1.4.rev15 (61). The chosen substitution model was selected with modeltest-ng v0.1.7 (53), and the tree was constructed with RaxML-NG v1.0.3 (62) with 1,000 bootstraps and visualized with figtree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

Signal peptides for AcMNPV, ATHOV-1, and MediTHOV-1 were predicted using signalP 6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0>) (63). Multiple sequence alignment between baculovirus and thogotovirus glycoproteins was generated with MAFFT v7.489, and the resulting alignment was highlighted by hydropathy using Texshade (64, 65).

### Phylogenetic analysis

We generated a time-calibrated phylogeny of Baculovirus and Thogotovirus glycoproteins using BEAST v2.7.7 (66). Accession numbers for the sequences are available in Table S1. We used a Yule Speciation model and a normally distributed calibration point at the root of the tree, based on the origin of Holometabola described in Misof et al.

(36) (mean of 345 million years ago; sigma of 35 mya) (36). In addition, we have used the LG substitution model, a relaxed log-normal clock, and an initial Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) tree, chosen using BEAUti v2.7.7 (67). The resulting model was run with a Markov Chain Monte Carlo (MCMC) with 10 million states. Conversion and Effective Sample Size (ESS), which was accepted over 200 for the parameters, were evaluated using Tracer v1.7.2 (68). A maximum Clade Credibility tree (MCC) was constructed with TreeAnnotator after a 10% Burn-in (<https://www.beast2.org/treeannotator/>) and rendered using Figtree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

### Cell culture and viruses

All insect cell lines were maintained at 27°C in TC-100 culture medium (Vitrocell Embriolife) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco). Sf21 cells (69) derived from the lepidopteran *Spodoptera frugiperda* were used for all virus amplification, transfection, and infection assays, while *Trichoplusia ni* Tn5B cells (70) were used for protein expression assays. Virus titration was carried out using Sf-9 Easy Titer (Sf-9ET) cells (71). *Aedes aegypti* derived Aag2 mosquito cells and *Aedes albopictus* derived C6/36 (72), U4.4 (73), were used for transduction assays. Recombinant baculoviruses were generated utilizing the Bac-to-Bac baculovirus expression system (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturers' instructions.

### Molecular cloning and recombinant baculovirus construction

The coding sequence for the Apis thogotovirus 1 (ATHOV-1) and that of Melitaea didyma thogotovirus 1 (MediTHOV-1) envelope glycoproteins were chemically synthesized into gBlocks gene fragments by Integrated DNA Technologies (IDT). The sequences were amplified by PCR using the primer pairs listed in Table S2. A histidine tag sequence was added to the 3' terminus of the glycoprotein genes for immunodetection of protein expression. The amplified sequences were digested with the enzymes *Apal* and *NotI* and subsequently ligated into the previously digested donor plasmid pFB-Acgp64-pA-PG (45), under the control of the baculovirus *gp64* promoter. This plasmid also contains the eGFP reporter gene and the polyhedrin gene under the control of the IE1 and polyhedrin baculovirus promoters, respectively. The resulting plasmids were named pFB-ATHOVGP and pFB-MediTHOV (Fig. 1), and their correct sequences were confirmed by restriction enzyme digestion and by Sanger sequencing.

Plasmids pFB-ATHOVGP and pFB-MediTHOV were used to generate recombinant baculoviruses carrying either ATHOV-1 or MediTHOV-1 EFP genes, but lacking the baculoviral *gp64* gene (named Ac-ATHOVGPgp64Δ and Ac-MediTHOVgp64Δ), through Bac-to-Bac (Thermo Fisher Scientific) transposition into a *gp64* null bacmid (26). Additionally, recombinant baculoviruses carrying both the Thogotovirus EFP and the *gp64* gene (named Ac-ATHOVGPgp64+ and Ac-MediTHOVgp64+) were also constructed using the Bac-to-Bac expression system by transposition into a bacmid possessing the native baculovirus *gp64* gene. Finally, a recombinant baculovirus with the wild-type AcMNPV *gp64* gene also inserted under the control of the *gp64* promoter and transposed into a *gp64* null bacmid (named Ac-REPgp64) was used for comparison in infection and replication assays (44) (Fig. 2).

### Transfection and infection assays

A total of 1.3 μg of recombinant bacmid DNA from Ac-ATHOVGPgp64Δ, AcTHOVGPgp64+, Ac-MediTHOVgp64+, Ac-MediTHOVgp64Δ, and Ac-REPgp64 DNA was transfected in duplicate into  $8 \times 10^5$  Sf21 cells in six-well plates (CellStar; Greiner BioOne) using the FuGENE HD transfection Reagent (Promega) according to manufacturer's specifications. Transfected cells were monitored daily for the appearance of fluorescence from the early infection reporter eGFP gene and for polyhedra formation as a reporter for late phase infection. Culture supernatant from the transfection of insect cells (P0) was collected 7 days post-transfection (dpt) and clarified by centrifugation at  $5,000 \times g$

for 6 min. Subsequently, 200  $\mu$ L of P0 inoculum was used to infect  $8 \times 10^5$  Sf21 cells in six-well plates (Cellstar; Greiner Bio-One). This first passage was monitored for signs of infection and formation of infection foci.

In subsequent passages, Ac-ATHOVGPgp64 $\Delta$  and Ac-MediTHOVgp64+ infected culture supernatant (P1) was collected and clarified 7 days post-infection (dpi), while for Ac-ATHOVGPgp64+, Ac-MediTHOVgp64+, and Ac-REPgp64, supernatants were collected at 72 hours post-infection (hpi). These supernatants were then passaged in Sf21 cells to observe the propagation of infection and collection of cell culture supernatant (P2). All passage supernatants were titrated in triplicates using Sf9 Easy Titer (ET) cells by endpoint dilution to establish the 50% tissue culture infective dose (TCID<sub>50</sub>) (68).

### Analysis of protein expression

The expression of the recombinant Thogotovirus membrane EFP was analyzed using sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) followed by Coomassie Blue Staining and by Western blotting of infected cell extracts, as well as concentrated recombinant virus particles from the culture supernatant. Tn5B cells were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 10 in T-75 flasks, and cell cultures were collected at 10 dpi for Ac-ATHOVGPgp64 $\Delta$  and at 72 hpi for Ac-ATHOVGPgp64+ and Ac-REPgp64. The culture supernatant was clarified by centrifugation at  $5,000 \times g$  for 6 min, filtered through a 0.22  $\mu$ m Syringe filter (Millipore), followed by viral particle concentration by ultracentrifugation at  $150,000 \times g$  for 1 h and 20 min.

For Western blotting, samples were denatured in loading buffer containing  $\beta$ -mercaptoethanol at 95°C for 10 min, subjected to SDS-PAGE, and transferred to a PVDF membrane. The membrane was blocked in 3% bovine serum albumin (BSA) in phosphate buffered saline (PBS) for 1 h at room temperature, washed once for 5 min with PBS, and then incubated with either Anti-6 $\times$  His tag mouse monoclonal antibody (H8, Invitrogen) at a 1:3,000 dilution, or with Anti gp64 monoclonal antibody (AcV5, Invitrogen) at 1:1,000 dilution in PBS for 1 h at room temperature. The membrane was then washed five times for 5 min each with PBS and 0.05% Tween 20 (PBST) and incubated with an alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich) at a 1:10,000 dilution for 1 h at room temperature. The membrane was subsequently washed five times for 5 min each with PBST, and proteins were detected using NBT/BCIP substrate (Promega).

### PCR confirmation of gp64 deletion in recombinant virus

DNA was extracted from 200  $\mu$ L of second passage virus inoculum from viruses Ac-REPgp64 and AcATHOVGPgp64+ at 72 hpi and for virus Ac-ATHOVGPgp64 $\Delta$  at 14 dpi, using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) according to manufacturer's specifications. Nucleic acids were eluted on 200  $\mu$ L of buffer AE. One microliter was used in PCR reactions using GoTaq Green Master Mix (Promega) with primers for amplification of the whole *gp64* gene: F-AcMNPVgp64 5'-ATAGGGCCCATGGTAAGCGCTATTGTT-3' and R-AcMNPVgp64 5'-ATAGCGGCCGCTTAGTGATGGTGGTGGTGGTATTGCTATTACGGTT-3' (expected band length = 1,571 bp) or with reverse primer R-AcMNPVgp64lap 5'-TGGCCGCTTCTTACTCG-3' internal to *gp64* (expected band length 840 bp). Cycling program used was initial denaturation 95°C for 4 min followed by 35 cycles of 95°C for 30 sec, 53°C for 30 sec, and 72°C for 2 min and final extension at 72°C for 7 min. PCR products were separated on a 0.8% agarose gel.

### Low pH-induced fusogenic activity

The ability of the ATHOV-1 envelope glycoprotein to induce cell membrane fusion under low pH conditions was assessed. Sf21 cells were seeded in triplicate into a 12-well plate and infected at a MOI of 10 with recombinant baculoviruses. At 72 hpi for Ac-REPgp64 and mock-infected cells, and at 8 dpi for Ac-ATHOVGPgp64 $\Delta$ , the cell culture media were replaced with acidified unsupplemented TC-100 media (pH 4.5) and incubated for 10 min. The cells were then washed once with unacidified TC-100 media. After 1 hour,

the induction of syncytium formation was observed under bright-field and fluorescence microscopy.

#### qPCR analysis of viral growth kinetics

Sf21 cells were infected at MOI 10 in duplicate in 96-well plates at 50% confluence. Culture supernatant was collected at five time points post-infection: 1 hpi, 24 hpi, 96 hpi, 8 dpi, and 12 dpi for Ac-ATHOVGPgp64Δ virus; and 1 hpi, 24 hpi, 48 hpi, 72 hpi, and 96 hpi for Ac-ATHOVgp64+ and Ac-REPgp64 viruses. The total volume of supernatant from each well was clarified by centrifugation at  $4,000 \times g$  for 6 minutes, and total DNA was extracted using the QIAmp Viral RNA Kit (Qiagen) following the manufacturer's recommendations. All samples from the same infection collection time for the three viruses were extracted simultaneously and eluted in a final volume of 60  $\mu$ L of AVE buffer (ultrapure nuclease-free H<sub>2</sub>O with 0.04% sodium azide). A standard curve was established with the plasmid pCR2.1-TOPOAcIE1, with primers AcIE1FWR (5'-CCATCGCCC AGTTCTGCTTA-3') and AcIEREV (5'-CTGTTCAAGGGTTGCACAGC-3'), targeting AcMNPV *ie1* gene.

The qPCR reactions were performed in duplicate for each sample using LightCycler 480 SYBR Green I Master reagent (Roche) with 1  $\mu$ L of eluted DNA as the template. The reactions were carried out in the QuantStudio 5 thermocycler (Thermo Fisher Scientific) with the following cycling program: an initial DNA polymerase activation step at 95°C for 5 minutes, followed by 40 cycles of 95°C for 15 seconds, 60°C for 10 seconds, and 72°C for 20 seconds, followed by a melting curve step. SYBR Green fluorescence was read, and the data were analyzed using QuantStudio Design & Analysis Software (version 1.5.1; Thermo Fisher Scientific).

#### Cryo-EM analysis

Virus stocks of Ac-ATHOVGPgp64Δ (200 mL), Ac-ATHOVGPgp64+ (50 mL), and Ac-REPgp64 (50 mL) were filtered through 0.22  $\mu$ m syringe filters (Millipore) and concentrated by ultracentrifugation through a 25% sucrose cushion diluted in PBS 1 $\times$ , pH 7.4 at  $100,000 \times g$  for 1 h and 20 min. Viral pellets were resuspended in 100  $\mu$ L of PBS and stored at 4°C until use. Cryo-EM grids were prepared by plunge freezing in liquid ethane using the Vitrobot II System (Thermo Fisher Scientific), at 22°C with the sample volume of 3  $\mu$ L utilizing QUANTIFOIL Holey Carbon Film R2/2 #200 grids. The prepared grids were then analyzed in the Titan Krios G3i (Thermo Fisher Scientific) transmission electron microscope at LNNano – Brazilian Nanotechnology National Laboratory (CNPEM/MCTI).

#### Fluorimetry of transduction in mosquito cells

C6/36, U4.4, Aag2, and Sf21 cells were transduced in triplicates in 24-well plates at an MOI of 5 with Ac-ATHOVGPgp64+ and Ac-REPgp64 viruses. Cells were monitored for fluorescence, and at 48 hpi, they were washed once with PBS and then resuspended and lysed in 150  $\mu$ L of modified RIPA buffer (Tris-HCl, 50 mM; NaCl, 150 mM; EDTA, 5 mM; Triton x-100, 1%) under agitation for 30 min at 4°C. The cellular lysate was clarified by centrifugation at  $17,000 \times g$  for 20 minutes at 4°C. The supernatant was collected, and 100  $\mu$ L was transferred to a black reading plate. Fluorescence was read with an excitation filter at 475 nm (blue) and an emission filter at 500–550 nm using the GloMax Discover equipment (Promega). Data were plotted in GraphPad Prism 8, tested for normality using the Shapiro-Wilk test, and analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test to compare infection groups within each cell line.

#### Protein structure prediction and analysis

Protein structures for ATHOV and MediTHOV glycoproteins were predicted using Colabfold v1.5.5 (74) and AcMNPV GP64 in post-fusion conformation (PDB ID: 3DUZ) (75) as a template. Images corresponding to protein structure electrostatic surface and

predicted local distance difference test (pLDDT) values were rendered using ChimeraX v1.9 (76).

### Conclusion

We have provided functional evidence supporting an HGT event of the envelope glycoprotein of thogotoviruses to baculoviruses, and we have discovered a novel thogotovirus in lepidoptera, the first found in the same class of hosts as G1- $\alpha$  baculoviruses. These findings open new avenues of research to better understand the biology of thogotoviruses, the adaptation of baculovirus machinery to receiving a new gene from thogotoviruses, and the biotechnological applications of incorporating thogotovirus EFPs in viral vectors.

### ACKNOWLEDGMENTS

This research used facilities of the Brazilian Nanotechnology National Laboratory (LNNano), part of the Brazilian Centre for Research in Energy and Materials (CNPEM), a private non-profit organization under the supervision of the Brazilian Ministry for Science, Technology, and Innovations (MCTI). The Electronic Cryomicroscopy Laboratory open access facility staff is acknowledged for the assistance during the experiments (proposal number CRYO-20230487).

Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) provided funding to Bergmann Morais Ribeiro under grant numbers 193.00001749/2022-31 and 193.00002148/2023-27. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) provided funding to Bergmann Morais Ribeiro under grant number 304223/2021-2.

### AUTHOR AFFILIATION

<sup>1</sup>Cell Biology Department, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

### AUTHOR ORCID

Bruno Milhomem Pilati Rodrigues <http://orcid.org/0000-0003-3475-8779>

Luis Janssen <http://orcid.org/0000-0002-5772-0477>

Bergmann Morais Ribeiro <http://orcid.org/0000-0002-1061-196X>

### FUNDING

Funder	Grant(s)	Author(s)
Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal	193.00001749/2022-31	Bergmann Morais Ribeiro
Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal	193.00002148/2023-27	Bergmann Morais Ribeiro
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	304223/2021-2	Bergmann Morais Ribeiro

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Luis Janssen, Data curation, Formal analysis, Investigation, Supervision, Validation, Writing – original draft, Writing – review and editing | Suzane Suliane Vitorino Gomes Acacio, Formal analysis, Investigation | Mariana Tigano Magalhães, Investigation, Methodology | Bergmann Morais Ribeiro, Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Resources, Supervision, Writing – review and editing.

## DATA AVAILABILITY

The nucleotide sequence of *Melitaea didyma* thogotovirus 1 (MediTHOV-1) is available in the Third Party Annotation (TPA) section of the DDBJ/ENA/GenBank databases under the accession numbers [BK068795](#)–[BK068800](#). All other sequences cited in the work are publicly available in GenBank under the referenced accession numbers.

## ADDITIONAL FILES

The following material is available [online](#).

### Supplemental Material

**Fig. S1 (JV102148-24-s0001.tif).** Structural comparison of baculoviral GP64 from AcMNPV and thogotoviral EFP from *Thogotovirus dhorienae*.

**Fig. S2 (JV102148-24-s0002.tif).** Maximum likelihood phylogenies based on amino acid sequence of proteins from *Melitaea didyma* thogotovirus 1 and viral members of the Orthomyxoviridae, including ATHOV-1.

**Fig. S3 (JV102148-24-s0003.tif).** Fluorescence microscopy of transduction in mosquito cell lines.

**Fig. S4 (JV102148-24-s0004.tif).** Modeled structural comparison of EFPs from ATHOV-1 and MediTHOV-1.

**Fig. S5 (JV102148-24-s0005.tif).** SignalP prediction of signal peptides between the glycoproteins of AcMNPV, MediTHOV, and ATHOV-1.

**Fig. S6 (JV102148-24-s0006.tif).** Multiple sequence alignment shaded by hydrophobicity between GP64 of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus, *Orgyia pseudotsugata* multiple nucleopolyhedrovirus, *Thogotovirus thogotoense*, *Apis thogotovirus* 1, and *Melitaea didyma* thogotovirus 1.

**Fig. S7 (JV102148-24-s0007.tif).** Cryo-EM micrographs of budded viruses Ac-ATHOVGPgp64Δ.

**Tables S1 and S2 (JV102148-24-s0008.docx).** Sequences used for phylodynamic analysis and primers used for the amplification and molecular cloning of thogotovirus EFP genes.

**Supplemental legends (JV102148-24-s0009.docx).** Legends for Fig. S1 to S7.

## REFERENCES

- van Oers MM, Vlask JM. 2007. Baculovirus genomics. *Curr Drug Targets* 8:1051–1068. <https://doi.org/10.2174/138945007782151333>
- Gilbert C, Chateigner A, Ernenwein L, Barbe V, Bézier A, Herniou EA, Cordaux R. 2014. Population genomics supports baculoviruses as vectors of horizontal transfer of insect transposons. *Nat Commun* 5:3348. <https://doi.org/10.1038/ncomms4348>
- Hughes AL. 2013. Origin of ecdysosteroid UDP-glycosyltransferases of baculoviruses through horizontal gene transfer from Lepidoptera. *Coevolution* 1:1–7. <https://doi.org/10.1080/23256214.2013.858497>
- Katsuma S, Koyano Y, Kang W, Kokusho R, Kamita SG, Shimada T. 2012. The baculovirus uses a captured host phosphatase to induce enhanced locomotory activity in host caterpillars. *PLoS Pathog* 8:e1002644. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002644>
- Hughes AL. 2002. Evolution of inhibitors of apoptosis in baculoviruses and their insect hosts. *Infect Genet Evol* 2:3–10. [https://doi.org/10.1016/S1567-1348\(02\)00040-0](https://doi.org/10.1016/S1567-1348(02)00040-0)
- Carpes MP, Nunes JF, Sampaio TL, Castro MEB, Zanotto PMA, Ribeiro BM. 2009. Molecular analysis of a mutant *Anticarsia gemmatilis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) shows an interruption of an inhibitor of apoptosis gene (*iap-3*) by a new class-II *piggyBac*-related insect transposon. *Insect Mol Biol* 18:747–757. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00917.x>
- Thézé J, Lopez-Vaamonde C, Cory JS, Herniou EA. 2018. Biodiversity, evolution and ecological specialization of baculoviruses: a treasure trove for future applied research. *Viruses* 10:366. <https://doi.org/10.3390/v10070366>
- Blissard GW, Theilmann DA. 2018. Baculovirus entry and egress from insect cells. *Annu Rev Virol* 5:113–139. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092917-043356>
- Rohrmann GF. 2019. The baculovirus replication cycle: effects on cells and insects. In *Baculovirus molecular biology*, 4th ed. National Center for Biotechnology Information (US).
- Monsma SA, Oomens AG, Blissard GW. 1996. The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. *J Virol* 70:4607–4616. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.7.4607-4616.1996>
- Hefferon KL, Oomens AGP, Monsma SA, Finnerty CM, Blissard GW. 1999. Host cell receptor binding by baculovirus GP64 and kinetics of virion entry. *Virology (Auckl)* 258:455–468. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9758>
- Dudas G, Batson J. 2023. Accumulated metagenomic studies reveal recent migration, whole genome evolution, and undiscovered diversity of orthomyxoviruses. *J Virol* 97:e0105623. <https://doi.org/10.1128/jvi.01056-23>
- Lvov DK, Karas FR, Tsyarkin YuM, Vargina SG, Timofeev EM, Osipova NZ, Veselovskaya OV, Grebenyuk Yul, Gromashevski VL, Fomina KB. 1974. Batken virus, a new arbovirus isolated from ticks and mosquitoes in Kirghiz S.S.R. *Archiv f Virusforschung* 44:70–73. <https://doi.org/10.1007/BF01242183>
- Contreras-Gutiérrez MA, Nunes MRT, Guzman H, Uribe S, Suaza Vasco JD, Cardoso JF, Popov VL, Widen SG, Wood TG, Vasiliak N, Tesh RB. 2017. Sinu virus, a novel and divergent orthomyxovirus related to members of the genus *Thogotovirus* isolated from mosquitoes in Colombia. *Virology (Auckl)* 501:166–175. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.11.014>
- Hubálek Z, Rudolf I. 2012. Tick-borne viruses in Europe. *Parasitol Res* 111:9–36. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2910-1>

16. Ejiri H, Lim C-K, Isawa H, Fujita R, Murota K, Sato T, Kobayashi D, Kan M, Hattori M, Kimura T, Yamaguchi Y, Takayama-Ito M, Horiya M, Posadas-Herrera G, Minami S, Kuwata R, Shimoda H, Maeda K, Katayama Y, Mizutani T, Saijo M, Kaku K, Shinomiya H, Sawabe K. 2018. Characterization of a novel thogotovirus isolated from *Amblyomma testudinarium* ticks in Ehime, Japan: a significant phylogenetic relationship to Bourbon virus. *Virus Res* 249:57–65. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.03.004>
17. Harvey E, Holmes EC. 2022. Diversity and evolution of the animal virome. *Nat Rev Microbiol* 20:321–334. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00665-x>
18. Fuchs J, Lamkiewicz K, Kolesnikova L, Hölzer M, Marz M, Kochs G. 2022. Comparative study of ten thogotovirus isolates and their distinct *in vivo* characteristics. *J Virol* 96:e0155621. <https://doi.org/10.1128/JVI.01556-21>
19. Kosoy OJ, Lambert AJ, Hawkinson DJ, Pastula DM, Goldsmith CS, Hunt DC, Staples JE. 2015. Novel thogotovirus associated with febrile illness and death, United States, 2014. *Emerg Infect Dis* 21:760–764. <https://doi.org/10.3201/eid2105.150150>
20. Roe MK, Huffman ER, Batista YS, Papadeas GG, Kastelitz SR, Restivo AM, Stobart CC. 2023. Comprehensive review of emergence and virology of tickborne bourbon virus in the United States. *Emerg Infect Dis* 29:1–7. <https://doi.org/10.3201/eid2901.212295>
21. Más V, Melero JA. 2013. Entry of enveloped viruses into host cells: membrane fusion. *Subcell Biochem* 68:467–487. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-6552-8\\_16](https://doi.org/10.1007/978-94-007-6552-8_16)
22. Backovic M, Jardetzky TS. 2011. Class III viral membrane fusion proteins, p 91–101. In *Advances in experimental medicine and biology*
23. Guo J, Li S, Bai L, Zhao H, Shang W, Zhong Z, Maimaiti T, Gao X, Ji N, Chao Y, Li Z, Du D. 2024. Structural transition of GP64 triggered by a pH-sensitive multi-histidine switch. *Nat Commun* 15:7668. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-51799-4>
24. Morse MA, Marriott AC, Nuttall PA. 1992. The glycoprotein of Thogoto virus (a tick-borne orthomyxo-like virus) is related to the baculovirus glycoprotein GP64. *Virology* 186:640–646. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90030-s](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90030-s)
25. Peng R, Zhang S, Cui Y, Shi Y, Gao GF, Qi J. 2017. Structures of human-infecting *Thogotovirus* fusogens support a common ancestor with insect baculovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E8905–E8912. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706125114>
26. Lung O, Westenberg M, Vlak JM, Zuidema D, Blissard GW. 2002. Pseudotyping *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AcMNPV): F proteins from group II NPVs are functionally analogous to AcMNPV GP64. *J Virol* 76:5729–5736. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.11.5729-5736.2002>
27. Hu L, Li Y, Ning Y-J, Deng F, Vlak JM, Hu Z, Wang H, Wang M. 2019. The major hurdle for effective baculovirus transduction into mammalian cells is passing early endosomes. *J Virol* 93:e00709-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00709-19>
28. da Silva LA, de Camargo BR, Rodrigues BMP, Berlitz DL, Fiuza LM, Ardisson-Araújo DMP, Ribeiro BM. 2023. Exploring viral infections in honey bee colonies: insights from a metagenomic study in southern Brazil. *Braz J Microbiol* 54:1447–1458. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-01078-z>
29. Levin S, Sela N, Erez T, Nestel D, Pettis J, Neumann P, Chejanovsky N. 2019. New viruses from the ectoparasite mite varroa destructor infesting *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *Viruses* 11:94. <https://doi.org/10.3390/v11020094>
30. Kwon M, Jung C, Kil E-J. 2023. Metagenomic analysis of viromes in honey bee colonies (*Apis mellifera*; Hymenoptera: Apidae) after mass disappearance in Korea. *Front Cell Infect Microbiol* 13:1124596. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1124596>
31. Edgar RC, Taylor B, Lin V, Altman T, Barbera P, Meleshko D, Lohr D, Novakovsky G, Buchfink B, Al-Shayeb B, Banfield JF, de la Peña M, Korobeynikov A, Chikhi R, Babaian A. 2022. Petabase-scale sequence alignment catalyses viral discovery. *Nature* 602:142–147. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04332-2>
32. Käfer S, Paraskevopoulou S, Zirkel F, Wieseke N, Donath A, Petersen M, Jones TC, Liu S, Zhou X, Middendorff M, Junglen S, Misof B, Drosten C. 2019. Re-assessing the diversity of negative strand RNA viruses in insects. *PLoS Pathog* 15:e1008224. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008224>
33. Li C, Holmes EC, Shi W. 2025. The diversity, pathogenic spectrum, and ecological significance of arthropod viruses. *Trends Microbiol* 15:00081–00082. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2025.03.005>
34. Herniou EA, Olszewski JA, O'Reilly DR, Cory JS. 2004. Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts. *J Virol* 78:3244–3251. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.7.3244-3251.2004>
35. Petrone ME, Parry R, Mifsud JCO, Van Brussel K, Vorhees IEH, Richards ZT, Holmes EC. 2023. Evidence for an ancient aquatic origin of the RNA viral order *Articulavirales*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 120:e2310529120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2310529120>
36. Misof B, Liu S, Meusemann K, Peters RS, Donath A, Mayer C, Frandsen PB, Ware J, Flouri T, Beutel RG, et al. 2014. Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science* 346:763–767. <https://doi.org/10.1126/science.1257570>
37. Thézé J, Bézier A, Periquet G, Drezen J-M, Herniou EA. 2011. Paleozoic origin of insect large dsDNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:15931–15935. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105580108>
38. Blissard GW, Wenz JR. 1992. Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. *J Virol* 66:6829–6835. <https://doi.org/10.1128/JVI.66.11.6829-6835.1992>
39. Mansouri M, Berger P. 2018. Baculovirus for gene delivery to mammalian cells: past, present and future. *Plasmid* 98:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2018.05.002>
40. Anderson MAE, Gross TL, Myles KM, Adelman ZN. 2010. Validation of novel promoter sequences derived from two endogenous ubiquitin genes in transgenic *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* 19:441–449. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2010.01005.x>
41. Gupta P, Hiller A, Chowdhury J, Lim D, Lim DY, Saeji JJP, Bahaian A, Rodríguez F, Pereira L, Morales-Tapia A. 2024. A parasite odyssey: an RNA virus concealed in *Toxoplasma gondii*. *Virus Evol* 10:veae040. <https://doi.org/10.1093/ve/veae040>
42. Jiang Y, Deng F, Rayner S, Wang H, Hu Z. 2009. Evidence of a major role of GP64 in group I alphabaculovirus evolution. *Virus Res* 142:85–91. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.01.015>
43. Williams T, Virto C, Murillo R, Caballero P. 2017. Covert infection of insects by baculoviruses. *Front Microbiol* 8:1337. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01337>
44. Cabodevilla O, Ibañez I, Simón O, Murillo R, Caballero P, Williams T. 2011. Occlusion body pathogenicity, virulence and productivity traits vary with transmission strategy in a nucleopolyhedrovirus. *Biol Control* 56:184–192. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.10.007>
45. Ardisson-Araújo DMP, Melo FL, Clem RJ, Wolff JLC, Ribeiro BM. 2016. A betabaculovirus-encoded gp64 homolog codes for a functional envelope fusion protein. *J Virol* 90:1668–1672. <https://doi.org/10.1128/JVI.02491-15>
46. Hu L, Li Y, Deng F, Hu Z, Wang H, Wang M. 2019. Improving baculovirus transduction of mammalian cells by incorporation of thogotovirus glycoproteins. *Virus Sin* 34:454–466. <https://doi.org/10.1007/s12250-019-00133-0>
47. Thamamongood T, Jengarn J, Muangsani P, Petpiroon N, Srisuthisamphan K, Attasombat K, Wongwanakul R, Aueviriyavit S, Laohathai S, Jongkaewwattana A, Teeravechyan S. 2024. Pseudotyped zoonotic thogotoviruses exhibit broad entry range in mammalian cells. *Virology* (Auckl) 589:109914. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2023.109914>
48. Butenko AM, Leshchinskaja EV, Semashko IV, Donets MA, Mart'ianova LI. 1987. Dhori virus—a causative agent of human disease. 5 cases of laboratory infection. *Vopr Virusol* 32:724–729.
49. Naik NG, Lo Y-W, Wu T-Y, Lin C-C, Kuo S-C, Chao Y-C. 2018. Baculovirus as an efficient vector for gene delivery into mosquitoes. *Sci Rep* 8:17778. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35463-8>
50. Bai C, Qi J, Wu Y, Wang X, Gao GF, Peng R, Gao F. 2019. Postfusion structure of human-infecting Bourbon virus envelope glycoprotein. *J Struct Biol* 208:99–106. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2019.08.005>
51. Yu Q, Bai L, Ji N, Yue X, Jiang Y, Li Z. 2020. Critical residues and contacts within domain IV of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus GP64 contribute to its refolding during membrane fusion. *J Virol* 94:e01105-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.01105-20>
52. Hodgson JJ, Buchon N, Blissard GW. 2022. Identification of cellular genes involved in baculovirus GP64 trafficking to the plasma membrane. *J Virol* 96:e0021522. <https://doi.org/10.1128/jvi.00215-22>
53. Li Z, Blissard GW. 2008. Functional analysis of the transmembrane (TM) domain of the *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus GP64 protein: substitution of heterologous TM domains. *J Virol* 82:3329–3341. <https://doi.org/10.1128/JVI.02104-07>
54. de Jong J, Arif BM, Theilmann DA, Krell PJ. 2009. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus me53 (ac140) is a nonessential gene

- required for efficient budded-virus production. *J Virol* 83:7440–7448. <https://doi.org/10.1128/JVI.02390-08>
55. Liu Y, de Jong J, Nagy E, Theilmann DA, Krell PJ. 2016. Nuclear translocation sequence and region in *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ME53 that are important for optimal baculovirus production. *J Virol* 90:3953–3965. <https://doi.org/10.1128/JVI.03115-15>
  56. de Jong J, Theilmann DA, Arif BM, Krell PJ. 2011. Immediate-early protein ME53 forms foci and colocalizes with GP64 and the major capsid protein VP39 at the cell membranes of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus-infected cells. *J Virol* 85:9696–9707. <https://doi.org/10.1128/JVI.00833-11>
  57. Wang Q, Bosch B-J, Vlak JM, van Oers MM, Rottier PJ, van Lent JWM. 2016. Budded baculovirus particle structure revisited. *J Invertebr Pathol* 134:15–22. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.12.001>
  58. Wang M, Wang J, Yin F, Tan Y, Deng F, Chen X, Jehle JA, Vlak JM, Hu Z, Wang H. 2014. Unraveling the entry mechanism of baculoviruses and its evolutionary implications. *J Virol* 88:2301–2311. <https://doi.org/10.1128/JVI.03204-13>
  59. Romiguier J, Gayral P, Ballenghien M, Bernard A, Cahais V, Chenuil A, Chiari Y, Darnat R, Duret L, Faivre N, Loire E, Lourenco JM, Nabholz B, Roux C, Tsagkogeorga G, Weber AA-T, Weinert LA, Belkhir K, Bierne N, Glémin S, Galtier N. 2014. Comparative population genomics in animals uncovers the determinants of genetic diversity. *Nature* 515:261–263. <https://doi.org/10.1038/nature13685>
  60. Bushmanova E, Antipov D, Lapidus A, Prjibelski AD. 2019. rnaSPAdes: a *de novo* transcriptome assembler and its application to RNA-Seq data. *Gigascience* 8:giz100. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz100>
  61. Capella-Gutiérrez S, Silla-Martinez JM, Gabaldón T. 2009. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics* 25:1972–1973. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348>
  62. Kozlov AM, Darriba D, Flouri T, Morel B, Stamatakis A. 2019. RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics* 35:4453–4455. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz305>
  63. Teufel F, Almagro Armenteros JJ, Johansen AR, Gíslason MH, Pihl SI, Tširigov KD, Winther O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2022. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. *Nat Biotechnol* 40:1023–1025. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01156-3>
  64. Katoh K, Standley DM. 2014. MAFFT: iterative refinement and additional methods, p 131–146. In Russell DJ (ed), *Multiple sequence alignment methods*. Humana Press, Totowa, NJ.
  65. Beitz E. 2000. TEXshade: shading and labeling of multiple sequence alignments using LATEX2 epsilon. *Bioinformatics* 16:135–139. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.2.135>
  66. Bouckaert R, Vaughan TG, Barido-Sottani J, Duchêne S, Fourment M, Gavryushkina A, Heled J, Jones G, Kühnert D, De Maio N, Matschiner M, Mendes FK, Müller NF, Ogilvie HA, du Plessis L, Poppinga A, Rambaut A, Rasmussen D, Siveroni I, Suchard MA, Wu C-H, Xie D, Zhang C, Stadler T, Drummond AJ. 2019. BEAST 2.5: an advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLOS Comput Biol* 15:e1006650. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006650>
  67. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol* 29:1969–1973. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss075>
  68. Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA. 2018. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using tracer 1.7. *Syst Biol* 67:901–904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>
  69. Vaughn JL, Goodwin RH, Tompkins GJ, McCawley P. 1977. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* 13:213–217. <https://doi.org/10.1007/BF02615077>
  70. Granados RR, Guoxun L, Derksen ACG, McKenna KA. 1994. A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BT1-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. *J Invertebr Pathol* 64:260–266. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(94\)90400-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(94)90400-6)
  71. Hopkins RF, Esposito D. 2009. A rapid method for titrating baculovirus stocks using the Sf-9 Easy Titer cell line. *Biotechniques* 47:785–788. <https://doi.org/10.2144/000113238>
  72. Singh KRP. 1967. Cell cultures derived from larvae of *Aedes albopictus* (skuse) and *Aedes aegypti* (L). *Curr Sci* 36:506–508.
  73. Lan Q, Fallon AM. 1990. Small heat shock proteins distinguish between two mosquito species and confirm identity of their cell lines. *Am J Trop Med Hyg* 43:669–676. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1990.43.669>
  74. Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M. 2022. ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods* 19:679–682. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>
  75. Kadlec J, Loureiro S, Abrescia NGA, Stuart DJ, Jones IM. 2008. The postfusion structure of baculovirus gp64 supports a unified view of viral fusion machines. *Nat Struct Mol Biol* 15:1024–1030. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1484>
  76. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Couch GS, Croll TI, Morris JH, Ferrin TE. 2021. UCSF ChimeraX: structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci* 30:70–82. <https://doi.org/10.1002/pro.3943>



## Exploring viral infections in honey bee colonies: insights from a metagenomic study in southern Brazil

Leonardo Assis da Silva<sup>1</sup> · Brenda Rabello de Camargo<sup>1</sup> · Bruno Milhomem Pilati Rodrigues<sup>1</sup> · Diouneia Lisiane Berlitz<sup>2</sup> · Lidia Mariana Fiuza<sup>3</sup> · Daniel Mendes Pereira Ardisson-Araújo<sup>1,4</sup> · Bergmann Morais Ribeiro<sup>1,4</sup>

Received: 17 March 2023 / Accepted: 22 July 2023 / Published online: 2 August 2023  
© The Author(s) under exclusive licence to Sociedade Brasileira de Microbiologia 2023

### Abstract

The decline in honey bee colonies in different parts of the world in recent years is due to different reasons, such as agricultural practices, climate changes, the use of chemical insecticides, and pests and diseases. Viral infections are one of the main causes leading to honey bee population declines, which have a major economic impact due to honey production and pollination. To investigate the presence of viruses in bees in southern Brazil, we used a metagenomic approach to sequence adults' samples of concentrated extracts from *Apis mellifera* collected in fifteen apiaries of six municipalities in the Rio Grande do Sul state, Brazil, between 2016 and 2017. High-throughput sequencing (HTS) of these samples resulted in the identification of eight previously known viruses (*Apis rhabdovirus 1* (ARV-1), *Acute bee paralysis virus* (ABPV), *Aphid lethal paralysis virus* (ALPV), *Black queen cell virus* (BQCV), *Bee Macula-like virus* (BeeMLV), *Deformed wing virus* (DWV), *Lake Sinai Virus NE* (LSV), and *Varroa destructor virus 3* (VDV-3)) and a thogotovirus isolate. This thogotovirus shares high amino acid identities in five of the six segments with *Varroa orthomyxovirus 1*, VOV-1 (98.36 to 99.34% identity). In contrast, segment 4, which codes for the main glycoprotein (GP), has no identity with VOV-1, as observed for the other segments, but shares an amino acid identity of 34–38% with other glycoproteins of viruses from the *Orthomyxoviridae* family. In addition, the putative thogotovirus GP also shows amino acid identities ranging from 33 to 41% with the major glycoprotein (GP64) of insect viruses of the *Baculoviridae* family. To our knowledge, this is the second report of a thogotovirus found in bees and given this information, this thogotovirus isolate was tentatively named *Apis thogotovirus 1* (ATHOV-1). The detection of multiple viruses in bees is important to better understand the complex interactions between viruses and their hosts. By understanding these interactions, better strategies for managing viral infections in bees and protecting their populations can be developed.

**Keywords** Honey bee viruses · Metagenomic approach · High-throughput sequence · New thogotovirus isolate · Bee population declines

Responsible Editor: Maria Martha Martorell

✉ Daniel Mendes Pereira Ardisson-Araújo  
araujo.daniel@unb.br

✉ Bergmann Morais Ribeiro  
bergmann@unb.br

<sup>1</sup> Cell Biology Department, University of Brasilia, Brasilia, DF 70910-900, Brazil

<sup>2</sup> Control Agro Bio Pesquisa E Defesa Agropecuária, Parque Tecnológico TECNOPUC/PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup> ProspectaBio - Soluções biológicas Ltda. CABIO - Control Agro Bio - Consultoria Parque Tecnológico TECNOPUC/PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>4</sup> Laboratory of Baculovirus, Cell Biology Department, University of Brasilia, Brasilia, DF 70910-900, Brazil

### Introduction

Increased awareness of the significance of insect-mediated pollination of plants in different ecosystems and global food security has caused a surge in research regarding pollinator health, especially for the honeybee, *Apis mellifera* [1–3]. *A. mellifera* is naturally found in Europe, Western Asia, and Africa. After spreading all over the world, it is responsible for more than 80% of the agricultural pollination, covering all types of crops [4]. Unfortunately, in the last decade, multiple stressors have worked together to enhance *A. mellifera* population decline. These stressors include an increase in parasite and pathogen incidence, chemical insecticide abuse in agriculture, decrease in food diversity, poor nutrition,

## Chikungunya virus produced by a persistently infected mosquito cell line comprises a shorter genome and is non-infectious to mammalian cells

Athos S. de Oliveira\*, Anna Fernanda Vasconcellos, Bruno M. P. Rodrigues, Leonardo A. da Silva, Renato O. Resende and Bergmann M. Ribeiro

### Abstract

Although RNA viruses have high mutation rates, host cells and organisms work as selective environments, maintaining the viability of virus populations by eliminating deleterious genotypes. In serial passages of RNA viruses in a single cell line, most of these selective bottlenecks are absent, with no virus circulation and replication in different tissues or host alternation. In this work, *Aedes aegypti* Aag-2 cells were accidentally infected with Chikungunya virus (CHIKV) and Mayaro virus (MAYV). After numerous passages to achieve infection persistency, the infectivity of these viruses was evaluated in *Ae. albopictus* C6/36 cells, African green monkey Vero cells and primary-cultured human fibroblasts. While these CHIKV and MAYV isolates were still infectious to mosquito cells, they lost their ability to infect mammalian cells. After genome sequencing, it was observed that CHIKV accumulated many nonsynonymous mutations and a significant deletion in the coding sequence of the hypervariable domain in the *nsP3* gene. Since MAYV showed very low titres, it was not sequenced successfully. Persistently infected Aag-2 cells also accumulated high loads of short and recombinant CHIKV RNAs, which seemed to have been originated from virus-derived DNAs. In conclusion, the genome of this CHIKV isolate could guide mutagenesis strategies for the production of attenuated or non-infectious (to mammals) CHIKV vaccine candidates. Our results also reinforce that a paradox is expected during passages of cells persistently infected by RNA viruses: more loosening for the development of more diverse virus genotypes and more pressure for virus specialization to this constant cellular environment.

### INTRODUCTION

'Arboviruses' usually refers to viruses transmitted by arthropods to vertebrates [1]. The main study models are those of mosquito-borne viruses from the families *Flaviviridae* and *Togaviridae*, and the order *Bunyvirales*, causative agents of relevant infectious diseases in humans [2]. These viruses replicate in vertebrate and invertebrate hosts, but while they cause an acute infection in the former, they have a persistent relationship with the latter. In other words, they can last longer as replicative entities in mosquito bodies than in humans due to several molecular mechanisms that still need clarification.

Unlike humans, mosquitoes lack an adaptive immune system and rely on cellular and humoral innate responses to halt pathogen infections [3]. The innate cellular response refers to

specialized haemocytes that act in the nodulation, encapsulation, melanization and phagocytosis of pathogens. Humoral responses concern the production of antimicrobial peptides (AMPs), reactive oxygen species (ROS), and phenoloxidase cascade components upon microbial infection. Protein kinase pathways, e.g. JAK-STAT, Toll and Imd, perform the signal transduction from pathogen sensing to the expression of downstream immunity genes [4]. Against viruses, the most robust response seems to be RNA interference (RNAi) pathways, in which viral double-stranded RNAs or replicative intermediates are processed by a set of cellular proteins producing small-interfering (si) RNAs that target the viral (v) RNA for degradation [5]. Production of other types of non-coding interfering RNAs, such as PIWI-interacting RNAs

Received 14 June 2021; Accepted 19 October 2021; Published 08 December 2021

**Author affiliations:** <sup>1</sup>Laboratory of Virology, Department of Cell Biology, University of Brasília, Brasília, Brazil.

**\*Correspondence:** Athos S. de Oliveira, athos.so@gmail.com

**Keywords:** *Aedes aegypti*; Aag-2; Chikungunya virus; Mayaro virus; recombinant viral RNA; vaccine candidate.

**Abbreviations:** CHIKV, Chikungunya virus; CP, capsid protein; CPE, cytopathic effect; DVG, defective viral genome; HVD, hypervariable domain; MAYV, Mayaro virus; RNAi, RNA interference; rvRNA, recombinant viral RNA; UTR, untranslated region; vDNA, viral-derived DNA; vRNA, viral RNA. Two supplementary tables and four supplementary figures are available with the online version of this article.



## Entomopathogenic Viruses in the Neotropics: Current Status and Recently Discovered Species

DR SOSA-GÓMEZ<sup>1</sup>, FS MORGADO<sup>2</sup>, RFT CORRÊA<sup>3</sup>, LA SILVA<sup>2</sup>, DMP ARDISSON-ARAÚJO<sup>4</sup>, BMP RODRIGUES<sup>2</sup>, EE OLIVEIRA<sup>5</sup>, RWS AGUIAR<sup>3</sup>, BM RIBEIRO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Soja, Londrina, PR, Brasil

<sup>2</sup>Depto de Biologia Celular, Univ of Brasília, Brasília, DF, Brasil

<sup>3</sup>Depto de Biotecnologia, Univ Federal de Tocantins, Gurupi, TO, Brasil

<sup>4</sup>Depto de Bioquímica e Biologia Molecular, Univ Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

<sup>5</sup>Depto de Entomologia, Univ Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil

### Keywords

Insect viruses, baculoviruses, biological control, RNA insect viruses, DNA insect viruses

### Correspondence

BM Ribeiro, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Soja, Londrina, PR, Brasil; bergmann.ribeiro@gmail.com

Edited by Lessandro Moreira Gontijo – UFV

Received 14 November 2019 and accepted 3 March 2020

© Sociedade Entomológica do Brasil 2020

### Abstract

The market for biological control of insect pests in the world and in Brazil has grown in recent years due to the unwanted ecological and human health impacts of chemical insecticides. Therefore, research on biological control agents for pest management has also increased. For instance, insect viruses have been used to protect crops and forests around the world for decades. Among insect viruses, the baculoviruses are the most studied and used viral biocontrol agent. More than 700 species of insects have been found to be naturally infected by baculoviruses, with 90% isolated from lepidopteran insects. In this review, some basic aspects of baculovirus infection *in vivo* and *in vitro* infection, gene content, viral replication will be discussed. Furthermore, we provide examples of the use of insect viruses for biological pest control and recently characterized baculoviruses in Brazil.

### Introduction

Viruses are probably the most abundant and diverse biological entities on earth (Suttle 2005, 2007, Shi *et al* 2016). In recent years, the systematic discovery of thousands of new viruses has undergone a renaissance as a field of research (Delwart 2012, Deeks *et al* 2013). The novel techniques in viral metagenomics and high throughput sequencing (HTS) have highlighted the amazing diversity of viruses-related sequences in an unexpected array of animals such as invertebrates (Junglen & Drosten 2013, Shi *et al* 2016, Bovo *et al* 2017). HTS allows for fast, low-cost, high output, and correct sequencing for identification of microorganism sequences derived from whole insects or specific tissues, and for covert or latent viruses in the host. The study of insect viruses is important since in many cases they can infect and cause diseases in beneficial insects (e.g., honey bees, silkworms) (Maori *et al* 2009) and also infect and kill agricultural and

forest insect pests (Moscardi 1999). Besides that, insect viruses have been used as eukaryotic protein expression vectors in biotechnology (van Oers *et al* 2015). Opposing to the typical view of viruses as pathogens, viruses may also have mutualistic or symbiotic relationships with their hosts (Roossinck 2011). For example, an insect virus called polydnavirus is essential for the survival of some parasitoid wasps during their development within the host insect body (Schmidt *et al* 2001). A densovirus (*Dysaphis plantaginea* densovirus, DpIDNV) is involved in determining the morphology of the wings of the aphid *Dysaphis plantaginea* (Passerini) (Ryabov *et al* 2009).

### Entomopathogenic Viruses

Conventionally, viruses are isolated from insects with visible symptoms of infection (Liu *et al* 2011a). Baculovirus infections

## Premiação em congresso:

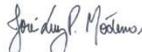


## Certificado

Certificamos que o trabalho **CO.35, "UNRAVELLING THE BACULOVIRUS-ORTHOMYXOVIRUS CONNECTION: INSIGHTS FROM THE GP64 GENE TRANSFER AND HOST SPECIFICITY ANALYSES"**, de autoria de **Rodrigues BMP, Janssen L, Gomes SSVSF, Silva LA, Almeida RN, Araújo DMPA, Camargo BR, Berlitz DL, Fiuza LM, Lima Neto DF, Ribeiro BM** e apresentado por **Bruno Milhomem Pilati Rodrigues**, foi premiado como **MELHOR COMUNICAÇÃO ORAL** na sessão **"Oral presentation 9 - Invertebrate Virology"** durante o **34º Congresso Brasileiro de Virologia**, realizado de 24 a 27 de setembro de 2023 no Centro de Artes e Convenções da UFOP, Ouro Preto, MG.



**Helena Lage Ferreira**  
Presidente Sociedade Brasileira de Virologia



**José Luiz Proença Módena**  
Tesoureiro da Sociedade Brasileira de Virologia