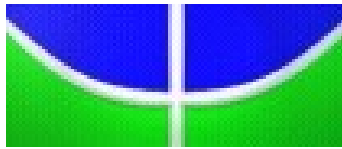


**Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular**

**Clonagem, análise da seqüência do gene *p74* e filogenia  
de um novo vírus isolado da lagarta-do-álamo  
*Condylorrhiza vestigialis***

**Geraldo Furtado Almeida**

**Brasília, DF  
2008**



**Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular**

**Clonagem, análise da seqüência do gene *p74* e filogenia  
de um novo vírus isolado da lagarta-do-álamo  
*Condylorrhiza vestigialis***

**Geraldo Furtado Almeida**

**Matrícula: 06/49163**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento  
de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da  
Universidade de Brasília como requisito à obtenção do  
grau de Mestre em Biologia Molecular.**

**Orientadora: Dra. Maria Elita Batista de Castro**

**Brasília, DF  
2008**

**Trabalho realizado no Laboratório de Virologia de Insetos (LVI) do Núcleo Temático de Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), com suporte financeiro da EMBRAPA e CAPES-UnB.**

**Orientadora: Dra. Maria Elita Batista de Castro  
Pesquisadora - CENARGEN**

**Banca Examinadora:**

Dra. Maria Elita Batista de Castro (Orientadora) – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN).

Dr. Bergmann Morais Ribeiro – Universidade de Brasília (UnB).

Dr. Peter Ward Inglis – Consultor da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN).

**Suplente:**

Dra. Maria Cléria Valadares-Inglis – ex-Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN).

*Aos meus pais Flávio e  
Luci. Com muito amor,  
admiração e respeito.*

*E a minha querida irmã  
Flávia.*

*“Ninguém é tão grande que não possa aprender, nem  
tão pequeno que não possa ensinar.”*

**Píndaro (poeta romano)**

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

**À minha orientadora, Dra. Maria Elita B. de Castro**, pela orientação científica na realização deste trabalho, além da sua amizade, dedicação, paciência e contribuição na minha formação científica e como pessoa.

**À Dra. Débora Pires Paula**, pela ajuda e informações na clonagem, montagem e análise da seqüência do gene, bem como na contribuição da minha formação científica.

**Ao Dr. Felipe Rodrigues da Silva**, pela ajuda na fase inicial da clonagem do gene.

**Ao Departamento de Biologia Celular** desta Universidade (UnB), em especial ao **Prof. Dr. Bergmann M. Ribeiro** por informações e ajudas relevantes durante a dissertação.

**À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, pelo suporte técnico e financeiro à pesquisa realizada.

**À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa de estudo durante a realização deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

À Dra. Marlinda Lobo de Sousa, pelas informações e sugestões no decorrer do trabalho e também pela sua amizade.

Ao Dr. Peter Inglis e Dra. Ana Yamagushi Ciampi pelo apoio e sugestões no projeto de qualificação defendido durante o curso.

A todos os professores e colegas do curso de pós-graduação em Biologia Molecular e ao pessoal da secretaria do Departamento de Biologia Celular, em especial a funcionária Ana.

Ao pessoal da Plataforma de Seqüenciamento de DNA da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelas reações de sequenciamento e por algumas sugestões importantes durante a montagem da seqüência gênica, em especial a bióloga Luciana Labuto.

A Deus, pela vida, proteção e benção em todos os momentos.

Aos meus amados pais, pela incrível dedicação e apoio em todos os momentos.

A toda minha família, que de alguma forma me ajudou a ser uma pessoa melhor.

Aos meus amigos do Laboratório de Virologia de Insetos, Raimundinha, Felipe, Lorena, Juliana, Ayeska, Lucas, Paulo, Saluana, Briana, Syomara, pelos momentos de diversão durante os trabalhos e também pelo auxílio prestado na condução dos experimentos; em especial, William, Zilda e Dr. Pinedo, por informações relevantes sobre os experimentos desenvolvidos.



## ÍNDICE

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	11
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
INTRODUÇÃO.....	17
1. Características gerais, taxonomia e filogenia dos baculovirus.....	17
2. Ciclo de infecção dos baculovirus.....	19
3. Estrutura, composição e infectividade das formas virais .....	23
3.1 Budded virus (BV).....	24
3.2 Occlusion-derived virus (ODV).....	25
4. Fatores de infectividade per os dos baculovirus .....	26
4.1 Gene p74 .....	27
4.1.1. Função e modo de ação.....	28
4.1.2. Organização genômica do locus p74.....	30
4.1.3 Estrutura Protéica.....	30
4.1.4 Aspectos Filogenéticos.....	33
4.2 Genes pif-1, pif-2 e pif-3 .....	35
5. Outros fatores que afetam a infectividade oral: genes enhancers (vef).....	38
6. Condylorrhiza vestigialis multiple nucleopolyhedrovirus (CvMNPV).....	39
JUSTIFICATIVA CIENTÍFICA E OBJETIVO GERAL.....	43
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
1. Vírus e Insetos.....	45
(B) .....	47
Figura 5. Mapa genético simplificado dos vetores de clonagem. (A) pBluescript II SK+ (Stratagene). (B) pGEM-T Easy (Promega). Ilustrações retiradas dos endereços eletrônicos <a href="http://www.stratagene.com">www.stratagene.com</a> e <a href="http://www.promega.com">www.promega.com</a> , respectivamente.....	48
3. Amplificação de uma região interna do gene p74 do baculovirus CvMNPV.....	48
4. Purificação de partículas virais e extração de DNA.....	59
5. Clivagem do DNA genômico de CvMNPV por enzimas de restrição.....	60
6. Amplificação da região interna do gene p74 e da sua extremidade terminal por PCR - Polymerase Chain Reaction.....	60
7. Hibridização Southern blot.....	61
8. Isolamento de fragmentos de restrição contendo o gene p74 e o fragmento da região terminal do gene .....	62
9. Clonagem do gene p74.....	63
9.1 - Construção do plasmídeo recombinante.....	63
9.2 - Transformação por choque térmico .....	64
9.3 - Minipreparação de plasmídeos por lise alcalina.....	65
9.4 - Confirmação da clonagem.....	66
10. Sequenciamento do gene p74 e processamento da seqüência .....	66
11. Análise computacional da seqüência nucleotídica do gene p74 e da seqüência de aminoácidos deduzida.....	68
12. Alinhamento múltiplo dos homólogos P74 e construção da árvore filogenética do CvMNPV.....	68
RESULTADOS.....	71
1. Identificação do gene p74 no genoma de CvMNPV .....	71
2. Clonagem e sequenciamento de fragmentos contendo gene p74 de CvMNPV.....	74
ConCLUSÕES .....	101

O gene p74 de foi localizado parcialmente nos fragmentos HindIII (banda 1,0 kb) e EcoRI (banda 3,0 kb) no perfil de restrição do genoma de CvMNPV.....	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
MUKAWA, S., GOTO, C. (2007). Enhancement of nucleopolyhedrovirus infectivity against <i>Mamestra brassicae</i> (Lepidoptera: Noctuidae) by proteins derived from granulovirus and a fluorescent brightener. <i>Journal of Economic Entomology</i> 100: 1075–1083.....	110

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- NPV - *Nucleopolyhedrovirus*  
 GV – *Granulovirus*  
 AdhoNPV - *Adoxophyes honmai* NPV  
 AdorGV - *Adoxophyes orana* GV  
 AgseGV - *Agrotis segetum* GV  
 AgseNPV - *Agrotis segetum* NPV  
 AnpeNPV - *Antheraea pernyi* NPV  
 AgMNPV - *Anticarsia gemmatalis* MNPV  
 AcMNPV - *Autographa californica* MNPV  
 BmNPV - *Bombyx mori* NPV  
 CfDEFNPV - *Choristoneura fumiferana defective* MNPV  
 CfMNPV - *Choristoneura fumiferana* MNPV  
 ChfuGV - *Choristoneura fumiferana* GV  
 ChchNPV - *Chrysodeixis chalcites* NPV  
 CbNPV - *Clanis bilineata* NPV  
 CrleGV - *Cryptophlebia leucotreta* GV  
 CuniNPV - *Culex nigripalpus* NPV  
 CpGV - *Cydia pomonella* GV  
 EcobNPV - *Ecotropis obliqua* NPV  
 EppoNPV - *Epiphyas postvittana* NPV  
 HearNPV - *Helicoverpa armigera* NPV  
 HzSNPV - *Helicoverpa zea* SNPV  
 HycuNPV - *Hyphantria cunea* NPV  
 LeseNPV - *Leucania separata* NPV  
 LdMNPV - *Lymantria dispar* MNPV  
 MacoNPV - *Mamestra configurata* NPV  
 MaviMNPV - *Maruca vitrata* MNPV  
 NeleNPV - *Neodiprion lecontei* NPV  
 NeseNPV - *Neodiprion sertifer* NPV  
 OINPV - *Orgyia leucostigma* NPV

OpMNPV - *Orgyia pseudotsugata* MNPV

PhopGV - *Phthorimaea operculella* GV

PlxyGV - *Plutella xylostella* GV

PlxyMNPV - *Plutella xylostella* MNPV

RoMNPV - *Rachiplusia* MNPV

SeMNPV - *Spodoptera exigua* MNPV

SfMNPV - *Spodoptera frugiperda* MNPV

SpliNPV - *Spodoptera littoralis* NPV

SpltNPV - *Spodoptera litura* NPV

XecnGV - *Xestia c-nigrum* GV

BV - vírus extracelular ou *budded virus*

OB - corpo de oclusão viral ou *occlusion body*

ODV – vírus derivado de corpo de oclusão ou *occlusion derived virus*

kb - kilobases

pb - pares de bases

*p74* - gene *p74*

P74 - proteína P74

*pif* - genes que codificam fatores de infectividade *per os*

PIF – fator (proteína) de infectividade *per os*

*per os* - via oral

dNTP - 2'-desoxinucleotídeo 5'-fosfato

[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP – fósforo radioativo – deoxicitidina trifosfato

PCR – reação em cadeia pela polimerase (*polymerase chain reaction*)

ORF – matriz aberta de leitura (*Open reading frame*)

BBMV – vesículas de membrana (*Brush-border membrane vesicles*)

aa. – aminoácidos

LD<sub>50</sub> – dose viral requerida para matar 50% do número total de insetos testados

*vef* – genes *enhancers* (*viral enhancing factors*)

PAUP - *Phylogenetic Analysis Using Parsimony*

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

SMART - *Simple Modular Architecture Research Tool*

## RESUMO

*Condylorrhiza vestigialis multiple nucleopolyhedrovirus* (CvMNPV) é um baculovirus patogênico a lagartas de *Condylorrhiza vestigialis* (Guenée, 1854) (Lepidoptera: Crambidae), uma praga de uma espécie florestal, conhecida como Álamo (*Populus* spp., Salicaceae), de considerável importância econômica. Este baculovirus foi recentemente identificado e pouca informação pertinente à sua taxonomia tem sido relatada. No estudo apresentado, o gene *p74* de CvMNPV foi identificado, sequenciado, e sua relação filogenética com outros baculovirus estimada. O gene *p74* codifica uma proteína altamente conservada e é essencial para a infectividade do ODV. A detecção do gene *p74* de CvMNPV foi feita usando hibridização *Southern blot* dos produtos do DNA genômico clivados com as enzimas de restrição *HindIII*, *PstI* e *EcoRI* com uma sonda radioativa de DNA obtida a partir da amplificação parcial do gene *p74* por PCR. Dois fragmentos de restrição e um produto de PCR da região terminal do gene *p74* foram clonados nos plasmídeos pBluescript II KS<sup>+</sup> (Stratagene) e pGEM-T Easy (Promega), respectivamente. Utilizando-se ferramentas de bioinformática, a análise dos resultados do sequenciamento nucleotídico possibilitou a identificação da ORF *p74* de 1935 pb (nº de acesso EU919397 no *GenBank/EMBL*) que codifica potencialmente um polipeptídeo de 644 aminoácidos de 73,6133 kDa e ponto isoelétrico de 5,1. O alinhamento da seqüência de aminoácidos P74 deduzida de CvMNPV com homólogos de baculovirus revelou a presença de quatro domínios conservados: dois domínios P74 relacionados à infectividade oral e dois domínios transmembrânicos na região C-terminal. Os domínios P74 hipoteticamente estão expostos na superfície do envelope e interagem com receptores específicos na membrana plasmática da célula hospedeira. Os domínios transmembrânicos são responsáveis pela inserção da proteína na membrana do envelope do ODV. A seqüência de aminoácidos P74 deduzida de CvMNPV potencialmente sofre modificações pós-traducionais do tipo glicosilação, fosforilação e miristilação e apresenta como estrutura secundária predominante a  $\alpha$ -hélice. A análise filogenética baseada na seqüência nucleotídica do gene *p74* de CvMNPV e na sua seqüência de aminoácidos deduzida manteve a divisão da família *Baculoviridae* nos quatro grupos descritos em estudos similares (NPV específicos de lepidópteros, GV específicos de lepidópteros, NPV específicos de himenópteros e NPV específicos de dípteros) e forneceu dados consistentes para confirmar que o CvMNPV pertence ao Grupo I dos NPV, e que o CvMNPV é mais proximamente relacionado com

*Choristoneura fumiferana* defective NPV. Estes resultados constituem uma importante contribuição para a caracterização deste novo vírus (CvMNPV), o qual possui grande potencial para o controle biológico de lagartas *Condylorrhiza vestigialis*.

## ABSTRACT

*Condylorrhiza vestigialis multiple nucleopolyhedrovirus* (CvMNPV) is a baculovirus pathogenic to *Condylorrhiza vestigialis* caterpillars (Guenée, 1854) (Lepidoptera: Crambidae), a pest of a forest species known as Poplar (*Populus* spp., Salicaceae) of considerable economic importance. This baculovirus was recently identified and few informations pertaining to its taxonomy has been reported. In the present study, the *p74* gene from CvMNPV was identified, sequenced and its phylogenetic relationship with other baculoviruses estimated. The gene *p74* encodes a protein that is highly conserved among all sequenced baculoviruses and is essential for ODV infectivity. The detection of CvMNPV *p74* gene was done using Southern blot hybridization from genomic DNA digested with the restriction endonucleases *Hind*III, *Pst*I, *Eco*RI and a radioactive DNA probe resulting from partial amplification of the *p74* gene by PCR. Two DNA restriction fragments and a PCR product from terminal region of *p74* gene were cloned in pBluescript II KS<sup>+</sup> (Stratagene) and pGEM-T Easy (Promega) plasmids respectively. By using bioinformatics tools, the nucleotidic sequence analysis possibilited the identification of the *p74* ORF of 1935bp (*GenBank*/EMBL accession number EU919397) that potentially encodes a polypeptide of 644 amino acids with predicted molecular mass of 73.6133 kDa and an isoelectric point of 5.12. The alignment of the CvMNPV P74 deduced amino acid sequence with other homologous baculoviruses revealed the presence of four conserved domains: two P74 domains related to oral infectivity and two transmembrane domains in the C-terminal region. The P74 domains are hypothetically exposed outside of ODV envelopes and attach with specific receptors present in the host cell plasma membrane. The transmembrane domains are responsible by anchored within of ODV envelope. The CvMNPV deduced amino acid sequence potentially undergoes post-translational modifications as glycosylation, phosphorylation and myristoylation and present  $\alpha$ -helix as secondary structure. Phylogenetic analysis based on the CvMNPVp74 deduced amino acid and nucleotide sequences maintained the division of the *Baculoviridae* family in the four groups described in similar studies (lepidopteran-specific NPV, lepidopteran-specific GV, hymenopteran-specific NPV and dipteran-specific NPV) and provided consistent data to affirm that the CvMNPV baculovirus belongs to the lepidopteran NPV Group I, and that the CvMNPV is most closely related with *Choristoneura fumiferana defective* NPV (CfDEFNPV). These

results constitute an important contribution to characterization of this new virus (CvMNPV) which has a high potential for biological control of *Condylorrhiza vestigialis* caterpillars.



# INTRODUÇÃO

## 1. Características gerais, taxonomia e filogenia dos baculovirus

Atualmente são reconhecidas dezessete famílias de vírus de inseto, sendo a família dos baculovirus a de maior importância (Theilmann *et al.*, 2005). A família *Baculoviridae* é um grupo de vírus entomopatogênicos que infectam artrópodes, principalmente insetos da ordem Lepidoptera (Belaich *et al.*, 2006), podendo ocorrer ainda em Hymenoptera, Diptera e alguns crustáceos da ordem Decapoda (Theilmann *et al.*, 2005).

Os baculovirus são caracterizados por partículas virais baciliformes (nucleocapsídeo em forma de bastão), envoltos por um envelope membranoso e ocluído em uma matriz protéica. Os vírions contêm DNA fita dupla circular, com tamanho genômico variável entre as diferentes espécies, de 80 a 180 kb (Theilmann *et al.*, 2005). O representante mais bem caracterizado e considerado protótipo do gênero NPV é o *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) com um genoma de 134 kb, que codifica aproximadamente 150 genes (Ayres *et al.*, 1994).

No ciclo de replicação dos baculovirus, os genes são expressos em uma cascata transcricional, na qual a fase seguinte é dependente da expressão dos genes da fase anterior. Assim, estes genes podem ser conceitualmente divididos em três fases temporais de expressão: inicial (*early*), tardia (*late*) e muito tardia (*very late*) (Friesen e Miller, 1986; Blissard e Rhormann, 1990), que correspondem biologicamente à programação celular para a replicação viral, produção de vírus extracelulares (BV - *budded viruses*) e produção de corpos de oclusão (OB - *occlusion bodies*).

Tradicionalmente, os baculovirus têm sido classificados de acordo com o tamanho, a forma e a localização intracelular dos corpos de oclusão (OB) que se formam em células infectadas (Herniou *et al.*, 2001). Assim, esta família está classificada em dois gêneros: os *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e os *Granulovirus* (GV) (Theilmann *et al.*, 2005). Os NPV caracterizam-se pela formação de corpos de oclusão poliédricos entre 0,15 e 15 µm, contendo um (SNPV) ou vários (MNPV) vírions por oclusão cristalina. Os GV apresentam geralmente uma única partícula viral por corpo de oclusão, formando um grânulo de aproximadamente 0,3 x 0,5 µm de tamanho (Theilmann *et al.*, 2005). Outra diferença marcante entre estes dois gêneros é a proteína estrutural presente na oclusão cristalina do vírus, a qual é essencial para proteger os vírions da inativação pelas condições ambientais e permite a preservação da sua capacidade de replicação. Assim, enquanto que no NPV a proteína presente em grande quantidade é a poliedrina, no GV predomina a granulina.

A disponibilidade de seqüências genômicas completas de baculovirus e abordagens de bioinformática têm aumentado o interesse no uso de tais dados para a reconstrução filogenética dos baculovirus e conseqüentemente fornecido um quadro detalhado da evolução e filogenia destes vírus (Herniou e Jehle, 2007). Estudos filogenéticos de baculovirus, utilizando o gene da poliedrina / granulina e posteriormente outros genes conservados (*egt*, *dnapol*, *gp41*), propuseram uma subdivisão dos NPV em Grupo I e Grupo II (Zanotto *et al.*, 1993; Bulach *et al.*, 1999; Herniou *et al.*, 2001). Além das seqüências de genes comuns em todos os genomas seqüenciados e das proteínas preditas, que podem ser analisadas de forma separada ou combinada, outros conjuntos de dados complementares têm sido utilizados na filogenia molecular de baculovirus, como: a ordem gênica (compara as posições dos genes nos diferentes genomas) e o conteúdo gênico (avalia a presença e ausência de cada gene nos

diferentes genomas). Todavia, estas abordagens culminam com a separação da família *Baculoviridae* em GV e NPV, bem como a subdivisão dos NPV em Grupo I e Grupo II, como postulado por Zanotto *et al.* 1993 e Bulach *et al.* 1999 (Herniou *et al.*, 2001; 2003).

Estudos utilizando genomas completos dos baculovirus sequenciados mostraram divergências quanto à classificação de NPV, sugerindo a subdivisão da família *Baculoviridae* em novos gêneros (Herniou *et al.*, 2003). A atual classificação dos baculovirus foi contestada após a caracterização de um NPV isolado do díptero *Culex nigripalpus* (CuniNPV), indicando que a distância filogenética entre CuniNPV e NPV de Lepidoptera é muito maior que a entre NPV e GV de Lepidoptera (Afonso *et al.*, 2001; Moser *et al.*, 2001). Assim, baseado em evidências na filogenia molecular e em características morfológicas e biológicas, foi proposto que a família *Baculoviridae* deveria ser subdividida em quatro gêneros: *Alphabaculovirus* (incluiria os NPV específicos de Lepidoptera), *Betabaculovirus* (incluiria os GV específicos de Lepidoptera), *Gamabaculovirus* (incluiria NPV específicos de Hymenoptera) e os *Deltabaculovirus* (compreenderia os baculovirus específicos de Diptera, como o CuniNPV) (Jehle *et al.*, 2006; Herniou e Jehle, 2007). A complexidade em forma e função dos vírus da família *Baculoviridae* sugere uma longa linhagem evolucionária (Slack e Arif, 2007).

## **2. Ciclo de infecção dos baculovirus**

Diferentemente de outras famílias de vírus, os baculovirus apresentam dois fenótipos: *budded virus* (BV) e *occlusion-derived virus* (ODV) (Theilmann *et al.*, 2005), os quais são estruturalmente e funcionalmente distintos em seus ciclos de infecção (Zhou *et al.*, 2005).

Os ODV estabelecem a primeira fase de infecção dentro da larva hospedeira (infecção primária) e são responsáveis pela transmissão horizontal da infecção, ou seja, transmitem os vírions entre os insetos hospedeiros, o que garante a permanência do vírus no ambiente. Os BV estabelecem a segunda fase de infecção (infecção secundária), sendo responsáveis pela infecção sistêmica no hospedeiro (célula-célula) (Stapleton-Haas *et al.*, 2004) e também pela infecção em cultura de células.

Cada fenótipo viral realiza suas funções sob condições ambientais diferentes e infectam tipos distintos de células (Stapleton-Haas *et al.*, 2004). Os BV circulam na hemolinfa (pH 6,4 - 6,8) do inseto hospedeiro e infectam vários tipos celulares, sendo um fenótipo generalista. Em contraste, os ODV são especialistas, pois infectam somente as células altamente diferenciadas do epitélio colunar do intestino médio das larvas, onde o pH é alcalino (pH 9,2 - 11) (Stapleton-Haas *et al.*, 2004). Outra diferença marcante que tem sido constatada entre os dois fenótipos é o mecanismo pelo qual cada um deles entra em sua célula-alvo específica. Enquanto a entrada dos BV nas células hospedeiras ocorre por meio de uma endocitose adsortiva (Volkman *et al.*, 1986) dependente de pH ácido (Blissard e Wenz, 1992), os ODV entram nas células epiteliais do intestino médio por fusão direta de membrana na superfície celular, aparentemente sem a presença de uma maquinaria fusogênica viral (Summers, 1971; Granados, 1978; Granados e Lawler, 1981; Ohkawa *et al.*, 2005).

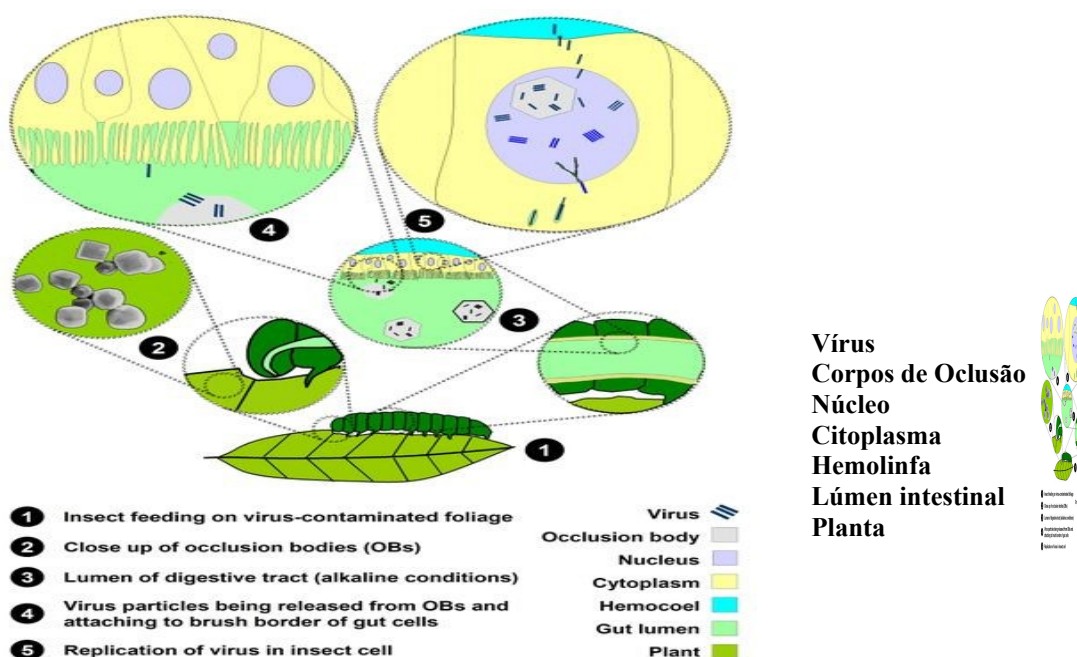
A principal rota de infecção dos baculovirus envolve o fenótipo ODV. Na natureza, a infecção primária começa no intestino médio da larva após a ingestão de poliedros (OB) presentes, por exemplo, na superfície das folhas de plantações existentes no campo (Figura 1). O intestino médio constitui uma região bastante favorável à entrada do vírus, uma vez que o intestino anterior e o posterior são recobertos por uma cutícula, considerada uma barreira física à infecção (Bilimoria, 1991; Tanada e Kaya,

1993). Assim, o ambiente alcalino encontrado no intestino médio da larva e proteinases ali presentes desencadeiam a dissolução destes poliedros e conseqüentemente a liberação dos ODV infecciosos no lúmen digestivo (Stapleton-Haas *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2005). Os ODV liberados atravessam a membrana peritrófica do epitélio do intestino médio, uma espécie de matriz extracelular glicoprotéica e fazem contato com as extremidades das microvilosidades apicais das células colunares, para estabelecer a infecção (Federici, 1997; Stapleton-Haas *et al.*, 2004). Neste momento, o envelope do ODV interage com a membrana das células colunares e por fusão direta com essa membrana os vírions são desempacotados (Slack *et al.*, 2001) e penetram na célula. Os nucleocapsídeos, agora livres no citoplasma, podem seguir duas vias distintas: ser transportados para o núcleo das células colunares, iniciando a replicação de novos nucleocapsídeos ou podem migrar diretamente para a membrana plasmática basolateral, de onde brotam e já iniciam a infecção sistêmica. Os novos nucleocapsídeos que se formam no núcleo celular, também brotam pela membrana baso-lateral da célula hospedeira e adquirem um envelope lipídico, com parte das proteínas codificadas pelo próprio vírus, formando os vírus extracelulares ou *budded virus* (BV) (Bilimoria, 1991; O'Reilly *et al.*, 1992; Faulkner *et al.*, 1997). Essas partículas BV penetram na hemolinfa, via membrana baso-lateral, infectam os hemócitos e invadem o sistema traqueal do inseto disseminando a infecção para outros tecidos, até culminar na morte da lagarta hospedeira (Engelhard *et al.*, 1994).

Durante o ciclo de infecção, os nucleocapsídeos migram para o núcleo celular, onde ocorre a transcrição e replicação viral produzindo novos nucleocapsídeos (Granados e Lawler, 1981). Em etapas mais adiantadas da infecção (por volta de 20 h p.i.) ocorre a maturação dos ODV no estroma virogênico, onde alguns vírions se acumulam na zona do anel intranuclear (espaço peristromal), adquirem seu envelope

lipo-protéico e tornam-se oclusos em uma matriz protéica, composta principalmente pela proteína poliedrina ou granulina (Summers e Smith, 1976), formando, assim, os corpos de oclusão (OB).

À medida que os BV vão se multiplicando dentro das células colunares do intestino médio do inseto e se espalhando por outros tecidos, a quantidade de OB formados aumenta no interior do núcleo das células, causando sua hipertrofia e posteriormente a lise celular (Granados e Williams, 1986). Estes efeitos citopáticos causados pela infecção, em sinergismo com a atividade de quitinasas (Chi A) e de proteases (V-CATH) virais, causam a morte e a liquefação do tecido da larva, liberando bilhões de poliedros no meio ambiente (Slack *et al.*, 2001). Estes poliedros, por sua vez, podem infectar outros insetos e garantir a existência do ciclo de replicação do vírus na natureza.



- 1 - Inseto comendo folhagem contaminada com vírus; 2 - Focalização de corpos de oclusão (OB);  
 3 - Lúmen do trato digestivo (condições alcalinas); 4 - ODV sendo liberado pelo OB e interagindo com as microvilosidades das células do intestino médio; 5 - Replicação do vírus nas células do inseto.

**Figura 1. Diagrama do ciclo de infecção de um nucleopolyhedrovirus.** [Granados, R.R. e Federici, B.A. (eds.), 1986; Miller, L.K. (ed.), 1997; Rohrmann, G.F., 1992; <http://en.wikipedia.org/wiki/Baculovirus>].

### 3. Estrutura, composição e infectividade das formas virais

As partículas ODV e BV possuem conjuntos protéicos distintos, apresentando, portanto, fenótipos diferentes (Figura 2). Embora seus nucleocapsídeos sejam similares em estrutura, possuindo genótipos idênticos, as duas formas virais diferem na composição de seus envelopes. Por sobreviverem em ambientes distintos, infectarem células-alvo diferentes e possuírem funções diferentes, cada tipo de forma infectiva possui proteínas específicas (Kikhno *et al.*, 2002). Técnicas imunoquímicas têm sido usadas para demonstrar a especificidade das proteínas de cada forma viral (Volkman, 1983). Este conjunto protéico diferencial entre as formas virais, principalmente as proteínas com projeções extramembranas, é responsável pela especificidade dos processos de entrada do ODV e BV na célula e conseqüentemente determina suas respectivas funções no ciclo de infecção viral (Braunagel e Summers, 1994). Análises das ORF 122 (gene *Ha122*) de *Helicoverpa armigera* single nucleopolyhedrovirus (HearSNPV) e 117 (gene *Se117*) de *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) mostraram que essas ORFs codificam proteínas específicas de nucleocapsídeos de ODV, mas não de BV (Long *et al.*, 2003; Ijkel *et al.*, 2001).

Além do conjunto protéico, a composição lipídica do envelope das duas formas virais também apresenta algumas diferenças. Enquanto envelope BV consiste basicamente de fosfatidilserina, o envelope ODV contém fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina (Braunagel e Summers, 1994).

Estas notáveis diferenças na composição dos envelopes de ODV e BV indicam que o tráfego de seus componentes deve ser finamente regulado, para que estes possam eficientemente alcançar seus destinos específicos e com adequada proporção estequiométrica durante a montagem (Acosta *et al.*, 2001). Atualmente, já se sabe que a proteína 25KFP afeta a expressão (provavelmente em nível traducional) e o transporte

de várias proteínas virais para dentro do núcleo, sendo essencial para a montagem correta do ODV e BV (Beniya *et al.*, 1998; Acosta *et al.*, 2001).

### 3.1 Budded virus (BV)

Ao longo dos anos, estudos realizados sobre a entrada da partícula BV na célula hospedeira, além de demonstrar que os BV entram na célula por um processo de endocitose adsortiva dependente de pH, sua estrutura e composição foram sendo elucidadas.

Estudos de microscopia eletrônica têm mostrado que os nucleocapsídeos adquirem seu envelope lipoprotéico na membrana plasmática das células (Frazer, 1986), porém a maior parte das proteínas é codificada pelo próprio vírus.

Os BV caracterizam-se por um nucleocapsídeo simples, cuja principal proteína é a VP39, sendo envolto por um envelope frouxo derivado da membrana plasmática, contendo em sua superfície projeções denominadas de peplômeros (Volkman, 1986), compostas principalmente pela GP64 ou por outras proteínas, como a Ld130, dependendo da espécie de baculovirus.

Já se sabe, que para os NPV do Grupo I, tal como *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), a glicoproteína de membrana GP64 presente no envelope é responsável pela ligação e ativação do processo (Blissard e Wenz, 1992; Zhou *et al.*, 2005). Já para os NPV do Grupo II e para os *Granulovirus*, os quais não possuem GP64, outras proteínas do envelope estão envolvidas neste processo, sendo conjuntamente denominadas de proteínas F (Ijkel *et al.*, 1999; Kuzio *et al.*, 1999; Lung *et al.*, 2002; Westenberg *et al.*, 2004). Recentemente, Yin *et al.* (2008) identificaram experimentalmente a proteína F de *Agrotis segetum* GV (AgseGV) como o primeiro análogo funcional de GP64 derivada dos GV.



### 3.2 Occlusion-derived virus (ODV)

Estudos de microscopia eletrônica demonstraram que os ODV adquirem seu envelope lipoprotéico no interior do núcleo – na “zona do anel intranuclear” (Tanada e Hess, 1976). Ao contrário dos BV, o fenótipo ODV tem uma estrutura mais complexa e contém várias proteínas, compreendendo entre 31 a 44 proteínas, dependendo do método de identificação utilizado (Braunagel *et al.*, 2003, Perera *et al.*, 2007; Slack e Arif, 2007). Dentre estas proteínas, 21 são conservadas entre todos os genomas de baculovirus seqüenciados (Slack e Arif, 2007). Não se sabe ao certo a totalidade de proteínas envolvidas no processo de interação, fusão e penetração da partícula ODV, mas muitos polipeptídeos de função não totalmente conhecida têm sido identificados no envelope ODV (Rohrmann, 1992). Estes incluem o P74 (Kuzio *et al.*, 1989), GP41 (Whitford e Faulkner, 1993), VP17 (Funk e Consigli, 1993), ODV-E25 (Russell e Rohrmann, 1993), ODV-E66 (Hong *et al.*, 1994), ODV-E35 e ODV-E18 (Braunagel *et al.*, 1996a), ODV-E56 (Braunagel *et al.*, 1996b), ODV-EC43 (Fang *et al.*, 2003), PIF (Kikhno *et al.*, 2002), PIF-2 (Pijlman *et al.*, 2003) e PIF-3 (Ohkawa *et al.*, 2005).

É importante ressaltar, que estas proteínas podem estar individualmente ou cooperativamente envolvidas no processo de entrada do vírion na célula colunar do intestino médio do inseto (Slack *et al.*, 2001; Rashidan *et al.*, 2003), pois já se sabe que “fatores” presentes no envelope ODV são essenciais para a infectividade *per os* dos baculovirus.

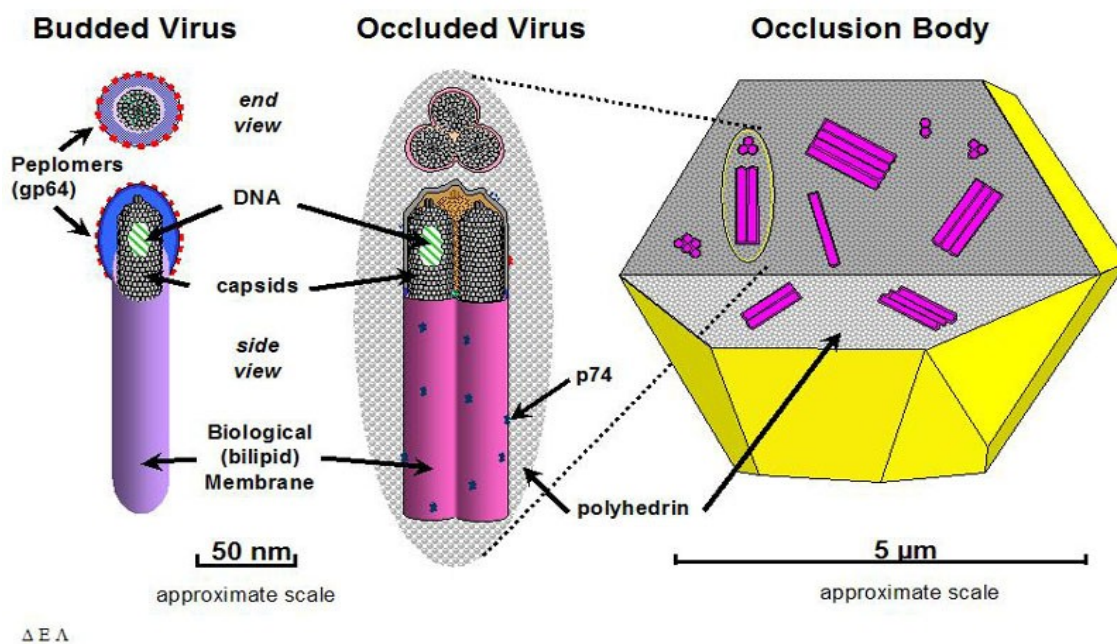


Figura 2. Estrutura e composição das partículas infectivas dos baculovirus: vírus extracelular (*budded virus* - BV), vírus derivado de oclusão (*occluded virus* - ODV) e corpo de oclusão (*occlusion body* - OB). [Granados, R.R. e Federici, B.A. (eds.), 1986; Miller, L.K. (ed.), 1997; Rohrmann, G.F., 1992; <http://en.wikipedia.org/wiki/Baculovirus>].

#### 4. Fatores de infectividade *per os* dos baculovirus

Recentemente, trabalhos de saturação e competição envolvendo ODV de AcMNPV marcados quimicamente (composto R-18), em larvas *Heliothis virescens*, demonstraram que o ODV se liga a receptores específicos presentes nas células epiteliais do intestino médio da larva (Stapleton-Haas *et al.*, 2004). Porém, pouco se sabe sobre os eventos e fatores envolvidos na infecção primária das larvas hospedeiras (Stapleton-Haas *et al.*, 2004). Existem evidências que a associação entre ODV e células do intestino médio requer a interação de proteínas da superfície dos vírions com proteínas da superfície celular (Horton e Burand, 1993).

O processo de interação ODV x células epiteliais do inseto é mediado, em parte, por produtos de fatores gênicos de infectividade oral (PIF) altamente conservados, que são essenciais para a infectividade dos ODV, mas completamente dispensáveis para a infectividade de BV (Stapleton-Haas *et al.*, 2004). Sendo assim, os PIF são proteínas estruturais requeridas para os eventos iniciais da infecção primária (infecção oral- *per os*).

#### 4.1 Gene *p74*

O primeiro gene *pif* a ser relatado foi o *p74* de AcMNPV (Kuzio *et al.*, 1989). O gene de virulência *p74* é do tipo *very late* (Kuzio *et al.*, 1989), o que é de se esperar, pois de acordo com o processo de replicação dos baculovirus as partículas ODV são formadas no estágio mais avançado da infecção.

Este gene codifica uma proteína de 74 kDa, localizada no envelope ODV. Durante a infecção, a proteína P74 se acumula dentro de “microvesículas” no interior da zona do anel intranuclear (fonte de origem do ODV) e torna-se condensada no centro do núcleo à medida que a infecção prossegue, em um padrão de localização similar com a de outras proteínas do envelope ODV (Faulkner *et al.*, 1997; Hong *et al.*, 1997; Slack *et al.*, 2001). Suspeita-se, que a região N-terminal do polipeptídeo seja necessária para a

importação nuclear da proteína P74, pois, a exemplo de outras proteínas do envelope ODV (ODV-E66, ODV-E25, ODV-E56 e ODV-E18), oferece um sinal hidrofóbico de retenção transmembrana que pode ser importante para direcioná-la para o envelope nuclear (Hong *et al.*, 1997; Slack *et al.*, 2001).

Estudos sugerem que dentre os fatores que controlam o tráfego de proteínas do envelope viral destacam-se também a proteína 25KFP ou outras proteínas reguladas por 25KFP, embora este tipo de controle não estenda a todas as proteínas virais (Beniya *et al.*, 1998; Acosta *et al.*, 2001). A localização transmembrana específica da proteína, possivelmente se deve a uma seqüência altamente hidrofóbica de aminoácidos (S580-F645) presente na região C-terminal do polipeptídeo, que pode induzir a inserção pós-traducional da proteína P74 na membrana do ODV (Slack *et al.*, 2001), como ocorre em outras proteínas do envelope ODV, ODV-E66 e ODV-E25 (Hong *et al.*, 1997).

Trabalhos comparando a infecção via injeção intrahemocélica (BV) e via oral de (ODV) de baculovirus do tipo selvagem e mutante (sem *p74* ou com o gene interrompido) indicaram que a deleção do gene *p74* não afetou a infectividade do BV por injeção, somente a infecção via oral do ODV mutante (Stapleton-Haas *et al.*, 2004 ; Zhou *et al.*, 2005; Slack, *et al.* 2001), comprovando a tese de que a proteína P74 está sim envolvida nos eventos iniciais da infecção oral no inseto.

#### 4.1.1. Função e modo de ação

O processo de entrada dos baculovirus nas células do intestino do inseto hospedeiro, durante a infecção primária, ocorre por um processo denominado de fusão direta (Slack *et al.*, 2001). Estudos prévios deduziram que a entrada do vírus ocorreria em dois estágios: ligação do envelope ODV na membrana celular, seguida por fusão do vírion, e que estas duas fases seriam mediadas por fatores de interação e fusão,

respectivamente (Horton e Burand, 1993). Provavelmente, a proteína P74 ocupa um lugar de destaque dentre esses fatores.

Na análise comparativa do processo de infecção, estudos mostraram que o nível de ligação do ODV mutante (sem P74) era três vezes menor que do ODV selvagem, porém a proporção de ODV mutantes ligados que fundiram eram similares a do tipo selvagem. Assim, sugere-se que a P74 atua na ligação específica entre o ODV e a membrana celular do hospedeiro, ou seja, no primeiro estágio do processo de entrada do ODV na célula, e que esta ligação ocorre de forma específica e saturável. Como se trata de estágios interrelacionados, a deleção do *p74* influencia diretamente na fusão do ODV e conseqüentemente na quantidade de partículas virais que conseguem alcançar o espaço intracelular. Portanto, a P74 é de suma importância para a entrada produtiva de ODV nas células, e assim, para a mortalidade das larvas via infecção oral por baculovirus.

Experimentos recentes indicaram que a P74 não afeta a produção e nem a montagem dos BV e ODV. Zhou *et al.* (2005) e Yao *et al.* (2004) confirmam que o *p74* é um polipeptídeo estrutural envolvido *somente* na infectividade dos OB, mais precisamente na interação do vírus com a célula hospedeira e que esta invasão viral poderia ser mediada por um receptor específico. A super-expressão da proteína P74 de AcMNPV em células de inseto não alterou de forma significativa os valores da LD<sub>50</sub> do vírus recombinante, quando comparado com os valores do vírus selvagem (Zhou *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 2004). Isso demonstra que a P74 não altera a patogenicidade do vírus, não sendo considerado, portanto, um fator de virulência e sim um fator de infectividade (Zhou *et al.*, 2005).

Atualmente acredita-se que a proteína P74 funciona como um “ligante-chave”, o qual provavelmente se liga a um receptor específico presente na membrana plasmática

das células epiteliais colunares do intestino médio das larvas (Horton e Burand, 1993). Dois critérios principais apoiam esta suposição: ligação saturável do vírus com as células hospedeiras e sítios de interação P74 com a membrana celular do hospedeiro limitados (Zhou *et al.*, 2005), como já descrito nos estudos mencionados acima. Uma proteína de aproximadamente 30 kDa, presente nas microvilosidades (BBMV - *brush border membrane vesicle*), parece ser o provável receptor para a P74, mediando a invasão do ODV no intestino médio (Zhou *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 2004). Assim, a proteína P74 ao se ligar ao BBMV, de forma eficiente e específica, pode ter um papel importante na determinação da faixa de hospedeiros dos baculovirus (Yao *et al.*, 2004).

#### 4.1.2. Organização genômica do *locus p74*

A literatura demonstra que a ORF (*open reading frame*) dos genes *p74* dos baculovirus varia de 1.7 kb a 2.1 kb, codificando uma proteína entre 578 a 710 aminoácidos (Rashidan *et al.*, 2003). A região a jusante ao códon de iniciação do gene que codifica a proteína P74 de ChfuvGV e de AcMNPV possui um motivo TAAG, comum a promotores fortes de genes muito tardios em baculovirus (Rashidan *et al.*, 2003, 2004; Belaich *et al.*, 2006). Estudos demonstram que a organização genômica no *locus p74* em 30 diferentes baculovirus tem uma alta variabilidade, exibindo um arranjo de genes a montante e principalmente a jusante deste *locus* bastante diversificado (Belaich *et al.*, 2006). Embora o arranjo gênico em baculovirus possa não ter uma relação direta com a função dos genes, Rashidan *et al.* (2004) relatam que, em vários baculovirus estudados, o gene *p10* (fibrilina), que codifica uma proteína associada à matriz protéica do OB (granulina ou poliedrina), está localizado em uma região a montante do gene *p74*.

#### 4.1.3 Estrutura Protéica

Estudos usando detergentes e proteinases sugerem que a proteína P74 está exposta na superfície do vírion, mas precisamente, na região externa do envelope. Tem sido sugerido que a extremidade N-terminal da proteína, composta principalmente por aminoácidos hidrofílicos, está localizada do lado externo do envelope ODV, enquanto que a extremidade C-terminal, altamente hidrofóbica, age como um ancorador transmembrânico, fazendo da P74 uma proteína integral de membrana (Faulkner *et al.*, 1997; Belaich *et al.*, 2006). Em AcMNPV, esta região C-terminal hidrofóbica (S580-F645) desempenha um papel significativo na localização específica da proteína no envelope ODV (Slack *et al.*, 2001), sendo essencial para a sua função durante o ciclo de infecção do vírus (Kuzio *et al.*, 1989).

Uma análise computacional da proteína P74, tanto de *Granulovirus* quanto de *Nucleopolyhedrovirus*, demonstrou a presença de dois domínios altamente hidrofóbicos, formados aproximadamente por 20 aminoácidos, dentro da extremidade C-terminal da proteína (Rashidan *et al.*, 2003; Slack *et al.*, 2001). Com isso, provavelmente a região C-terminal atravessa o envelope ODV duas vezes, formando um grampo ou alça (*hairpin* ou *loop*) na membrana e ancorando a proteína P74 em sua posição específica (Slack *et al.*, 2001). Análises da seqüência primária da P74 de AcMNPV e de ChfuvG revelaram a presença de potenciais sítios de N-glicosilação (Faulkner *et al.*, 1997; Rashidan *et al.*, 2003), importantes para o dobramento da proteína e para sua interação com outros polipeptídeos (Darvey, 1989).

Estudos mais recentes demonstraram que a P74 de todos os grupos de baculovirus (NPV I, NPV II e GV) apresentam 4 regiões de hidrofobicidade significativa (200-270 aa., 380-410 aa., 450-510 aa. e 600-700 aa.), que podem além de estarem envolvidas na localização e ancoramento da proteína, podem auxiliar no dobramento e na organização topológica transmembrana (Belaich *et al.*, 2006). Porém,

parece que destes 4 domínios hidrofóbicos apenas 2, com hidrofobicidade mais alta e localizados na extremidade C-terminal protéica, estão envolvidos no ancoramento de membrana, representam regiões mais bem conservadas entre os P74 homólogos e estão aproximadamente em posições paralelas (Rashidan *et al.*, 2003).

Todavia, uma região da proteína (300-380 aa.) apresentou uma variabilidade apreciável, considerando a seqüência de aminoácidos, a estrutura secundária e o perfil hidrofóbico. Por isso, foi sugerido que esta região seria um elo entre o domínio funcional N-terminal e o domínio estrutural C-terminal da proteína, ou/e representa um segmento diretamente relacionado com a especificidade do vírus ao inseto hospedeiro (Belaich *et al.*, 2006).

O maior número de regiões mais bem conservadas da proteína está localizado no segmento externo ao envelope ODV (extremidade N-terminal), demonstrando a importância da preservação deste segmento para a P74. Este nível de preservação geralmente é visto em proteínas de envelopes virais, onde estas desempenham um papel na interação do vírus com receptores específicos presentes nas superfícies celulares do hospedeiro (Belaich *et al.*, 2006).

Rashidan e colaboradores (2003), analisando a estrutura primária da proteína P74 do granulovirus ChfuGV, verificaram que os aminoácidos não-polares apresentam a maior porcentagem (54,75%) na composição de aminoácidos deduzida e que os resíduos de prolina e glicina (8,3% do conteúdo total de aminoácidos da proteína) estão em números elevados, principalmente na extremidade N-terminal da proteína, o que também já foi observado em outros P74 homólogos estudados. Observaram ainda, que esses aminoácidos estão associados com a superfície das alças da proteína, podendo resultar em um aumento da flexibilidade e conseqüentemente de mudanças conformacionais da proteína (Rashidan *et al.*, 2003). Outro aspecto destacado neste



estudo foi a presença de 6 resíduos de cisteína conservados na proteína P74 dos baculovirus analisados e a possibilidade destes resíduos estarem envolvidos na formação de pontes dissulfeto, o que pode ser importante para o dobramento correto da proteína em um polipeptídeo funcional. A proteína P74 possui um arranjo e posições de seus resíduos de cisteína, glicina e prolina com um alto nível de conservação em todos os baculovirus, o que implica em um fator importante para o desempenho da função da P74, crucial para o ciclo de infecção do vírus (Belaich *et al.*, 2006).

#### 4.1.4 Aspectos Filogenéticos

O gene *p74* é altamente conservado e a proteína está presente em todos os baculovirus já seqüenciados, o que pode implicar em uma rota comum de entrada do vírus na célula (Faulkner *et al.*, 1997). Este papel crucial da P74 na geração de progênes capazes de se propagar na natureza somado a uma variabilidade alta da região genômica em torno do *locus p74* sugere que este gene foi requerido nos estágios iniciais da diversificação da família *Baculoviridae*, por isso esta região foi sujeita a uma seleção biológica positiva durante a evolução, em contraste com a região dos genes vizinhos que por variarem menos têm uma menor pressão seletiva (Belaich *et al.*, 2006). É importante destacar, que o genoma dos baculovirus é naturalmente muito flexível, ocorrendo, na história evolucionária, vários rearranjos e recombinações gênicas (Herniou *et al.*, 2001; 2003).

Tradicionalmente, as seqüências das proteínas dos OB, granulina e poliedrina, têm sido usadas para determinar a relação filogenética entre os membros da família *Baculoviridae*, porém este tipo de abordagem utilizando um único gene tem sido questionado (Herniou *et al.* 2001; Koonin *et al.*, 2000). Estas proteínas possuem uma seqüência pequena, fornecendo dados limitados e, além disso, a maioria dos resíduos de

aminoácidos é bastante conservada entre os baculovirus, oferecendo poucas regiões para estimativas filogenéticas (Bulach *et al.*, 1999).

Koonin *et al.* (2000) têm mostrado ser mais plausível o uso de vários genes conservados ou de toda a seqüência genômica em estudos filogenéticos, pois contêm vários níveis de informação e apresentam análises menos conflitantes em comparação às observadas entre filogenias baseadas em diferentes genes conservados. Porém, estudos realizados utilizando a seqüência da proteína P74 de baculovirus têm dado uma importante contribuição aos estudos filogenéticos dos baculovirus indicando com maior clareza a divisão de grupos de baculovirus dentro de seus gêneros (Rashidan *et al.* 2003, 2004; Belaich *et al.*, 2006).

Com relação à baixa conservação da seqüência C-terminal da proteína, quase todos P74 baculovirais possuem 2 domínios hidrofóbicos conservados. Porém, um domínio transmembrânico conservado adicional foi detectado no centro da proteína da dos NPV, bem como na XecnGV (*Xestia c-nigrurn* granulovirus) e ausente nos demais granulovirus, o que pode explicar a clara divisão filogenética entre o P74 de GV e NPV (Rashidan *et al.*, 2003). A ausência dos domínios transmembrânicos C-terminal em PlxyGV (*Plutella xylostella* granulovirus) sugere que esta característica pode ser decorrente de uma mudança evolucionária recente do P74 (Slack *et al.*, 2001; Rashidan *et al.*, 2003).

Um recente estudo de similaridades indicou que a seqüência gênica do *p74* dos NPV do Grupo I é mais conservada que a seqüência *p74* presente nos outros grupos da família *Baculoviridae* (NPV II e GV) (Belaich *et al.*, 2006). É importante ressaltar, que embora a proteína seja conservada entre os diversos tipos de baculovirus, esta possui uma seqüência de aminoácidos diversificada e mesmo entre os membros do próprio grupo poucas regiões são conservadas (Belaich *et al.*, 2006). Este fato, mais uma vez

sugere que esta proteína pode estar associada com a variedade de hospedeiros que o vírus pode infectar e que pode ser uma ferramenta muito importante no estudo da filogenia molecular dos baculovirus.

#### 4.2 Genes *pif-1*, *pif-2* e *pif-3*

Os genes *pif-1* e *pif-2* foram primeiramente encontrados em SpliNPV (*Spodoptera littoralis nucleopolyhedrovirus*) e SeMNPV (*Spodoptera exigua multiple nucleopolyhedrovirus*), respectivamente (Kikhno *et al.*, 2002; Pijlman *et al.*, 2003). Foi demonstrado que estes dois genes, a exemplo do *p74*, são conservados em todos os baculovirus já seqüenciados (Simón *et al.*, 2005), são essenciais para a infectividade oral dos OB virais, são caracterizados como genes baculovirais de expressão tardia, apresentando o motivo promotor TAAG na região a jusante do códon inicial do gene e apresentam uma expressão basal em baculovirus (Kikhno *et al.*, 2002; Pijlman *et al.*, 2003; Gutiérrez *et al.*, 2004).

Kikhno *et al.* (2002), através de várias deleções de uma região do genoma de SpliNPV, a qual incluía a ORF 7 (*pif*), conseguiram demonstrar que este gene estava diretamente envolvido com a infectividade oral do vírus. Este estudo mostrou resultados parecidos com aqueles obtidos no estudo da proteína P74 (Faulkner *et al.*, 1997; Slack *et al.*, 2001). Pijlman *et al.* (2003) realizaram experimentos semelhantes, com base em um vírus SeMNPV mutante, gerado naturalmente durante passagens em cultura de células, e que também perdeu sua virulência *in vivo*. Foi observado que este vírus mutante possuía uma deleção localizada entre as ORF 29-35 (ou talvez 36) e que os genes responsáveis pelo fenótipo situavam-se nessa região. Este estudo indicou que a ORF 35 era essencial para a infectividade oral, pois quando deletada, os ODV produzidos não eram infecciosos. Analogamente à designação de gene *pif* para a ORF 7 de SpliNPV e seus homólogos (ex: ORF 119 em AcMNPV, ORF 36 em SeMNPV), foi

proposto para este outro fator de infectividade oral o nome de *pif-2*, correspondendo a ORF 35 de SeMNPV e seus homólogos (ex: ORF 22 em AcMNPV) em outros baculovírus (Pijlman *et al.*, 2003).

A ORF 7 de SpliNPV (*pif*) codifica uma proteína de massa molecular teórica de 59,6 kDa (Pijlman *et al.*, 2003). Algumas características da proteína PIF se assemelham a P74: a maioria dos aminoácidos bem conservados na proteína PIF (19 aa.) corresponde aos resíduos de cisteína, sua porção C-terminal é mais variável que a N-terminal, possui sítios de glicosilação em sua porção externa da membrana ODV e por fim, apresenta 4 possíveis domínios transmembrana hidrofóbicos (Kikhno *et al.*, 2002). A proteína PIF possui uma seqüência hidrofóbica N-terminal, que provavelmente age com um peptídeo sinal para a clivagem, sugerindo que esta proteína poderia ser secretada ou localizada na membrana celular. Porém, PIF é encontrada no núcleo das células infectadas e integra o envelope ODV. O mecanismo de transporte e interação nuclear não é ainda conhecido (Kikhno *et al.*, 2002). Outras proteínas virais de localização similar e contendo o peptídeo sinal têm sido descritas (ex: P91 de OpMNPV), sugerindo a existência de um mecanismo comum de transporte (Russell e Rohrmann, 1997).

Como também foi constatado na seqüência das proteínas PIF e P74 (Kikhno *et al.*, 2002; Rashidan *et al.*, 2003), o alinhamento da seqüência peptídica da PIF-2 predita (ORF 35) de SeMNPV indicou a presença de resíduos de cisteína com posições conservadas (Pijlman *et al.*, 2003), o que permite o dobramento múltiplo da proteína através de suas inúmeras pontes dissulfeto. Um domínio N-terminal hidrofóbico, com um peptídeo sinal para uma possível clivagem, similar ao encontrado na proteína PIF, foi predito por análises computacionais. Além de ser conservado entre o PIF-1 e o PIF-2, este domínio também foi encontrado em outras proteínas específicas do envelope

ODV de AcMNPV, ODV-E66 e ODV-E25, relacionadas ao direcionamento destes polipeptídeos para a zona do anel intranuclear (Hong *et al.*, 1997), onde o envelope ODV é formado. Embora sugerido a existência de um sítio de clivagem, foi demonstrado que a seqüência N-terminal das proteínas ODV-E66 e ODV-E25 não foram clivadas no envelope ODV (Pijlman *et al.*, 2003). Vale ressaltar ainda, que este domínio hidrofóbico sinalizador, na P74, parece está localizado na porção C-terminal da proteína e no PIF e PIF-2 na região N-terminal (Slack *et al.*, 2001; Pijlman *et al.*, 2003). A sugestão de que a proteína PIF-2 seja de fato uma proteína estrutural do envelope ODV, ainda precisa ser melhor elucidada por estudos imunológicos e bioquímicos (Pijlman *et al.*, 2003).

Estudos indicaram que os genes *pif-1* e *pif-2* não são requeridos para a replicação dos baculovírus, estando exclusivamente envolvidos nos estágios iniciais da infecção viral (Kikhno *et al.*, 2002; Pijlman *et al.*, 2003). Portanto, as proteínas P74, PIF-1 e PIF-2 (fatores de infectividade *per os*) podem estar interagindo conjuntamente para realizar a entrada dos ODV nas células colunares do intestino médio das larvas, por ação direta entre elas ou através de uma ação em cascata (Kikhno *et al.*, 2002), em um processo de 2 etapas como proposto por Horton e Burand (1993).

Em experimentos de infecção utilizando ODV mutante marcado quimicamente, foi identificado um outro produto de genes *pif* em AcMNPV (Ac115), que embora não esteja envolvido com os eventos de ligação e fusão da partícula ODV como os genes *pif-1* (Ac119), *pif-2* (Ac022) e *p74*, é necessário para sua infectividade oral. Assim, este quarto gene *pif* identificado foi nomeado de *pif-3* e provavelmente deve mediar outro evento crítico durante a infecção primária de baculovirus (Ohkawa *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2008). A exemplo do PIF-1 e PIF-2, análises da seqüência do PIF-3 também identificou um domínio hidrofóbico na extremidade N-terminal, importante para o

tráfego da proteína e essencial para a sua função durante a infecção ODV (Li *et al.*, 2007). Além disso, análises transcricional e traducional sugerem que o *pif-3* também seja um gene de expressão tardia (*late*) em baculovirus (Li *et al.*, 2007).

Jiang *et al.* (2008) demonstraram por análise de neutralização de anticorpos que os quatro genes *p74*, *pif-1*, *pif-2* e *pif-3*, essenciais para infecção oral, são também essenciais para infecção *in vitro* com ODV de HearNPV. Isso vem possibilitar o uso desse sistema para investigação do mecanismo molecular da infecção oral que ainda não está claro. De certa maneira, os genes *pif* também são ferramentas importantes para a utilização dos baculovirus como vetores de expressão, pois além de serem essenciais para a propagação do vírus na natureza, são desnecessários para a replicação e produção de proteínas em cultura de células, fornecendo uma alternativa para aumentar a biosegurança de tecnologias envolvendo baculovirus (Gutiérrez *et al.*, 2005).

## **5. Outros fatores que afetam a infectividade oral: genes *enhancers* (*vef*)**

As proteínas que agem e afetam exclusivamente a infectividade dos OB têm sido classificadas em dois diferentes tipos: aquelas que facilitam o início da infecção oral e as proteínas homólogas à P74 (Kikhno *et al.*, 2002).

As proteínas pertencentes ao primeiro grupo são montadas e depositadas no interior dos OB, de onde são liberadas, quando estes são dissolvidos no intestino médio do inseto. Porém, não são componentes estruturais dos virions (Kikhno *et al.*, 2002). Entre estas proteínas estão os *fatores sinérgicos* e/ou “*enhancers*” ou *VEF* (viral-enhancing factors), que originariamente foram identificados em grânulos de *Granulovirus* mostrando capacidade em aumentar a infectividade dos NPV (Tanada e Hukuhara, 1971; Yamamoto e Tanada, 1978; Derksen e Granados, 1988; Zhu *et al.*,

1989; Mukawa e Goto, 2007). Desde então, estes fatores têm sido encontrados em vários *Granulovirus* e em alguns *Nucleopolyhedrovirus* do Grupo II: *Lymantria dispar multiple nucleopolyhedrovirus* (LdMNPV) (Bischoff e Slavicek, 1997; Kuzio *et al.*, 1999; Popham *et al.*, 2001), *Mamestra configurata nucleopolyhedrovirus* (MacoNPV-A e MacoNPV-B) (Li *et al.*, 2002a; Li *et al.*, 2002b) e *Agrotis segetum nucleopolyhedrovirus* (AgseNPV-A) (Jakubowska *et al.*, 2006). O CfMNPV é o primeiro NPV do Grupo I a ter um homólogo *vef* descrito (Jong *et al.*, 2005). Esses trabalhos demonstraram que estes fatores agem na ruptura da membrana peritrófica, facilitando a passagem dos vírions e a sua aderência a membrana das células colunares do epitélio do intestino médio da larva. Outra possível função atribuída está na capacidade de aumentar a fusão dos nucleocapsídeos com as microvilosidades do intestino médio (Uchima *et al.*, 1988; Wang *et al.*, 1994; Bischoff e Slavicek, 1997).

Desta forma, este primeiro grupo de proteínas pode facilitar a realização das funções desempenhadas pelo segundo grupo (P74, PIF-1 e PIF-2, PIF-3) e aumentar a infectividade *per os* dos baculovirus. Por outro lado, a P74 e homólogos fazem parte da estrutura dos vírions e não apresentam uma seqüência consenso HEXXH (Lepore *et al.*, 1996; Bischoff e Slavicek, 1997), uma assinatura de metaloproteases, como as proteínas VEFs (Kikhno *et al.*, 2002).

## **6. *Condylorrhiza vestigialis multiple nucleopolyhedrovirus* (CvMNPV)**

A Mariposa-do-Álamo, *Condylorrhiza vestigialis* (Guenée, 1854) (Lepidoptera: Cambridae), é considerada a principal praga do gênero *Populus* spp (Salicaceae), conhecido popularmente por Álamo ou Choupo, o qual inclui aproximadamente 30 espécies florestais (Di Ciero, 2007). Esta planta é originária de regiões de clima

temperado e frio do hemisfério norte, onde é amplamente cultivada, constituindo-se como uma das principais espécies arbóreas de valor econômico. Segundo previsões da FAO (2004) existem cerca de 70 milhões de hectares de álamo no mundo, sendo que a Federação Russa, Canadá, Ucrânia possuem as maiores áreas nativas e a China, Índia e Paquistão as maiores áreas plantadas. No Brasil, esta planta é cultivada em mais de 5.000 hectares, principalmente no Estado do Paraná, onde por volta de 1905 a 1910 com mudas provenientes dos EUA, iniciou os plantios no País (principal espécie introduzida: *Populus deltoides* var. *carolinensis*) (May-de Mio e Amorim, 2000) (Figura 3).

Trata-se de uma espécie florestal de madeira clara, resistente, de crescimento rápido e com alto valor econômico agregado, sendo muito utilizada como matéria-prima na fabricação de palitos e caixas para a indústria do fósforo (May-de Mio e Amorim, 2000). Além disso, na Europa, América do Norte e oeste da Ásia, o exsudato do botão floral de álamo é fonte de própolis (Markham *et al.*, 1996; Wollernweber e Buchmann, 1997), uma substância resinosa conhecida, principalmente, por suas características antimicrobianas, anestésicas, antioxidante, antiinflamatória, imunomodulatória, hipotensiva, cicatrizante, anticancerígena, anti-HIV e anticariogênica (Ghisalberti, 1979; Bankova *et al.*, 1989; Park e Ikegaki, 1998; Park *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2000; Isla *et al.*, 2001). Informações publicadas apontam o álamo como fonte potencial de energia renovável, devido ao seu rápido crescimento, baixo custo de plantio, não compacta o solo e principalmente pela presença de grande quantidade de lignocelulose (80% de celulose e 20% de lignina) (Tuskan *et al.*, 2006; <http://www.biotechbrasil.bio.br>).

Tuskan e colaboradores (2006) lançaram a seqüência genômica da espécie *Populus trichocarpa*, a primeira planta de floresta com genoma seqüenciado, fato esse de grande relevância para um maior incremento da pesquisa de espécies florestais. Além



disso, o álamo pode ser utilizado para a fabricação de um grande número de produtos florestais primários e secundários, como papel, madeira serrada, compensados, móveis, caixas de frutas e recipientes para cargas (Balatinecz e Kretschmann, 2001).

A cultura do álamo no Brasil e no mundo enfrenta sérios desafios em relação a pragas (brocas, desfolhadores, sugadores e galhas) e a doenças (manchas e ferrugens foliares) (May-de Mio e Amorim, 2000). No Brasil, a principal praga de *Populus ssp.* é uma lagarta desfolhadora, Mariposa-do-Álamo (*Condylorrhiza vestigialis*), a qual reduz consideravelmente a produtividade primária da planta no seu período de maior crescimento vegetativo (meses de dezembro a março), e assim impossibilita a otimização qualitativa e quantitativa da produção de lenho (madeira) (Diodato, 1999). Por isso, o controle desta praga bem como de outras doenças da planta torna-se essencial. Até o momento, esta atividade tem sido realizada com sucesso através da aplicação de produtos químicos, principalmente a deltametrina, do grupo dos piretróides (Treflich e Souza, 2000). Porém, o álamo é cultivado nas condições sensíveis do ambiente de várzea e tem feito com que os pesquisadores e silvicultores envolvidos com esta cultura procurem novas alternativas de controle da praga, que causem menor impacto ambiental e que possam inibir o desenvolvimento de resistência por parte das lagartas (Treflich e Souza, 2000).

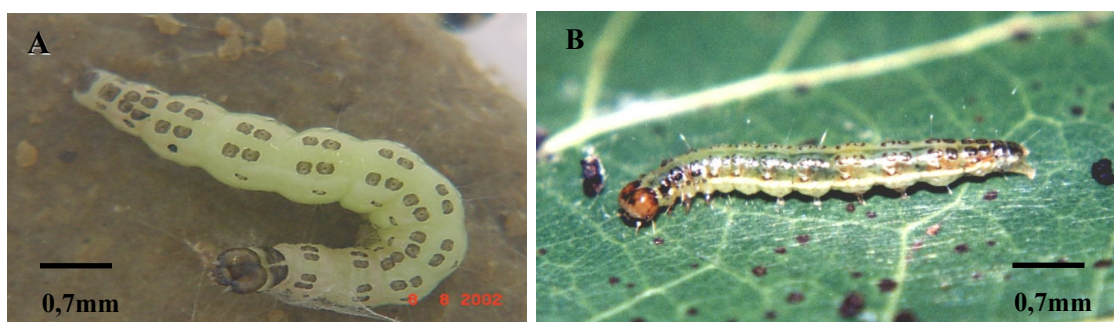
Estudos de campo e em laboratório, envolvendo lagartas de *C. Vestigialis* infectadas com vírus, constataram que estas lagartas provenientes de plantações de álamo apresentavam sintomatologia muito semelhante à de infecções por baculovirus: corpo flácido, mudança de coloração do tegumento, fixação nas folhas pelas patas posteriores durante a fase tardia da doença, infecção sistêmica, perda de apetite e posterior morte (Figura 4) (N. J. Sousa, comunicação pessoal). As análises por microscopia óptica e eletrônica, realizadas no Laboratório de Virologia de Insetos da

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, mostraram a presença de estruturas bi-refringentes, típicas de poliedros no material infectado, com vírions contendo vários nucleocapsídeos envoltos por membrana e inclusos em uma matriz protéica poliédrica. Assim, foi confirmado que este vírus associado à *Condylorrhiza vestigialis* era da família *Baculoviridae* e do gênero *Nucleopolyhedrovirus* - CvMNPV (Castro *et al.*, 2003).

Como esse foi o primeiro relato de ocorrência natural de baculovirus em lagartas *C. vestigialis*, tornam-se imprescindíveis o avanço em estudos relacionados com a caracterização deste vírus, para sua utilização como bioinseticida. Nas últimas três décadas o aumento do uso de químicos tóxicos tem encorajado a utilização de estratégias alternativas e ambientalmente corretas para proteger a madeira da biodegradação (Grigoletti Júnior *et al.*, 2000).



**Figura 3. Plantação de álamo, família Salicaceae, gênero *Populus*.** Foto retirada pela empresa Swedish Match, de uma plantação localizada no município de Porto União – SC.



**Figura 4. Lagarta de *Condylorrhiza vestigialis*, conhecida como Mariposa-do-Álamo.** (A) Lagarta infectada pelo baculovirus CvMNPV. (B) Lagarta não-infectada. Foto retirada pela empresa Swendish Match, de uma plantação localizada no município de Porto União – SC.

## JUSTIFICATIVA CIENTÍFICA E OBJETIVO GERAL

A presença constante do gene *p74* entre muitas espécies de NPV e o requerimento para a infectividade de ODV indicam que o *p74* faz parte de uma rota única e conservada de entrada do vírus nas células epiteliais do intestino médio do hospedeiro, daí a importância de se estudar melhor este gene.

A expectativa da realização deste trabalho é essencialmente trazer informações relevantes sobre a relação filogenética dos baculovirus, pois, além de se tratar de um gene conservado entre os baculovirus, a sequência da P74 é diversificada entre os membros da família *Baculoviridae*, sugerindo que esta proteína pode estar associada com a variedade de hospedeiro que o vírus pode infectar. Assim, estudos filogenéticos podem contribuir para um melhor entendimento de algumas adaptações biológicas deste grupo de vírus.

Neste contexto, a análise da sequência do gene *p74* de CvMNPV e o estudo da relação filogenética utilizando genes *p74* de outros baculovirus podem gerar informações importantes para a determinação preliminar da relação evolucionária deste novo baculovirus (CvMNPV) com os demais já descritos. Este vírus tem potencial como bioinseticida para o controle de uma das principais pragas que atacam plantas do gênero *Populus*, uma árvore economicamente importante e que possui seu genoma totalmente sequenciado (Tuskan *et al.*, 2006). Portanto, os estudos sobre a relação filogenética do CvMNPV com os demais baculovirus, um assunto ainda não totalmente esclarecido, poderá ser aprofundado.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificação do gene *p74* de CvMNPV.

- Clonagem de fragmentos de restrição e de produtos de PCR contendo o gene *p74* do baculovirus CvMNPV tipo selvagem.
- Sequenciamento de fragmentos contendo o gene *p74* de CvMNPV.
- Análise da seqüência nucleotídica do gene *p74* e a sua seqüência peptídica predita: identificação de domínios conservados e caracterização físico-química teórica da proteína.
- Análise filogenética do baculovirus CvMNPV baseada na seqüência de genes *p74* homólogos.

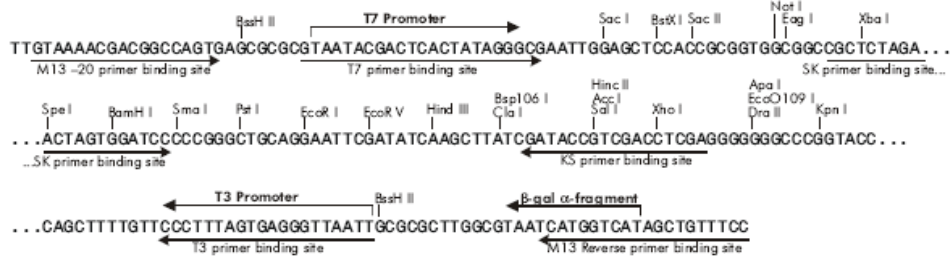
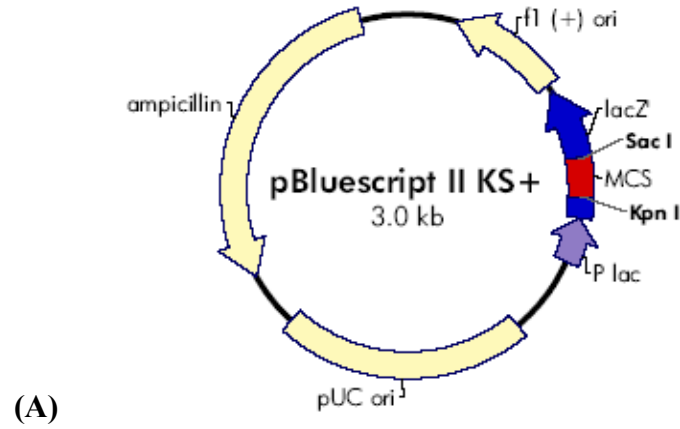
## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **1. Vírus e Insetos**

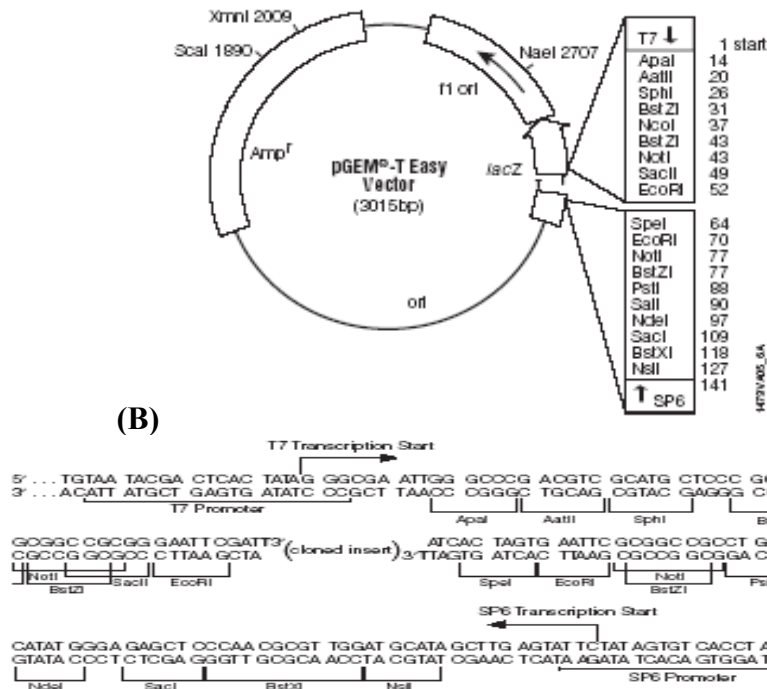
O baculovirus CvMNPV (*Condylorrhiza vestigialis multiple nucleopolyhedrovirus*) utilizado neste trabalho foi obtido de lagartas *Condylorrhiza vestigialis* infectadas, gentilmente cedidas pela Universidade Federal do Paraná (UFPR) e pela empresa Swedish Match do Brasil S.A, por intermédio do Dr. Nilton J. Sousa.

## **2. Plasmídeos**

O plasmídeos pBluescript II KS<sup>+</sup> (Stratagene) e o pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega) foram utilizados para a clonagem dos fragmentos de restrição e produtos de PCR, respectivamente, contendo regiões do gene *p74*. Estes vetores possuem um gene de seleção (resistência a ampicilina) e um sítio de clonagem dentro da seqüência do gene da  $\beta$ -galactosidase, o que também auxilia na seleção das colônias com o plasmídeo recombinante (Figura 5).



(B)



**Figura 5. Mapa genético simplificado dos vetores de clonagem. (A) pBluescript II SK<sup>+</sup> (Stratagene). (B) pGEM-T Easy (Promega).** Ilustrações retiradas dos endereços eletrônicos [www.stratagene.com](http://www.stratagene.com) e [www.promega.com](http://www.promega.com), respectivamente.

### 3. Amplificação de uma região interna do gene *p74* do baculovirus CvMNPV

O CvMNPV é um baculovirus que foi identificado e embora tenha sido considerado como pertencente ao gênero *Nucleopolyhedrovirus*, não se sabe ainda de qual grupo de NPV este vírus pertence. Por isso, os oligonucleotídeos foram construídos baseados no alinhamento e comparação das seqüências conservadas dos genes *p74* de 10 baculovirus conhecidos, disponíveis no *GenBank/EMBL*, utilizando o programa computacional CLUSTALX 1.81 (Thompson *et al.*, 1997) (Figura 6). No estudo, foram utilizadas seqüências nucleotídicas de baculovirus tanto do Grupo I, quanto do Grupo II (Tabela 1). Assim, após a análise da seqüência dos genes *p74* dos membros de cada grupo, foram desenhados dois pares de oligonucleotídeos (um para cada grupo) (Tabela 2).

**Tabela 1: Baculovirus utilizados para a comparação da seqüência nucleotídica do gene *p74* e para a construção de oligonucleotídeos internos.**

Gênero	Espécie	Abreviatura	Nº de acesso ( <i>GenBank</i> )
<i>Nucleopolyhedrovirus</i> <b>Grupo I</b>	<i>Autographa californica</i> MNPV*	AcMNPV	AAA467229.1
	<i>Anticarsia gemmatalis</i> MNPV	AgMNPV	AAAY19516.1
	<i>Bombyx mori</i> NPV *	BmNPV	NP_047536.1
	<i>Choristoneura fumiferana</i> MNPV	CfMNPV	AF512031
	<i>Orgyia pseudotsugata</i> MNPV	OpMNPV	O10365.1
<i>Nucleopolyhedrovirus</i> <b>Grupo II</b>	<i>Spodoptera exigua</i> MNPV	SeMNPV	NP_037891.1
	<i>Spodoptera frugiperda</i> MNPV	SfMNPV	AAO45529
	<i>Spodoptera litura</i> NPV	SpltNPV	NP_258289.1
	<i>Mamestra configurata</i> NPV-A	MacoNPV-A	NP_613243.1
	<i>Lymantria dispar</i> MNPV	LdMNPV	NP_047663.1



\* NPV é a abreviação de *nucleopolyhedrovirus*. MNPV é a abreviação de *multiple nucleopolyhedrovirus*.

**Tabela 2: Oligonucleotídeos internos do gene *p74* de baculovírus do Grupo I e Grupo II.**

Oligonucleotídeos	NPV Grupo	Tamanho (b)	Seqüência	Posição*
<i>p74/Cv</i> direto	I	20	<b>5' GTGTACAGCGAGCTGCTGGC 3'</b>	+348 à +367
<i>p74/Cv</i> reverso	I	20	<b>5' TACACCTTGCGTCCCGCGTC 3'</b>	+1905 à +1924
<i>p74/Cv</i> direto	II	22	<b>5' AGATTGCGTTTCATACCCAAAT 3'</b>	+185 à +207
<i>p74/Cv</i> reverso	II	22	<b>5'AGATGAGTGATACAGAGCGCTGG 3'</b>	+1835 à +1857

\* Posição relativa ao códon de início da tradução do gene *p74*.

Os oligonucleotídeos dos Grupos I e II, direto e reverso, foram desenhados com auxílio do programa Gene Runner<sup>TM</sup> versão 3.05 (*Hastings Software*) e posteriormente utilizados para a construção da sonda de DNA, usada na identificação do gene *p74* de CvMNPV por *Southern blot*.

Outro par de oligonucleotídeos foi utilizado para a obtenção da região terminal do gene *p74*, com o objetivo de se conseguir a seqüência completa deste gene (Tabela 3). O oligonucleotídeo *p74/Cv* direto foi desenhado a partir da própria seqüência parcial do *p74* CvMNPV já obtida. O oligonucleotídeo *p74/Cv* reverso foi desenhado a partir da seqüência consenso obtida do alinhamento dos genes *p74* dos baculovírus de maior similaridade à seqüência parcial *p74* CvMNPV (Figura 15). Os genes *p74* de maior similaridade foram obtidos utilizando-se o programa BLASTN (Altschul *et al.*, 1990) e a seqüência consenso pelo alinhamento no programa CLUSTALX 1.81 (Thompson *et al.*, 1997).

**Tabela 3: Oligonucleotídeos para amplificação da região terminal do gene *p74* de CvMNPV.**

Oligonucleotídeos	Tamanho (b)	Seqüência	Posição*
<i>p74</i> terminal direto	20	5'AATACCCTGGGCAAACCAAT 3'	+1951 à +1931
<i>p74</i> terminal reverso	18	5'AATTTTGTCGTTTAGTTA 3'	+1380 à +1362

\* Posição relativa ao códon de início da tradução do gene *p74*.



```

      10      20      30      40      50      60      70
AcMNPV ATCTTCCAGACTCACTAAAGCCTAAGCTGAAAACCCAGCTTTTGAACTCGATTAGACGCTCGTCGTGGTAAACGC
OpMNPV TGTTCGAGGAGGAGCTGCCCGAGCCGCCAGCACCAGCGCCCGAGCCTGAGCTCCCCGAGATCCCCGACGTTCCCGGCC
BmNPV CTCCAGACTCCTAAAGCCTACGCTGAAAATCCAAGCTTTTGAATTCGATTAGACGCTCGTCGTGGTAAACGCAGTT
AgMNPV ATGACTTGCCGTGAACCACCAGCACCCGAACCCGACGCTGAACCTGAACCGAACCTGAGGTACCGGAAATTTCCAGC
ChFuMN CACTAAAGTGACCACGATTCAAGACATACTTGGTGGAGCGGAAGTTCCCGATGTCCCTTTACCCGACAACCCCTAA

      110     120     130     140     150     160     170
AcMNPV TTAANAATAACAAATCAATTGTTTTATAATATTCGTACGATTCTTTGATTATGTAATAAATGTGATCATTAGGAAGA
OpMNPV TCAAAACAGCAAATCGACGGTTTTGAAATACTCGTACGGCTCTTTGACCAGTAATAAATGCAAGCATCAAAAATA
BmNPV TTAANAATAACAAATCAATTGTTTTATAATATCCGTACGATTCTTTGACTATGTAATAAATGTAAATCATTAGGAAGA
AgMNPV TTAAAACAGCAAATCAATGGTTTTAAAATATTCGTACGGTCTTTGACTAGATAATAACAACGCAATCATTAGAAATA
ChFuMN TTAANAAGCAAGTCGATCGTTTTAAAGTACTCGTACGGCTCTTTGACTAAATAGTATAGTCCGAGCATTAGGAATA

      210     220     230     240     250     260     270
AcMNPV AGTTCTGTGTGATAACAAATGCTGTAAACGCCACAATGTGTTTGTGCAAAATAAACCCAGTATATTTGATTAAA
OpMNPV AGTTCCTTGTGCGCAATAAAGGCCGCAAGGGCCACCCTGTATTTGTCAAAAATAAACCCGCTATCACCCATTCAA
BmNPV AGTTGTTTGTGATAACAAATGCTGTAAACGCCACAATGTGTTTGTGCAAAATAAACCCATTATATTTGATTAAA
AgMNPV AGCTCTCGATGCAATATAAAGGCCGACGCGGCCCCCTGTGTTTAAACAAAATAAACCCGCTACCACCTATTTAA
ChFuMN AGCTTTTTGTGCAACATGAAGGCCGCAAGAGCGACTGCTGACTCTGTTAAAAATAAATTGCTATCGCTCCATTAAA

      310     320     330     340     350     360     370
AcMNPV ACAATAGTGTGTTTTGCCTAAACGTGTACTGCATAAACTCCATGCGAGTGTATAGCGAGCTAGTGGCTAACGCTTGC
OpMNPV CCAACAACGTGTTTTGCCTGTAAGTGTATTGCATAAACTCGAGACGTGTGTACAGCGAGCTGCTGGCCAGCGCTTGG
BmNPV ACAATATTGTGTTTTGCCTAAACGTGTACTGCATAAACTCCATGCGAGTGTATAGCGAGCTAGTGGCTAACGCTTTC
AgMNPV CCAATAACGTGTTTTGCCTGAATGTGTACTGCATAAACTCTAGGCGCGTGTACAGCGAGCTGCTGGCAAGCGCTTGA
ChFuMN CCAACAACGTATTTCTGTCTAAACGTGTACTGCATAAACTCGAGGCGCGTGTACAGCGAACTGCTGGCCAGCGCCTGG

      410     420     430     440     450     460     470
AcMNPV ATCCTCAATTTTCATCACCCCTCCTCCAAGTTTAACTTTGGCCGTCGGAATTAACCTTCTAAAGATGCCACATAATCTA
OpMNPV ATCTTTGATCTCGTCACTTTCTGCCAAGCCAGCATCTGCCCGTCCGAGTTCACCTCGAGCGCGGCCACATAATCGA
BmNPV ATCCTCAATTTTATCACCCCTCATCCAATTTTAACTTTGGCCGTCGGAATTAACCTTCTAAAGATGTGACATAATTTA
AgMNPV ATCTTTAATTACATCGTTTTCATCTAATTGCAACATTTGACCATCTGAGTTAACTTCGAGCGCCGCCAGTAGTCGA
ChFuMN ATCCTCGATTGCATTGCTTTCTGTAAGTGCAGCATTTGTCCGTCGAGTTCACCTCGAGCGCGGCCACGTAGTCGA

      510     520     530     540     550     560     570
AcMNPV GTGGCGTCATCGTCCGTTTCGACCATTTCCGAAAAGAACTCGGGCATAAACTCTATGATTTCTCTGGACGTGGTGT
OpMNPV GTGGCGTCGTCCGTTTCTACAATGTCCGCAAAAAACTCGGGCAAAAACTCAATAATTTCCGGGAAAGTGTTCGA
BmNPV GTAGCTTTATCGTCCGTTTCGACCATATCCGAAAAGAACTCGGGCATAAACTCTATGATTTCTCTAGACGTGGTGT
AgMNPV GTTGCGTCGTCCGTTTCCACAATGTCTGAAAAGAACTCGGGTAAAAATCTATTATTTCCGCGACGTGTTGGC
ChFuMN GTGGCGTCATCGTCCGTTTCTACTACGTCCGAAAAGAACTCGGGCAAAAACTCGATTATTTCCGCGAGCTGTTGGC

      610     620     630     640     650     660     670
AcMNPV TCAGGAACGTGCGCGACATGTCGTCCGGGAAACTCGCGCGGAAACATGTTGTTGTAACCGAACGGGTCCCATAGCGCC
OpMNPV TTAGGAACGTGCGCGACAAATCGTCCGGGAAACTCGCGCGGAAACATGTTGTTGTAACCGAACGGGTCCACAGCGCC
BmNPV TCAGGAACGTGCGCGACATGTCGTCCGGGAAACTCGCGCGGAAACATGTTGTTGTAACCGAACGGGTCCCATAGCGCC
AgMNPV TGAGAAACGTGCGGACAAAGTCTGTCGGGAAACTCGCGCGGAAACATGTTGTTGTAACCGAACGGATCCCATAGCGCC
ChFuMN TCAGAAACGTGCGCGACAGGTCTGTCGGGAAACTCGCGCGGAAACATGTTACTGTACCGAAATGGGTCCACAGCGCC

      710     720     730     740     750     760     770
AcMNPV TAGAATGAGCACGATGCCGACAAATGGAGCTGGCTTTGATGGGACGCGCGTTCAGCGCCTTAGCCCGGTGGTGGCG
OpMNPV TAAAATGAGCACAAATGCCACTACAGAGCTGGCTTTGATGGGACGCGCGTTCAGCGCCTTAGCCCGGTGGTGGCG

```











*BmNPV* TAAAATGAGCACAATGCCGATGACGGAGCTGGCTTTGATAGCAATTCGAGTTAACGCTTTGGCAGTCGTGGTCAGCG  
*AgMNPV* AAGAATAAGCACAATGCCACCACGGAAGCGGCTTTGATGGCGATGCGAGTCAAAGATTTGGCCGCCGTAGTTAGCG  
*ChFuMN* CAAGATGAGCACAATGCCACCACGGAAGCTGGCTTTGATAGCAATGCGCGTTAGCGCTTTGGCCGCCGTGGTGAGCG

810 820 830 840 850 860 870  
*AcMNPV* GAGTGCACCTAACCGGGCTTTGTAAGTCTCTCCCAACATGCGCACGGTCACGCGCCGAGTCGTGCTAAGCAACATGTG  
*OpMNPV* GAGTGCACCAGCGCCGCTTTGTACGTTTCGCCCAGCAGCCGCACCGTGACGCGCTGCGACGTGCCACCAGCATGCG  
*BmNPV* GAGTGCACCTATCGCGGGCTTTGTAAGTCTCTCCCAAGATGCGCGCGGTACGCGCCGAGTCGTGCTAACCAACATGCG  
*AgMNPV* GAATGCACCATGGCCGCTTTGTACGTTTCGCCCAGCAAACGTACCGTGACGCGCTGCGACGTGCTCATCAACATGCG  
*ChFuMN* GAGTGCACCTATCGCCGCTTTGTATGTTTCGCCCAAAAGGCGCACCGTCACGCGCTGCGAGGTGCTCACCAGCATACG

910 920 930 940 950 960 970  
*AcMNPV* TGTTAATTTTTTTTCAACATGCTTTTAAACCCGGACATTAGCATATCAAAGCCAATGTCGGTAGCAATACCGAAAACG  
*OpMNPV* TGTTAATTTTTTTTGAGCATCGCTTTTAAACGCCGTCAGGAGCATGTCAAAGCCAATGTCGGTAGGCGATGCCAAAACG  
*BmNPV* TGTTAATTTTTTTTCAACATGCTTTTAAACCCGGACATTAGCATCTCAAAGCCAGCGTCCGTAGCAATACCGAAAATG  
*AgMNPV* TATTAATTTTTTTTCAACATGGTTTTAAACGCCGTCATGAGCATGTCAAAGCCAATGTCGGTAGGCGATGCTGAACACG  
*ChFuMN* TGTTAATTTTTTTTAAAGCATTTGTTTTGAATGCTGTCAAACAACATGTCGAATCCAATATCGGTTCGGATGCCAAAACG

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070  
*AcMNPV* TGTTATAAATTGACTCCAAGTCTTGGTCGCTGATTGAACGGTCGAGCGCCTCGAAATGTTTCGACACGTGCACGTTTCGT  
*OpMNPV* GCGACGATTGCTCCAGGTCGTCGTCGCTCATTTGCCGGTCAGCGGCGCGGATTCGCGGCCACGCGGACCGCGC  
*BmNPV* TGTTATAAATTGACTCCAATCTTGGTCGCTGATTGAACGGTCGAGCGCCTCAAAATGTTTCGACATGTACACGTTTCGG  
*AgMNPV* AGAAATAATCAATTCAGGTCCTTTGTCGCTTACCGACCTATCTAACGTGCGCGCGGTGACAATCGAACGCGACGTTTC  
*ChFuMN* GCGGATTATCGCTTCGAGCTCTTCGTCGTTGAGCTGGCGACCGGGCGCGCCAAGTCAACGACGGCGCGCGGTGTTA

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170  
*AcMNPV* GGAGTTTTAGTAAAGCCGGTTTCGGCCGTGTACGTGATCTGGACGGGCGACCCGTTGACGATCATGCCAAATCGTT  
*OpMNPV* GTTTTGGTGAAGCCGTTTCGGCCGTTGACGCAATTGCATTAGCACGCCGTTGGCGTCCATGCCAGCTGCTGCAA  
*BmNPV* GGAGTTTTAGTAAAGCCGGTTTCGGCCGTGTACGTGATCTGGACGGGCGACCCGTCGACAATCATGCCAAATCGTT  
*AgMNPV* GTTTTGGTAAAGCCAACCTCAGCCGTGTACGTTAACTGCATCAGCGTCCCGTTCTCCACCATGCCAAAGTCTTGTA  
*ChFuMN* GTTTTGGCAAACCCAGTTTCGGCCGTGTACGCAAGCTGCATCAGCCCGCGTTGTTCGGCTAGCAGGCCGAGCTGTTG

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270  
*AcMNPV* GTTTTTCAAATTCGAAGTCTGTGGCGTTATCGCGCACGCTGCGCCATTGCGCTAGTATTGCGTTGGAGTCCACGTTG  
*OpMNPV* TTTCAAATCCCAATCAACGGCGCGGTCGCGCACGGCGCGCCATTGGGCCAGCACGGCGTTCCAGTCCGCGCGGGC  
*BmNPV* GTTTTTCAAATTCGAAGTCTGTAGTGGTATCGCGCACGCTGCGCCATTGCGCTAATATTGCGTTGGAGTCCACGTTG  
*AgMNPV* TTTCAAATCATAAATGATTGTGCGATCGCGCACGGCGCGCCATTGTCAAGTACGGCGTTGGAATCGACCCGTGGA  
*ChFuMN* GTTTTTCAAAGTTCGAATCTACTGCAGATCACGCACAGCGCGCCATTGGGCCAAAACCGGTTGGAATCTGCCACG

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370  
*AcMNPV* AGGCGCTTTGTAATCAAATTCGCGCAGTTCGCTAAAAATGTTGTTGGCCAGCATTTTGAAAGTGACAAAGATCGTGT  
*OpMNPV* CGCCGCGTAATCAAAGTCGCGCAGCTCCGAAAAATGTTGTTGGCCAACATTTTAAAGGTACCGTAGATGGTGTGCG  
*BmNPV* AGGCGCTCTGTAATCAAATTCGCGCAATTGCTAAAAACGTTGTTGGCCAGCATTTTGAAAGTGACAAGAATCGTGT  
*AgMNPV* CGACGTGTAATCAAATTCGCGCAACTCGGAAAAATGTTATTGGCAAGCATTTTGAATGTGACATAAAGCGTGTAC  
*ChFuMN* GGGCGCGTATAGTCAAATTCGCGCAGTTCGAAAAATATGTTGTTAGCCATCATTTTAAACGTCACATAAATTTGTT

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470  
*AcMNPV* GATTTCCACCATCTAAACGAACAACCGCCGTTGAATAGTCTCTGCCGAAACGTCGACAGTAGGCTTCGTTGAATTC  
*OpMNPV* TCCACCAGCGAAACGAGCAGCCGCCGTTAATGAGGTCGCGCCCCAAGCGCGGCGAGTACGCCTCGTTGAACTCGCC  
*BmNPV* GATTTCCACCATCTAAACGAACAGCCGCCGTTGAATAGATTTCTGCCGAATCGTCGACAGTAGGCTTCGTTGAATTC  
*AgMNPV* TCCACCAGCGCAACGAGCAGCCGCCGTTCAATGAGTCTCGGCCCAAACGGCGGCAATAAAGCGTGTAAACTCGCC  
*ChFuMN* GACTCCACCACGAACGAGCAGCCGCCGTTCAATGAGATCGCGGCCAAAGCGTCGCGAGTACGCCTCGTTAAATTC

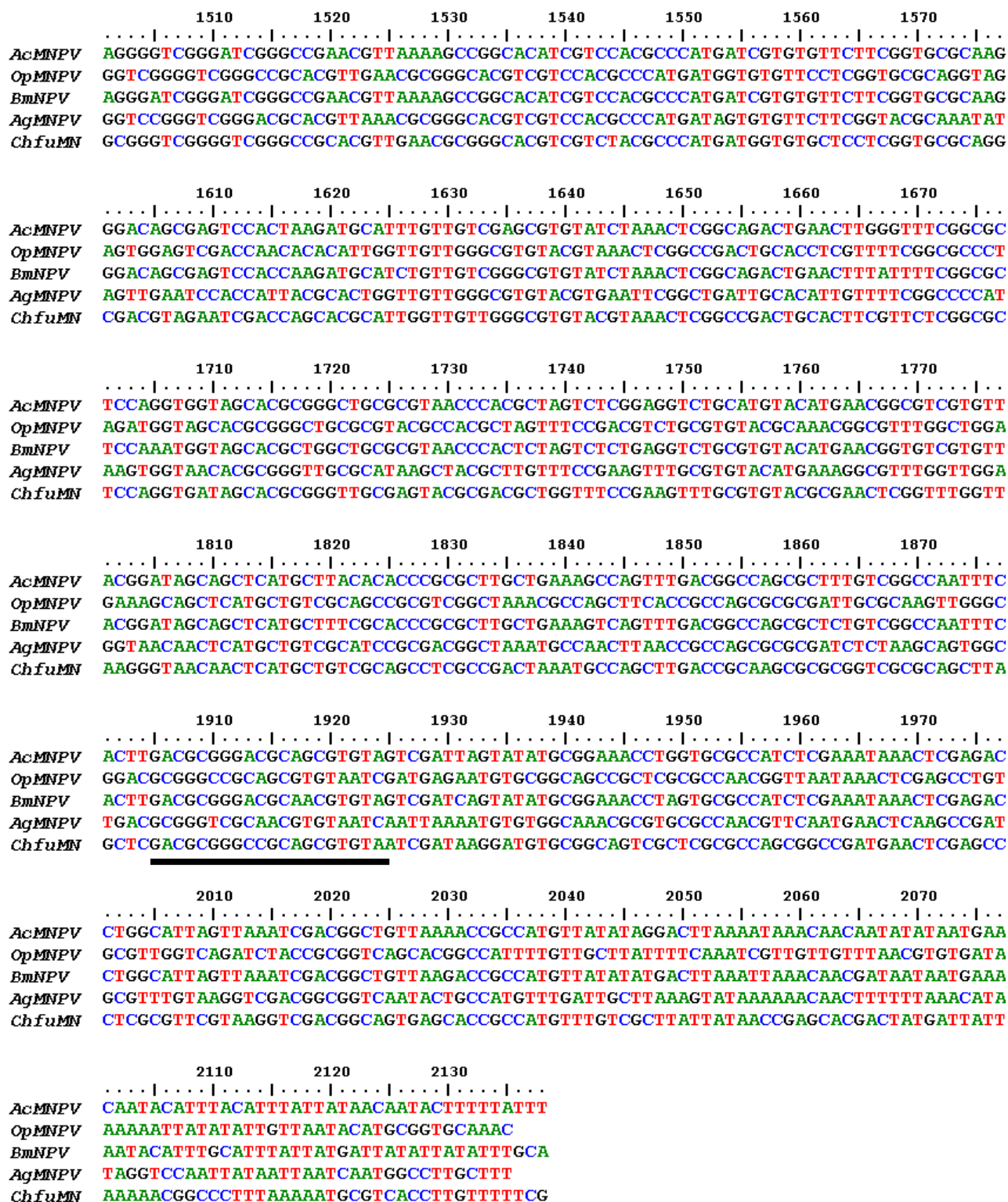


Figura 6. Alinhamento do gene *p74* baculoviral de cinco *nucleopolyhedrovirus* do Grupo I. A linha em negrito indica a posição do par de oligonucleotídeos (Grupo I), utilizados para a construção da sonda de DNA. Sequências obtidas do *GenBank/EMBL*: *AcMNPV* (ORF 138, n° de acesso: AAA46729.1); *OpMNPV* (ORF 134, n° de acesso: O10365.1); *BmNPV* (ORF 115, n° de acesso: NP\_047536.1); *AgMNPV* (ORF 134, n° de acesso: AAY19516.1); *ChfMNPV* (ORF 130, n° de acesso: AAL13071.2).

#### 4. Purificação de partículas virais e extração de DNA

Os poliedros de CvMNPV foram obtidos a partir de lagartas infectadas (*Condylorrhiza vestigialis*) maceradas em tampão de homogeneização (1% de ácido ascórbico; 2% de SDS; 0,01M Tris, pH 7,8; 0,001M EDTA), de acordo com Maruniak (1986) com pequenas modificações. O macerado foi filtrado em gaze e centrifugado a 12.000 rpm (centrífuga Sorvall RC-5B, rotor SS-34) por 15 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspense em TE (0,01M Tris-HCl pH 7,8; 0,001M EDTA). O material foi novamente centrifugado e o *pellet* ressuspense em 10ml de TE. Um volume de 5ml do material (~30mg/ml) foi colocado em gradiente de sacarose de densidade 1,17 a 1,30 g/ml e centrifugado a 24.000 rpm (ultracentrífuga Sorvall OTD-75B, rotor AH 627) por 40 min, a 4°C. Uma banda de poliedros formada no terço inferior do tubo foi coletada com uma pipeta Pasteur, diluída 4 vezes em TE e centrifugada a 12.000 rpm (centrífuga Sorvall RC-5B, rotor SS-34) por 15 min, a 4°C. O *pellet* (poliedros purificados) foi ressuspense em água milli-Q e armazenado a -20 °C.

Para a solubilização dos poliedros, foram adicionados 250µl de solução alcalina 3X (0,3M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,51M NaCl, 0,03M EDTA) aos 500µl de suspensão viral (1x10<sup>9</sup> OB/ml) e incubados a 37°C por 30 min ou até a dissolução completa dos OB. Em seguida, foram adicionados 50µl de SDS 20% e, após 10 min, foram acrescentados 12,5µl de proteinase K (20 mg/ml), mantendo a incubação a 37°C por pelo menos 16h. Para a extração do DNA viral foi adicionado ao sobrenadante um volume igual de fenol, que após a homogeneização por inversão de tubo, foi centrifugado a 14.000 rpm (microcentrífuga Eppendorf, modelo 5415C, rotor F45 18 11) por 5 min. A fase aquosa coletada (topo do tubo) foi submetida ao mesmo procedimento para mais duas extrações, com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto (gelado) e

10% de acetato de sódio 3M, pH 5,2, seguido de incubação a -20°C por 14 - 16h. O material foi novamente centrifugado a 14.000 rpm (microcentrífuga Eppendorf, modelo 5415C, rotor F45 18 11) por 30 min. O precipitado obtido foi lavado com etanol 70% (gelado), secado a temperatura ambiente e ressuspenso em tampão TE. Para finalizar, o DNA foi incubado em banho-maria com RNAase (10 mg/ml) a 37°C durante 1 h e estocado a 4°C até a sua utilização.

## **5. Clivagem do DNA genômico de CvMNPV por enzimas de restrição**

O DNA viral extraído do CvMNPV foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* (Sigma), *HindIII* (Sigma) e *PstI* (Pharmacia), para gerar o perfil de restrição do genoma do vírus. Cada sistema de digestão foi preparado com 0,8 - 1,2 µg de DNA e 1 - 20 U de enzima. As amostras foram analisadas por meio de eletroforese em gel de agarose 0.8%, para a separação dos fragmentos de DNA gerados. O DNA com tampão de corrida (*gel loading buffer*: azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol 0,25%; ficol 15%) foi aplicado no gel, imerso em tampão TAE 1X (TAE 50X: Tris-base 2M, ácido acético glacial 2M e EDTA 0,05M, pH 8,0) e colocado sob a influência de um campo elétrico (20 - 80V). Após a migração, o DNA foi corado com brometo de etídeo (concentração final: 0,5 µg/ml) e visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta.

## **6. Amplificação da região interna do gene *p74* e da sua extremidade terminal por PCR - *Polymerase Chain Reaction***

Os pares de oligonucleotídeos (Tabela 2) foram então utilizados para amplificar por PCR parte do gene *p74* de CvMNPV, o qual foi utilizado como sonda para a hibridização *Southern Blot*. O PCR foi preparado em um volume final de 25µl, utilizando 17.5µl de água destilada autoclavada, 2,5µl de tampão de reação 10X, 1µl de

cada *primer* (10 $\mu$ M), 1 $\mu$ l de dNTPs (10mM), 1 $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 1 $\mu$ l de *Taq* polimerase (5U/ $\mu$ l) e 1 $\mu$ l de DNA de CvMNPV (10 $\eta$ g/ $\mu$ l) como template. Juntamente com cada sistema de PCR preparado, foi realizado um sistema controle negativo (ausência do DNA de CvMNPV).

A reação procedeu-se em um termociclador, Peltier-effect cycling MJ Research Inc., modelo PTC-100, utilizando o seguinte programa:

94° C - 5 min para a fase inicial	} 30 ciclos
94° C - 1 min para a desnaturação	
64° C - 1 min para o anelamento	
72° C - 1 min para a enlogação	
72° C - 10 min para a extensão final	

Após a amplificação da região interna do gene *p74*, os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 0,8%, contendo brometo de etídeo (0,5 $\mu$ g/ml) (Sambrook *et al.*, 1989), e então visualizados em um transiluminador UV para a observação do fragmento de DNA esperado (~1600pb).

O mesmo procedimento foi realizado para a amplificação da região terminal do gene *p74* (C-terminal da proteína P74), porém a temperatura de anelamento foi de 56°C.

## 7. Hibridização *Southern blot*

Para a identificação do gene *p74* por *Southern Blot* (Southern, 1975), o DNA de CvMNPV foi digerido com endonucleases de restrição *EcoRI*, *HindIII* e *PstI* e resolvidos por eletroforese em gel de agarose 0,8%, com voltagem de 40V, por aproximadamente 15 h. Em seguida, o gel foi tratado com solução de depuração (HCl 0,25N) durante 15 min, solução de desnaturação (NaCl 0,5M; NaOH 0,5N) durante 45 min e solução de neutralização (Tris 1M, pH 7,4; NaCl 1,5M) por mais 45 min,

acompanhado por intervalos de agitação, sendo que após cada tratamento o gel era lavado rapidamente com água deionizada. Antes de ser transferido para a membrana de nylon (Hybond N<sup>+</sup>) o gel foi tratado com solução de SSC 20X (NaCl 3M; Citrato de Sódio 0,3M, pH 7,0). Assim, uma espessa camada (8 cm aproximadamente) formada pela membrana de nylon, papéis filtro e papéis absorventes foi colocada sobre o gel, para que se realizasse a transferência.

Após 16 h de transferência, a membrana foi colocada em solução SSC 6X por 5 min e deixada para secar, sob papel filtro, por mais 30 min, para então fixá-la por irradiação UV durante 5 min. Em seguida a membrana foi submetida aos procedimentos padrão de hibridização (Sambrook *et al.*, 1989) e de condições recomendadas pelo fabricante. A membrana foi pré-hibridizada com uma solução SSC 6X – solução Denhard's 5X - SDS 0,5% durante 4 h a 68°C, para então ser hibridizada com uma sonda específica para o gene *p74* de CvMNPV, obtida por PCR. Esta sonda foi marcada radioativamente com [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP, utilizando o kit Rediprime<sup>TM</sup>II (Amersham-Pharmacia) e metodologia descrita pelo fabricante.

Após aproximadamente 16h de hibridização a 68°C com a sonda radioativa, a membrana de nylon foi lavada 3 vezes em solução SSC 2X - SDS 0,1%, a 68°C por 30 min cada lavagem, e uma vez em solução SSC 2X, a temperatura ambiente. Em seguida a membrana foi exposta ao filme raio-X Kodak T-Mat<sup>TM</sup> G/RA, a -80°C durante 44h.

## **8. Isolamento de fragmentos de restrição contendo o gene *p74* e o fragmento da região terminal do gene**

Após a localização do gene *p74* de CvMNPV por hibridização *Southern blot*, outro perfil de restrição do genoma de CvMNPV foi preparado, utilizando as mesmas enzimas: *EcoRI*, *HindIII* e *PstI*. Com a confirmação da clivagem do genoma de

CvMNPV através da eletroforese em gel de agarose 0,8%, os sistemas de digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose *low melt point* 0,8%, com voltagem de 40V, por aproximadamente 15h. Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e as bandas correspondentes aos fragmentos identificados por *Southern blot* do gene *p74* foram eluídos do gel. Assim, o material eluído foi aquecido a 65°C por 5 min para a solubilização da agarose, homogeneizado com volume igual de fenol saturado com NaCl 1M, submetido a centrifugação a 14.000 rpm (microcentrífuga Eppendorf, modelo 5415C, rotor F45 18 11) por 5 min e a fase aquosa transferida para outro eppendorf, para o prosseguimento das etapas de extração e precipitação de DNA. O produto de PCR da região terminal do gene *p74* também foi analisado em gel de agarose *low melt point* 0,8% e o mesmo procedimento descrito acima foi realizado. Ao final de todo o processo, os fragmentos de restrição e o produto de PCR isolados foram quantificados em gel de agarose 0,8%.

## **9. Clonagem do gene *p74***

### **9.1 - Construção do plasmídeo recombinante**

Para a clonagem dos fragmentos isolados, o plasmídeo pBluescript II KS<sup>+</sup> (Stratagene) foi clivado com as mesmas endonucleases de restrição (*EcoRI*, *HindIII* e *PstI*) utilizadas para clivar o DNA genômico de CvMNPV, quantificado, tratado com a enzima CIP (Fosfatase alcalina intestinal bovina) (Sigma) para a desfosforilação e ligado ao inserto de interesse (fragmento de restrição) pela ação da enzima T4 DNA ligase (Promega) (14h, a 16°C) . Para a clonagem do produto de PCR isolado, o plasmídeo pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega) foi ligado diretamente ao fragmento de interesse (região terminal do gene) pela ação da ligase. No sistema de ligação com ambos os plasmídeos, a concentração dos insertos variava de acordo com a fórmula:

$$\text{Concentração do Inseto } (\eta\text{g}) = \frac{\eta\text{g do vetor} \times \text{kb do inserto} \times 3}{\text{kb do vetor} \times 1}$$

## 9.2 - Transformação por choque térmico

Células competentes (*Escherichia coli*, linhagem XL-1-Blue), preparadas com cloreto de cálcio de acordo com Mandel e Higa (1970), foram utilizadas seguindo o protocolo de transformação de Sambrook *et al.* (1989). Para cada sistema de ligação do plasmídeo com o inserto contendo parte do gene *p74* (volume final de 20µl) foram utilizados 100µl de células competentes (XL-1-Blue). O procedimento constou dos seguintes passos: adição de 5 a 10µl de DNA plasmidial recombinante (sistema de ligação) às células competentes; incubação no gelo por 30 min; choque térmico de 42°C por 90s, para facilitar a abertura da membrana celular e a entrada do plasmídeo na bactéria; incubação no gelo por 5 min; adição de 1ml de meio de cultura LB líquido [bacto triptona 1% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v), pH 7,5], sem ampicilina; e incubação a 37°C, sob agitação de 200 rpm (Refrigerated Incubator Shaker, modelo INNOVA 4230, New Brunswick Scientific) por 1 h e 30 min, para restabelecimento e crescimento das células transformadas. Dando prosseguimento, o material foi centrifugado a 3.000 rpm (centrífuga CENTRA MP4R 00072, International Equipment Company - IEC) por 2 min, para a sedimentação das células, ressuspensão em 150 - 300µl de meio LB e plaqueado em meio LB sólido (meio LB, ágar 2% p/v), contendo ampicilina (100µg/ml), X-GAL (25µg/ml) e IPTG (20µg/ml). As placas foram mantidas a 37°C durante 14-16 h para a seleção dos clones positivos, ou seja, das colônias brancas, pois além de sobreviverem no meio com ampicilina, não expressavam o gene da β-galactosidase, interrompido pelo inserto de interesse (fragmento contendo o gene *p74*).



### 9.3 - Minipreparação de plasmídeos por lise alcalina

As células de *E.coli* transformadas com o plasmídeo recombinante foram selecionadas e crescidas em 1,5 ml de meio LB líquido com ampicilina (100µg/ml) a 37°C, sob agitação de 200 rpm durante 14-16 h. Posteriormente, a cultura de células foi centrifugada a 12.000 rpm (microcentrífuga Eppendorf, modelo 5415C, rotor F45 18 11) por 5 min, o sedimento ressuspensionado em 100µl de solução I (Tris-HCl 25mM pH 8.0; EDTA 10mM pH 8.0; Glicose 50mM) e incubado a temperatura ambiente por 10 min. Em seguida, foram adicionados 200µl da solução II (NaOH 0,2N; SDS 1%), incubado 10 min no gelo, adicionados 150µl da solução III (60ml de acetato de potássio 5M; 11,5ml de ácido acético glacial, pH 5.0, - completar para 100ml com H<sub>2</sub>O destilada autoclavada), permanecendo por mais 5 min no gelo. Para a separação do DNA cromossomal do DNA plasmidial, o material foi centrifugado a 14.000 rpm (microcentrífuga Eppendorf, modelo 5415C, rotor F45 18 11) por 5 min e do sobrenadante obtido foi efetuado a extração do DNA, por ciclos sucessivos de fenol, fenol: clorofórmio: álcool isoamílico e clorofórmio: álcool isoamílico. Logo depois, foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto gelado e 10% de acetato de sódio 3M pH 5.2 à fase aquosa resultante, mantendo a -20°C por 14h, para a precipitação do DNA plasmidial. Após uma centrifugação a 14.000 rpm (microcentrífuga Eppendorf, modelo 5415C, rotor F45 18 11) por 30 min, o precipitado foi lavado com etanol 70% gelado e novamente centrifugado a 14.000 rpm por 10 min. Assim, o material foi secado a temperatura ambiente, ressuspensionado em TE, incubado com RNase (10µg/ml) a 37°C por 30 min e estocado a 4°C até a sua utilização.

#### 9.4 - Confirmação da clonagem

As colônias brancas selecionadas e isoladas em meio LB sólido foram crescidas novamente em meio LB líquido com ampicilina para a extração de DNA plasmidial através do método de minipreparação por lise alcalina (descrito no item anterior). Posteriormente, o DNA foi clivado com endonucleases de restrição correspondentes a cada fragmento clonado, sob condições adequadas de temperatura e tempo, para a liberação do inserto ligado aos plasmídeos (pBluescript II KS<sup>+</sup> e pGEM<sup>®</sup>-T Easy) e consequentemente confirmação do processo de clonagem. Com isso, o material foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% e corado em brometo de etídeo (0,5 mg/ml), para a visualização dos fragmentos de DNA liberados. Além da confirmação da clonagem por digestão do DNA plasmidial, foi realizado, em alguns clones, PCR do material, utilizando os primers universais T3, T7 e SP6, para visualizar a amplificação dos fragmentos de interesse. Após a confirmação das clonagens, a colônia selecionada foi crescida em 10ml de meio LB com ampicilina a 37°C, sob agitação de 200 rpm (Refrigerated Incubator Shaker, modelo INNOVA 4230) e o DNA plasmidial era novamente extraído, utilizando o kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). Após estes procedimentos, o plasmídeo recombinante de interesse era enviado à Plataforma de Sequenciamento de DNA (CENARGEN), para o sequenciamento dos fragmentos contendo o gene *p74*, conforme procedimentos de rotina do laboratório.

### **10. Sequenciamento do gene *p74* e processamento da seqüência**

Os fragmentos clonados nos plasmídeos tiveram sua seqüência determinada utilizando o Kit BigDye Terminator (Applied Biosystems) e os oligonucleotídeos

universais T3, T7 e SP6. Para a formação completa da seqüência dos fragmentos correspondentes ao gene *p74*, duas estratégias de clonagem foram utilizadas: 1) clonagem dos fragmentos gerados por endonucleases de restrição no plasmídeo pBluescript, com sequenciamento através dos oligonucleotídeos universais T3 e T7. 2) clonagem do produto de PCR da região terminal do gene *p74* no plasmídeo pGEM®-T Easy, utilizando os oligonucleotídeos universais T7 e SP6. O processo de sequenciamento foi realizado no equipamento automático ABI 3130 XL, da Plataforma de Sequenciamento de DNA (CENARGEN).

As seqüências de DNA obtidas (extensão.abi) foram comparadas no banco de dados do *GenBank*/EMBL, utilizando o algoritmo BLASTN (Altschul *et al.*, 1997; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/blastp>) para confirmar a homologia com outros genes *p74* já descritos e então exportadas para o formato FASTA (.fa), utilizando o programa Chromas versão 2.13 ([www.mb.mahidol.ac.th/.../chromas/chromas.htm](http://www.mb.mahidol.ac.th/.../chromas/chromas.htm)). As seqüências geradas por oligonucleotídeos reversos foram alteradas para a forma complementar reversa, antes de ser confirmar a homologia e serem exportadas para o formato FASTA.

Para se obter a análise correta da seqüência nucleotídica do gene, as seqüências dos vetores de clonagem foram removidas utilizando o programa UniVec versão 4.0 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/vecscreen/vecscreen.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/vecscreen/vecscreen.html)) (Altschul *et al.*, 1990). Para sobreposição dos fragmentos contíguos (montagem dos *contigs*) e obtenção da seqüência consenso, utilizou-se o programa CAP3 *Sequence Assembly* ([pbil.univ-ivon1.fr/cap3.php](http://pbil.univ-ivon1.fr/cap3.php)) (Huang e Madan, 1999).

## 11. Análise computacional da seqüência nucleotídica do gene *p74* e da seqüência de aminoácidos deduzida

Após a montagem completa dos contigs das seqüências do gene *p74*, a análise da seqüência obtida iniciou-se pela tradução no programa *Translate Toll* (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>) e em seguida pela predição teórica das principais características físico-químicas da seqüência de aminoácidos deduzida (massa molecular, pI, coeficiente de extinção molar e hidrofobicidade) através do programa *ProtParamTools* ([www.expasy.org/tools/#primary](http://www.expasy.org/tools/#primary)) (Gasteiger *et al.*, 2005). A identificação hipotética dos domínios foi obtida pelo programa *SMART* (*Simple Modular Architecture Research Tool*) ([smart.embl-heidelberg.de](http://smart.embl-heidelberg.de)) (Schultz *et al.*, 1998). A predição de segmentos transmembrânicos foi realizada no programa *PROTSscale* ([www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl](http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl)) (Gasteiger *et al.*, 2005), utilizando a escala de Kyte e Doolittle de variação linear, *window size* 19 e *TMHMM* 2.0 ([www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0)) (Sonnhammer *et al.*, 1998). A predição das modificações pós-traducionais e da estrutura secundária foi realizada pelos programas *PROSITE* ([www.expasy.org/tools/scanprosite/](http://www.expasy.org/tools/scanprosite/)) (Sigrist *et al.*, 2002) e *GORIV* ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_gor4.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)) (Garnier *et al.*, 1996), respectivamente. As potenciais interações proteínas-proteínas foram encontradas através do programa *COILS* versão 2.1 (Lupas *et al.*, 1991), utilizando matriz MTIDK, parâmetros a,d=2.5 e b,c,e,f,g=1.0, *window size*= 21.

## 12. Alinhamento múltiplo dos homólogos P74 e construção da árvore filogenética do CvMNPV

Para estimar a relação filogenética entre CvMNPV e os demais baculovirus, baseada na seqüência do gene *p74*, foi realizado a busca de todos homólogos *p74*

presentes no banco de dados e o alinhamento múltiplo da seqüência de aminoácidos da P74 de CvMNPV com estes homólogos (Tabela 4), por meio do programa ClustalX 1.81 (Thompson *et al.*, 1997) (Tabela 4). A edição do alinhamento múltiplo foi feita pelo programa BOXSHADE versão 3.21, utilizando-se como parâmetros *Gap opening 10*, *Gap extension 0.2*, Matrix Gonnet e sombreamento do *score* de similaridade ([www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)) (Figura 14). A partir do alinhamento, as árvores filogenéticas foram construídas utilizando o método da parcimônia (busca heurística) ajustada com o método Branch e Bound (Swofford, 2000), através do programa PAUP4.0b4a (Swofford, 2002), com análises de bootstrap de 1000 repetições do conjunto de dados. O método de máxima parcimônia baseia-se na análise de estados do caráter, levando em conta o princípio da homologia, ou seja, se dois táxons compartilham uma característica, esta foi herdada do último ancestral comum a ambos (Schneider, 2003) e tem como base a hipótese de que a árvore mais provável é a que requer o menor número de mudanças para gerar os dados.

É importante lembrar, que a construção da árvore neste trabalho foi realizada observando vários parâmetros. Desta forma, várias árvores foram construídas: apresentando ou não vírus como grupo externo, enraizada e não enraizada e utilizando o alinhamento tanto das seqüências nucleotídicas quanto das peptídicas como informações, desconsiderando os intervalos existentes nas seqüências (*gaps*) (Figura 14).

**Tabela 4. Genes *p74* de baculovírus utilizados para a análise computacional comparativa.**

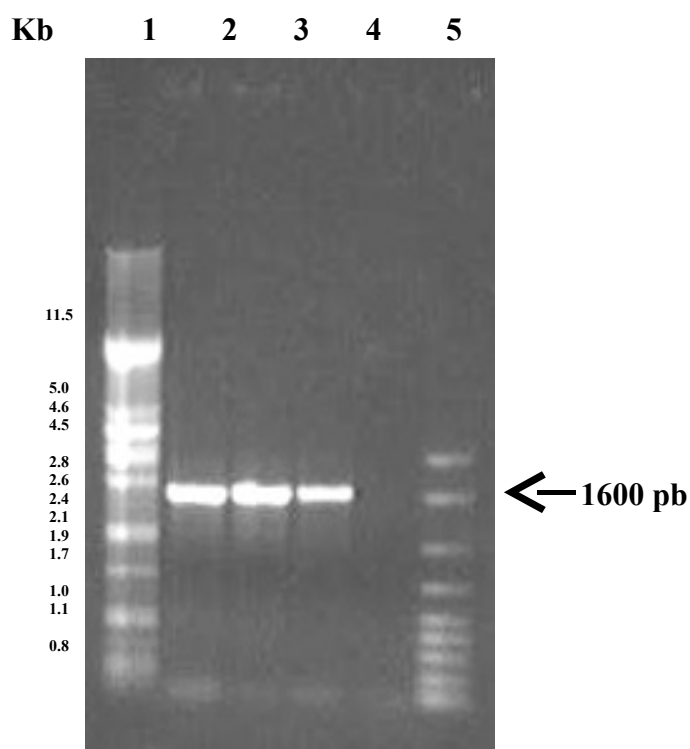
Nº de acesso ( <i>GenBank</i> )	Baculovírus	Posição no genoma	ORF	Tamanho (pb)
NP_818674.1	<i>Adoxophyes honmai</i> NPV	23773 a 25788	27	2016
NP_872507.1	<i>Adoxophyes orana</i> GV	37367 a 39295	54	1929
YP_006288.1	<i>Agrotis segetum</i> GV	57392 a 59419	56	2028
YP_529814.1	<i>Agrotis segetum</i> NPV	135968 a 137902	144	1935
YP_610989.1	<i>Antheraea pernyi</i> NPV	107.641 a 109.563	129	1923
AAAY19516.1	<i>Anticarsia gemmatalis</i> MNPV-2D	112.268 a 114.202	134	1935
AAAY19519.1	<i>Anticarsia gemmatalis</i> NPV-SF	419 a 2353	-	1935
AAA46729.1	<i>Autographa californica</i> MNPV	65 a 2002	138	1938
NP_047536.1	<i>Bombyx mori</i> NPV	108796 a 110733	138	1938
NP_932741.1	<i>Choristoneura fumiferana</i> defectiva MNPV	111.392 a 113.398	132	2007
AAL13071.2	<i>Choristoneura fumiferana</i> GV	337 a 2331	-	1995
AF512031	<i>Choristoneura fumiferana</i> MNPV	110.746 a 112.683	130	1938
YP_249621.1	<i>Chrysodeixis chalcites</i> NPV	18970 a 20946	17	1977
YP_717552.1	<i>Clanis bilineata</i> NPV	18543 a 20522	14	1980
NP_891905.1	<i>Cryptophlebia leucotreta</i> GV	47165 a 49177	58	2013
NP_203378.1	<i>Culex nigripalpus</i> NPV	64492 a 66537	73	2046
NP_148844.1	<i>Cydia pomonella</i> GV	48578 a 50644	60	2067
YP_874207.1	<i>Ecotropis obliqua</i> NPV	16243 a 18201	14	1959
NP_203290.1	<i>Epiphyas postvittana</i> NPV	101.271 a 103.205	121	1935
NP_203576.1	<i>Helicoverpa armigera</i> NPV	16224 a 18290	20	2067
AF334030_89	<i>Helicoverpa zea</i> SNPV	16195 a 18261	19	2067
YP_473207.1	<i>Hyphantria cunea</i> NPV	19839 a 21773	19	1935
YP_758321.1	<i>Leucania separata</i> NPV	24273 a 26249	-	1977
NP_047663.1	<i>Lymantria dispar</i> MNPV	26.645 a 28.663	27	2019
NP_613243.1	<i>Mamestra configurata</i> NPV-A	144165 a 146138	160	1974
NP_689333.1	<i>Mamestra configurata</i> NPV-B	147569 a 149542	159	1974
ABM05422.1	<i>Maruca vitrata</i> MNPV	94.724 a 96.661	106	1938
YP_025247.1	<i>Neodiprion lecontei</i> NPV	41772 a 43673	47	1902
YP_025157.1	<i>Neodiprion sertifer</i> NPV	49560 a 51464	50	1905
YP_001650925.1	<i>Orgyia leucostigma</i> NPV	16694 a 18652	15	1959
O10365.1	<i>Orgyia pseudotsugata</i> MNPV	112.559 a 114.493	134	1935
NP_663220.1	<i>Phthorimaea operculella</i> GV	46284 a 48260	55	1977
NP_068268.1	<i>Plutella xylostella</i> GV	37776 a 39512	48	1737
YP_758602.1	<i>Plutella xylostella</i> MNPV (isolado CL3)	119644 a 121581	134	1938
NP_703125.1	<i>Rachiplusia</i> MNPV	116.861 a 118.798	138	1938
NP_037891.1	<i>Spodoptera exigua</i> MNPV	124099 a 126060	131	1962
AAO45529	<i>Spodoptera frugiperda</i> MNPV	166 a 2106	134	1941
CAA67755.1	<i>Spodoptera littoralis</i> NPV	148 a 2121	-	1974
NP_258289.1	<i>Spodoptera litura</i> NPV	19706 a 21679	21	1974
NP_059225.1	<i>Xestia c-nigrum</i> GV	71928 a 74060	77	2133

## RESULTADOS

### 1. Identificação do gene *p74* no genoma de CvMNPV

A detecção do gene *p74* no genoma de CvMNPV consistiu essencialmente da hibridização de uma sonda de DNA, gerada a partir da amplificação parcial do gene *p74* por PCR, com o DNA de CvMNPV clivado com as enzimas de restrição *HindIII*, *PstI* e *EcoRI*.

Os produtos de PCR foram obtidos com os oligonucleotídeos construídos a partir de regiões internas conservadas do gene *p74*. Após a realização de várias reações de PCR foi constatado que o par de oligonucleotídeos do Grupo I dos NPV foi aquele que forneceu um fragmento de aproximadamente 1600 pb, que além de estar dentro da faixa de tamanho do gene *p74* (1,7 a 2,1 kb – Tabela 4), corresponde ao tamanho do fragmento compreendido pelos oligonucleotídeos do Grupo I no alinhamento entre os genes *p74* homólogos, realizado durante a sua construção (Figura 7).



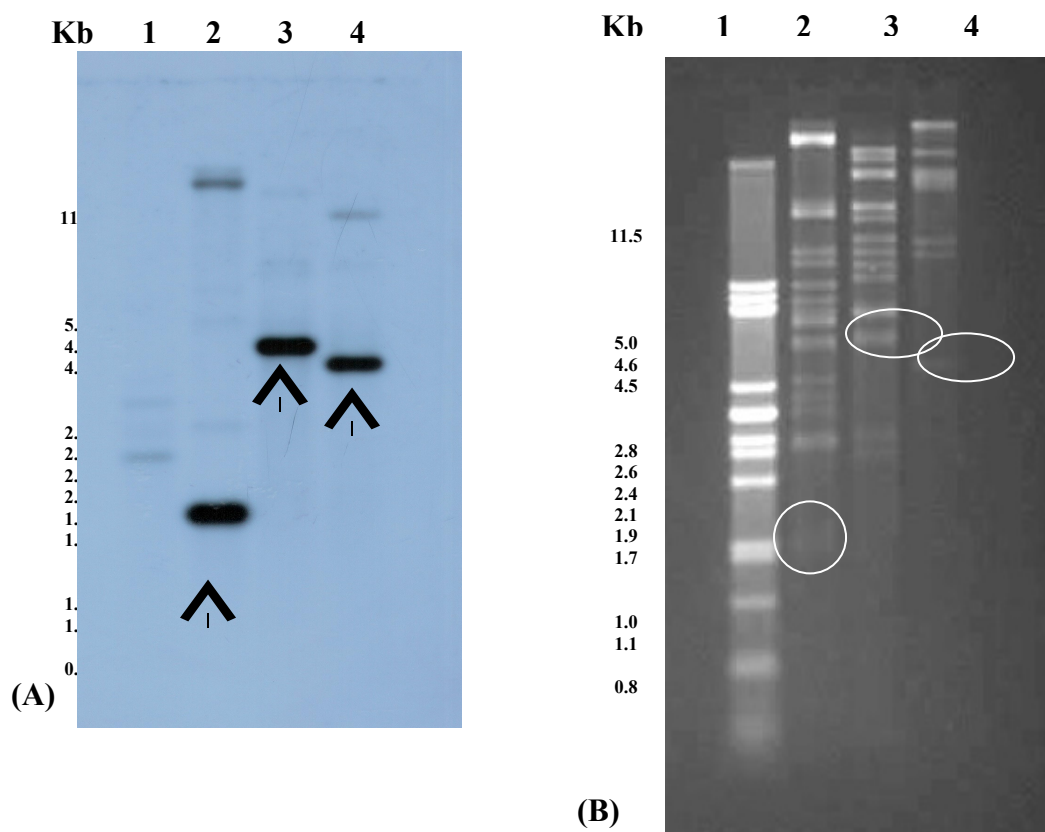
**Figura 7. Amplificação da região interna do gene *p74*.** Marcador molecular DNA  $\lambda$ /*Pst*I (1). Fragmento do gene *p74* amplificado em três sistemas (2-4). Controle negativo do sistema de PCR (5).

DNA genômico de CvMNPV clivado com as enzimas de restrição *Hind*III, *Pst*I e *Eco*RI e analisado por eletroforese em gel de agarose, como era de se esperar, apresentou diferentes perfis de restrição (Figura 8, B). Este gel foi transferido para uma membrana nylon e hibridizado com uma sonda (produto de PCR de 1600 pb eluído do gel de agarose *low melting point*) para localizar e identificar o gene *p74* nos diferentes fragmentos de restrição gerados.

Os resultados mostraram que a sonda hibridizou em fragmentos específicos nos diferentes perfis de restrição de DNA do vírus. As bandas detectadas correspondem aos fragmentos *Hind*III - bandas de ~1,1 kb ou de ~1,0 kb; *Pst*I - bandas de ~ 4,2 kb ou ~ 4,3 kb; e *Eco*RI - banda de ~3,1 kb, aproximadamente (Figura 8, A). Embora o mapa físico de restrição do genoma de CvMNPV não esteja ainda estabelecido para ser



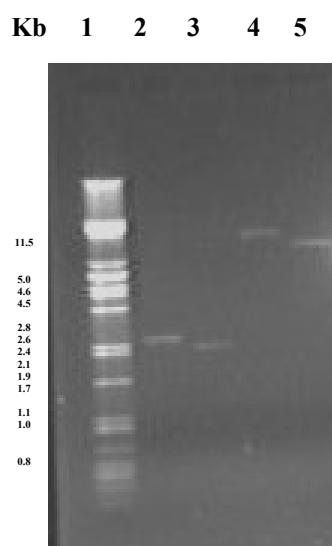
observada a sobreposição dos fragmentos, o sinal intenso da hibridização detectada no autoradiograma de cada perfil de restrição constituiu uma forte indicação de que o gene *p74* estaria presente nestes fragmentos. Isto foi confirmado, em seguida, pelo sequenciamento dos respectivos fragmentos.



**Figura 8. Autoradiograma do Southern Blot do DNA de CvMNPV e perfil de restrição de DNA de CvMNPV. (A)** Hibridização da sonda radioativa ( $^{-32}\text{P}$ ) do *p74* com a membrana de nylon. Marcador molecular DNA  $\lambda$ /*Pst*I (1). DNA de CvMNPV digerido com *Hind*III, *Pst*I e *Eco*RI, respectivamente (2-4). As setas indicam os pontos com hibridizações mais intensas entre sonda *p74* radioativa e o DNA genômico de CvMNPV digerido com diferentes endonucleases de restrição. **(B)** Perfil de restrição do DNA genômico de CvMNPV. Marcador molecular DNA  $\lambda$ /*Pst*I (1), DNA de CvMNPV digerido com *Hind*III, *Pst*I e *Eco*RI, respectivamente (2-4). Os círculos indicam os respectivos locais onde ocorreram as hibridizações mais intensas no genoma de CvMNPV (eletroforese em gel de agarose 0.8%).

## 2. Clonagem e sequenciamento de fragmentos contendo gene *p74* de CvMNPV

Para a determinação da seqüência do gene *p74* e consequentemente confirmação da identificação do gene, os fragmentos de restrição foram selecionados e eluídos a partir do gel de agarose 0.8% *low melting point*, para então serem clonados no vetor pBluescript (pBS) e sequenciados. A Figura 9 mostra que o processo de eluição dos fragmentos de restrição foi eficiente, além da quantidade significativa de DNA recuperada e a confirmação do tamanho esperado dos fragmentos.



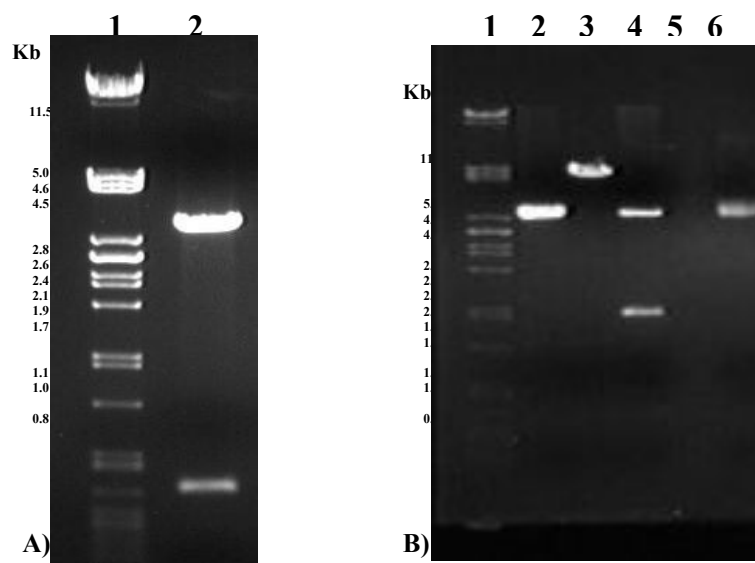
**Figura 9. Fragmentos de restrição do genoma de CvMNPV contendo parte do gene *p74*, purificados a partir do gel *low melting point* 0,8%. Marcador molecular DNA $\lambda$ /PstI (1). Fragmentos de restrição do DNA de CvMNPV digerido com *HindIII* (2) ~1,0kb e (3) ~1,1kb. Fragmentos de restrição do DNA de CvMNPV digerido com *PstI* (4) ~4,2 e ~4,3kb, *EcoRI* (5) ~3,0kb.**

O processo de ligação dos fragmentos *HindIII* - 1,0 kb, *HindIII* -1,1kb e *EcoRI* – 3,0 kb com o vetor pBS, bem como a transformação nas células competentes (XL-1-blue) foram satisfatórios. A clonagem foi confirmada através da digestão dos plasmídeos com endonucleases de restrição específicas para cada clone (Figura 10). A clonagem do fragmento *PstI* – banda 4,2 kb e 4,3 kb, após várias tentativas, não foi satisfatória.

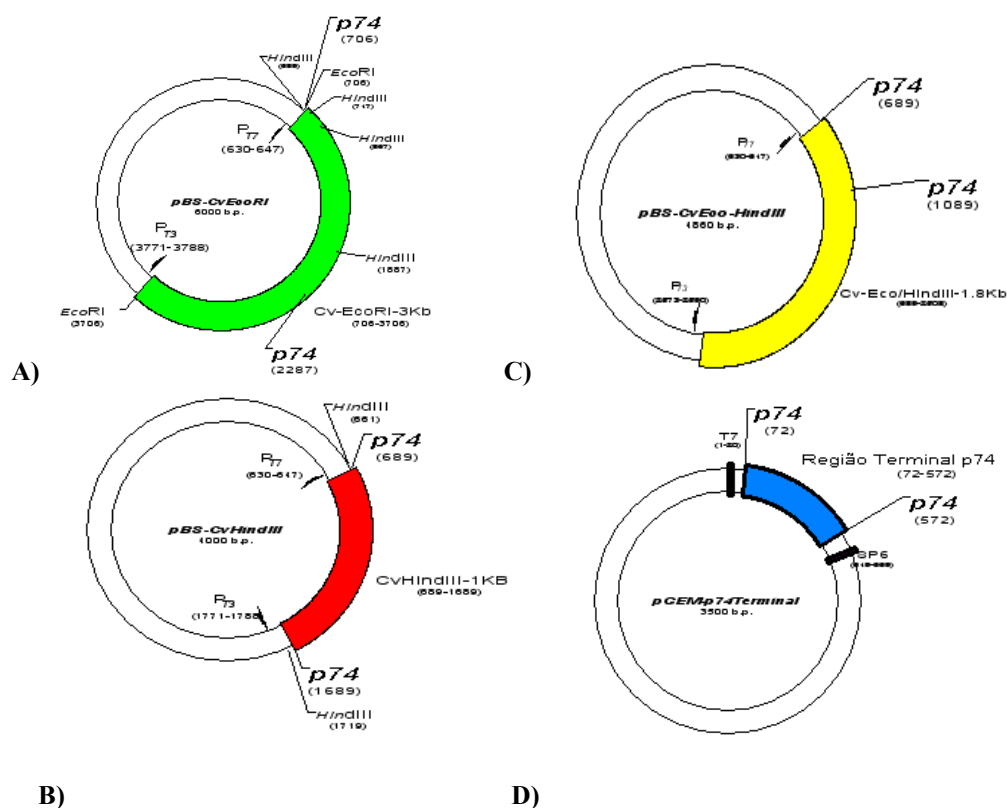
Desta forma, os fragmentos que já estavam clonados foram sequenciados. Após a análise da seqüência, foi constatado que: o fragmento *HindIII* 1,1 kb não correspondia a região do gene *p74*, já o fragmento *HindIII* 1,0 kb (pBS-Cv*HindIII*) continha parte do gene *p74* e estava inserido dentro do fragmento *EcoRI* 3,0 kb (pBS -Cv*EcoRI*), o qual compreendia 75% do gene (por volta de 1500 pb). Para completar o sequenciamento do gene *p74*, faltava somente a região inicial do gene (25% - por volta de 480 pb). Com isso, foi realizada a amplificação por PCR dessa região do genoma de CvMNPV, utilizando os oligonucleotídeos apresentados na Tabela 3. O fragmento amplificado foi clonado em pGEM<sup>®</sup>-T Easy.

Para determinar a seqüência completa do gene *p74*, o plasmídeo contendo a fragmento de restrição *EcoRI* 3,0 kb (pBS-Cv*EcoRI*) foi subclonado (Figura 10, B). O pBS-Cv*EcoRI* foi digerido com *HindIII*, eluído do gel *low melting point*, reanelado com a enzima ligase e transformado, conforme metodologia já descrita, resultando em outro plasmídeo recombinante (pBS-Cv*Eco-HindIII*), o qual não possuía o fragmento *HindIII* 1,0 kb (Figura 9, B). O pBS-Cv*Eco-HindIII* e o plasmídeo contendo a região terminal do gene *p74* (pGEM-p74Terminal) (Figura 10, A) foram sequenciados.

A confirmação definitiva da inserção de todos os fragmentos de interesse nos vetores e a presença do gene *p74* nos insertos veio somente com a realização das digestões com endonucleases de restrição dos plasmídeos recombinantes (Figura 9) e do PCR de alguns clones (dados não mostrados), utilizando os oligonucleotídeos universais e os específicos para o gene *p74*, e finalmente com o sequenciamento automático dos fragmentos. A Figura 11 mostra um esquema dos quatro plasmídeos recombinantes construídos durante o trabalho e utilizados para o sequenciamento do gene *p74* de CvMNPV.



**Figura 10. Confirmação da clonagem dos fragmentos contendo o gene *p74*.** (A) Clonagem do produto amplificado por PCR. Marcador molecular DNA $\lambda$ /*Pst*I (1). Plasmídeo pGEM, contendo a região N-terminal do gene *p74* (pGEM-*p74*N-terminal), digerido com *Eco*RI. (2). (B) Clonagem dos fragmentos de restrição. Marcador molecular DNA $\lambda$ /*Pst*I (1). Plasmídeo pBS, contendo o fragmento *Eco*RI 3,0 Kb, digerido com *Eco*RI (pBS-Cv*Eco*RI) (2). Plasmídeo pBS-Cv*Eco*RI sem o fragmento *Hind*III 1,0 Kb (pBS-Cv*Eco*-*Hind*III), digerido com *Hind*III (3). Plasmídeo pBS, contendo o fragmento *Hind*III 1,0 Kb (pBS-Cv*Hind*III), digerido com *Hind*III (4). Poço vazio (5). Plasmídeo pBS linearizado com *Hind*III (6).



**Figura 11. Esquema de quatro plasmídeos recombinantes construídos.** (A) pBluescript contendo o fragmento de restrição *Eco*RI 3,0 kb (pBS-Cv*Eco*RI). (B) pBluescript contendo o fragmento de restrição *Hind*III 1,0 kb (pBS-Cv*Hind*III). (C) pBS-Cv*Eco*RI sem o fragmento *Hind*III 1,0 kb (pBS-Cv*Eco*-*Hind*III). (D) pGEM contendo a região terminal do gene *p74* (500 pb) (pGEM-*p74* terminal).

### 3. Caracterização do gene *p74* e de sua seqüência de aminoácidos deduzida

A análise da seqüência nucleotídica do gene *p74* do baculovírus CvMNPV, hospedeiro da lagarta da Mariposa-do-Álamo *Condylorrhiza vestigialis*, revelou a presença de uma ORF contendo 1935 pb (Figura 12). A ORF *p74* CvMNPV codifica potencialmente 644 aminoácidos (Figura 12) de massa molecular de 73.613,3 Da; ponto isoeletrico ácido igual a 5,12; coeficiente de extinção molar a 280 nm em água entre 0,964 e 0,961 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>; e hidropaticidade média (*Grand average of hydropathicity – GRAVY*) igual -0,039 (Figura 13).

A proteína predita é particularmente predominante em leucina (10,7%), treonina (8,9%) e alanina (8,2%). Além de resíduos de glicina e prolina altamente conservados, foram identificados dois pequenos segmentos particularmente ricos em lisina (L), arginina (R) e prolina (P) (Figuras 13 e 14). Por outro lado, a P74 de CvMNPV apresenta um baixo percentual de resíduos de cisteína (0,8%) na sua composição, que intrigantemente apresentam posições conservadas em todos os baculovirus analisados (Figuras 13 e 14). De forma mais generalizada, a composição de aminoácidos pode ser dividida em: 10,9% de aminoácidos básicos, 12,3% de aminoácidos ácidos, 22,3% de aminoácidos polares e 54,6% de aminoácidos não-polares (sendo que destes 12,6% do total são aromáticos) (Figura 13). O gene *p74* de CvMNPV foi depositado no *GenBank* sob o número de acesso EU919397.

**1 ATGGCAGTATTAACCGCCGTCGATTTTACGAACGCAAGTCGTTACGCGACTCACATGCAC** 60  
M A V L T A V D F T N A S R Y A T H M H  
61 AGGCTTGAGTTTATGAACGTTGGCGCACGCGTTTGCCACATATTTAATGATTACACG 120  
R L E F I E R W R T R L P H I L I D Y T  
121 TTGCGACCCGCTTCAAGCGACGACGATTATATGTGCCGCCGAAGCTTAGAGATCGCGCG 180  
L R P A S S D D D Y Y V P P K L R D R A  
181 TTAGCAGTCAAGTTGGCATTAGCCGTCGGGGATTGACAGCATGAGCTGTACCCGGTC 240  
L A V K L A F S R R R G F D S M S C Y P V  
241 CACGAAACCGCGTAGTGTCCAACCAAACGCCGTTTCATGTACACGCAAACCTTCGGAAACT 300  
H E T G V V S N Q T P F M Y T Q T S E T  
301 AGCGTTGGGTACGCGCAGCCCGGCTGCTATCACTTGACCGAGCCGAGCCATGCGCAAA 360  
S V G Y A Q P A C Y H L D R A A A M R K  
361 GCGCTGAAAACGAAGTGAATCGGCTGAATTTACATACAGCCCAACAACAGTGCCTA 420  
G A E N E V Q S A E F T Y T P N N Q C V  
421 ATGGTAGATTCCACTTCAAAAATGTATTTCAATAGCCCATATTTGCGCACCGAGGAGCAC 480  
M V D S T S K M Y F N S P Y L R T E E H  
481 ACTATCATGGGCGTGGACGACGTGCCCGCGTTTAACTGCGTCCCGACCCGGACCCGCTG 540  
T I M G V D D V P A F N V R P D P D P L  
541 TTTCCCGAACGATTCAAAGGCGAGTTCAACGACGCTTACTGCCGTCGCTTTGGGCGGAG 600  
F P E R F K G E F N D A Y C R R F G R E  
601 CTCATAAACGGCGGCTGCTCTTTTCGCTGGTGGGAATCTTTGATTGGGTTTCGTGTTGGGT 660  
L I N G G C S F R W W E S L I G F V L G  
661 GACACGCTTTATGTCACGTTCAAAATGCTTACTAATAACATTTTACCGAATTGCGCGAT 720  
D T L Y V T F K M L A N N I F T E L R D  
721 TTTGATTACACGGCGCGTCCGCCATCCGCGCCGCGTCCAATGGTCGATTCCAACGCC 780  
F D Y T A P S P I L P P R P M V D S N A  
781 GTACTTGACAATGGCGCGCTGTGCGCGATCGCGCAATCAATTACGACTTTGAAAAATTA 840  
L A V R D R A I N Y D F E K L  
841 TTTAGCAAACGCCTACGTTACAAGATTTGGGCATGGTGGAGAACGGGACGCTGATGACG 900  
F S K T P T L Q D L G M V E N G T L M Q  
901 TTAACGTACACGGCGGAAATTTGATTTACCAAACCTCTATTACATACGAAACGCGCGGA 960  
L T Y T A E I G F T K T P I T Y E T R G  
1020 ACGCCGCTTCGATTGTTACTGCGCGCACGTTAGATAGGTCGATTAGCGACGAAAACTT 1020  
T P R S I V T A R T L D R S I S D E K L  
1021 GAATCAATTATAGCCCAATTTTGAAGAGTATTCGCTCGTGTTCGGCATTGCCACCGAC 1080  
E S I I A Q F L E E Y S L V F G I A T D  
1081 ATAGGTTTCGACATGCTAATGACCGCGTTTAAAAGCATGTTAAAAAAAATCAATACCGCA 1140  
I G F D M L M T A F K S M L K K I N T A  
1141 TTAATTCGCTCGCTTAAACGCGATGTTAATGAGCACGTCGACGCGCTCACGGTACGTTG 1200  
L I P S L K R M L M S T S Q R V T V R L  
1201 CTGGGCGAAACGTACAAGCGCGCGTGGTGCATTCAATGAACAGGATCGCCATCAAAACG 1260  
L G E T Y K A A V V H S M N R I A I K T  
1261 CTCACCAGGGCGGCAAAGCTTAACTCGCATCGCCATCAAAGCCGCTTCCGTAGTGGGC 1320  
L T T A A K A L T R I A I K A A S V V G  
1321 ATCGTGTGATTCTTTAACATTAGCGGATTTAGTTTGGCATTATGGGACCCGTTGGGT 1380  
I V L I L L T L A D L V L A L W D P F G  
1381 TACAACAACATGTTTCCGCGTGAATTCCCCGACGATTTGTCACGCACGTTTCTCACCGCA 1440  
L N N M F P R E F P D D L S R T F L A  
1441 TATTTTGAACGCTCGGCACCAACACGCTCGCGGAAATTATAGAGTTTTTACCAGAAATT 1500  
Y F E T L G T N T S R E I I E F L P E F  
1501 TTTTCGAAATTTGGAACGGACGACGACGCCACGTTTCAATCGTTATCCACCTGCTT 1560  
F S E I V E T D D D A T F Q S L F H L L  
1560 GATTACGTGGCGCGCTTGAGGTTAACTCTGATGGTCAAATGCTGCAGTTTGTGAAAGC 1620  
D Y V A A L E V N S D G Q M L Q F D E S  
1621 GACGTAATTGAGGATTTTGTGAAACCACTCTGGTGGGTCAAGCGCTGGCCAGCAGTTCG 1680  
D V I E D F D E T T L V G Q A L A S S S  
1681 CTGTACACGCGCCTTGAGTTTATGCAGTACACGTTTAGGCAAAACACGTTATTGGACATG 1740  
L Y T R L E F M Q Y T F R Q N T L L D M  
1741 AACGAAAATAATAACAAATTTAATAGAGTGATAGCGGGTTTTATTTTATTAACACAGGG 1800  
N E N N N K F N R V I A G L F L L N T G  
1801 GCGGCCGTTGCGGCTTTTATGTTGCATCGAGAGCTTACATTTTTTGTATACTTTGCGATA 1860  
A A V A A F M L H R E L T F F V Y F A I  
1861 TTTTAAATGATCGCGTTGTAATTTAATCAAAGAACCGTACGAATATTTCAAACCCATA 1920  
F L M I A L Y Y L I K E P Y E Y F K T I  
1921 GATTTGTTGTTTTAACTAACGACAAAATT 1951  
D L L F \*

**Figura 12. Seqüência completa do gene *p74* do baculovírus CvMNPV e da seqüência de aminoácidos P74 deduzida (GenBank - n° de acesso EU919397). Os sítios de anelamento do par de oligonucleotídeos utilizados para completar a clonagem da região terminal do gene *p74* de CvMNPV estão sublinhados. As trincas em negrito representam a iniciação e a terminação do gene (\*). A seqüência**

peptídica P74 predita a partir da sequência nucleotídica está em *itálico* (644 aminoácidos) e foi deduzida pelo programa *Translate Toll*.

**Número de aminoácidos:** 644

**Massa molecular:** 73.613,3Da

**pI teórico:** 5,12

**Composição de aminoácidos:**

Ala (A)	53	8,2%
Arg (R)	40	6,2%
Asn (N)	27	4,2%
Asp (D)	40	6,2%
Cis (C)	5	0,8%
Gln (Q)	16	2,5%
Glu (E)	39	6,1%
Gli (G)	25	3,9%
His (H)	9	1,4%
Ile (I)	34	5,3%
Leu (L)	69	10,7%
Lis (K)	21	3,3%
Met (M)	24	3,7%
Fen (F)	47	7,3%
Pro (P)	28	4,3%
Ser (S)	38	5,9%
Tre (T)	57	8,9%
Trp (W)	5	0,8%
Tir (Y)	29	4,5%
Val (V)	38	5,9%

**Coefficiente de extinção molar (em  $M^{-1} cm^{-1}$ , a 280 nm em água)**

Coefficiente de extinção 70960

Abs 0,1% (=1 g/l) 0,964

Coefficiente de extinção 70710

Abs 0,1% (=1 g/l) 0,961

**Hidropaticidade média (GRAVY):** -0,039

---

**Figura 13.** Caracterização físico-química preditiva da proteína P74 do baculovirus CvMNPV pelo *ProtParamTools* (Gasteiger *et al.*, 2005).









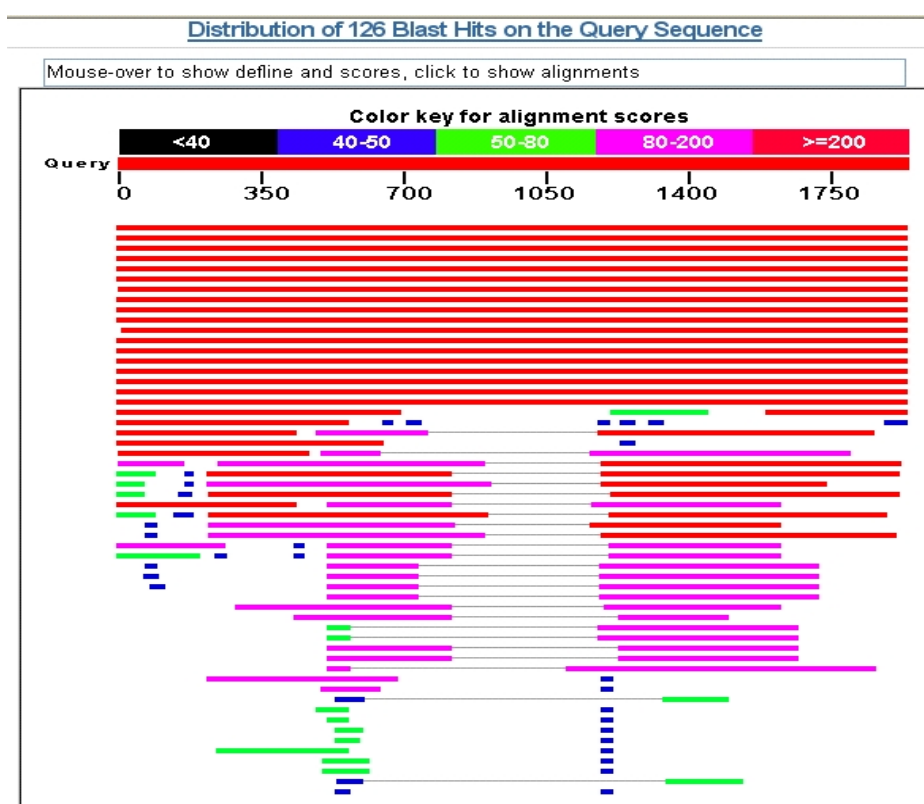
ChFuGV 544 LEVNSGGQMLILRGVEVY--EVDDEILGASLAA--TWAYKRCRSHDMLKTPNAN-----KILVVFSVVCVAGLAYSKYHSLVQIEQ-----  
 PhopGV 524 LEVNSGGQMLDWDGCTIS--EIDSELVGSALAN--DWTYKRCRSHDMLGKFNNDTIQKEKPHILKMWIVGTGI--GTFISLTYTKNYTILSKSE-----  
 CrleGV 546 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--DWTYKRCRSHDMLKMIISFTV-----KMIAGFGITISIGLHYKQNFQILMNY-----  
 CpGV 563 LEVNSGGQMLDPPGVIN--EIDSELVGSALAN--TWAYKRCRSHDMLTKSNELM-----TMIAGMGVITIGLHYKQNHQTILKLS-----  
 AdorGV 517 LEVNSGGQMLDPPGVIN--EIDSELVGSALAN--TWAYKRCRSHDMLNMIIPNSLLQFN-----NHLSSGIGFASITLHYCYQDAYSNYQ-----  
 FlxyGV 520 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--TFLR-----TSNGTAPATTRCSDLRNGSGCI-----  
 AgseGV 548 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--DWTYKRCRSHDMLKFNQLLEAS-----TMMGCFGLVAGGLHYTADYKMLTKQK-----  
 XecnGV 569 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--RNYQKRCRSHDMLKLNPSFLVUN-----SKYLGGFVLVGGVAYYKQNRKSLFEPQ-----  
 CvMNPV 526 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKFNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 CfDEPNFV 526 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 AgMNPV\_2D 526 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 AgMNPV\_SF 526 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 CEMNPV 527 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNRFNGASLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 OplMNPV 526 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 AnpeMNPV 522 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 EppoMNPV 526 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 HycuMNPV 526 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 AcMNPV 527 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 FlxyMNPV 527 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 RoMNPV 527 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 BmMNPV 527 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 MaviMNPV 527 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 EpobMNPV 524 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 OlnfV 523 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 LdMNPV 518 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 HaMNPV 530 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 HaSNPV 530 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 SeMNPV 528 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 SeMNPV 521 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 AgseMNPV 519 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 MacoMNPV\_A 525 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 MacoMNPV\_B 525 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 ChchMNPV 520 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 AdhoMNPV 526 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 CbMNPV 522 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 SplMNPV 527 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 SplMNPV 525 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 LeseMNPV 525 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 NeLeMNPV 518 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 NeseMNPV 516 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----  
 CuniMNPV 526 LEVNSGGQMLDPPGVIN--DFDEELVGSALAN--SLYTRLEFQVYTRRNTLIDMNEV-----NNKLNRYVAGLELNTGAAVAAPMLHR-----

## TM II

ChFuGV 629 ----QTNHLCTLILNLSFLLFTF--SWQYYSALIKHRYD-----  
 PhopGV 623 ----KTQISTLILNINWPIILNLSF--SWQYYSALIKHRYD-----  
 CrleGV 633 ----KQCIELFLILNINWPIILNLSF--SWQYYSALIKHRYD-----  
 CpGV 650 ----KPTMEILILNINWPIILNLSF--SWQYYSALIKHRYD-----  
 AdorGV 605 ----KRDIELTLILNINWPIILNLSF--SWQYYSALIKHRYD-----  
 FlxyGV -----  
 AgseGV 637 ----SASLLMFLILNINWPIILNLSF--SWQYYSALIKHRYD-----  
 XecnGV 658 ----LVAFSVFLILNINWPIILNLSF--SWQYYSALIKHRYD-----  
 CvMNPV 611 ----SLTFVRSFPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 CfDEPNFV 611 ----SLTFVRSFPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 AgMNPV\_2D 611 ----SLTFVRSFPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 AgMNPV\_SF 611 ----SLTFVRSFPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 CEMNPV 612 ----KLTFVRSFPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 OplMNPV 611 ----SLTFVRSFPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 AnpeMNPV 607 ----SLTFVRSFPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 EppoMNPV 611 ----SLTFVRSFPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 HycuMNPV 611 ----SLTFVRSFPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 AcMNPV 612 ----SLTFVRSFPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 FlxyMNPV 612 ----SLTFVRSFPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 RoMNPV 612 ----SLTFVRSFPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 BmMNPV 612 ----QLTFVRSFPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 MaviMNPV 612 ----SLTFVRSFPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 EpobMNPV 606 ----LYRHILLESFVILNINWPIILNLSF--SWQYYSALIKHRYD-----  
 OlnfV 606 ----NLELAFVRSFPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 LdMNPV 618 AEDILTRHAGVLEFVPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 HaMNPV 616 ----DHNVALEFVPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 HaSNPV 616 ----DHNVALEFVPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 SeMNPV 605 ----RQTNVTALEFVPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 SeMNPV 598 ----RQTNVTALEFVPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 AgseMNPV 596 ----RQTNVTALEFVPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 MacoMNPV\_A 604 ----RQTNVTALEFVPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 MacoMNPV\_B 604 ----RQTNVTALEFVPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 ChchMNPV 610 ----IQNNIMVSLFVPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 AdhoMNPV 606 ----HNVMVSLFVPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 CbMNPV 613 ----TPAVVALEFVPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 SplMNPV 610 ----APSCHEFVPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 SplMNPV 609 ----GFVMSVLEFVPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 LeseMNPV 609 ----QVALSSVLEFVPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 NeLeMNPV 601 ----ARYLFALEFVPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 NeseMNPV 599 ----SQYVLEFVPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----  
 CuniMNPV 621 ----TRAPVLALEFVPLIDAVYGLKQPYEYKTDLLF-----

**Figura 14. Alinhamento da seqüência de aminoácidos P74 deduzida (CvMNPV) com outras proteínas P74 homólogas de baculovirus pelo CLUSTALX 1.81 (Thompson *et al.*, 1997) e edição pelo BOXSHADE. O asterisco indica os resíduos glicina (G) e prolina (P) e (+) os resíduos de cisteína (C) conservados. Os dois domínios funcionais altamente conservados estão representados por DF I e DF II, respectivamente. Os dois domínios transmembrânicos estão representados por TM I e TM II, respectivamente. As barras em vermelho indicam o baculovirus CvMNPV. As setas indicam pequenos segmentos ricos em lisina (L), arginina (R) e prolina (P). A cor cinza indica a similaridade entre os aminoácidos e o preto a identidade.**

A análise por BLASTN da seqüência do gene *p74*, como esperado, revelou uma elevada identidade com genes *p74* de vários outros baculovirus. Os maiores valores de identidade verificados foram entre o *p74* de CfDEFNPV (94%), seguido do *p74* de AgMNPV (90%), AnpeNPV (81%), OpMNPV (79%) e CfMNPV (79%) (Figura 15). A comparação da seqüência nucleotídica indica uma considerável homologia entre o gene *p74* de CvMNPV e os baculovirus comparados.

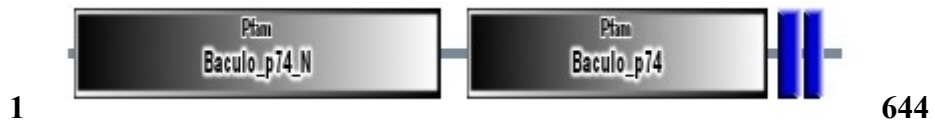


Sequences producing significant alignments:  
(Click headers to sort columns)

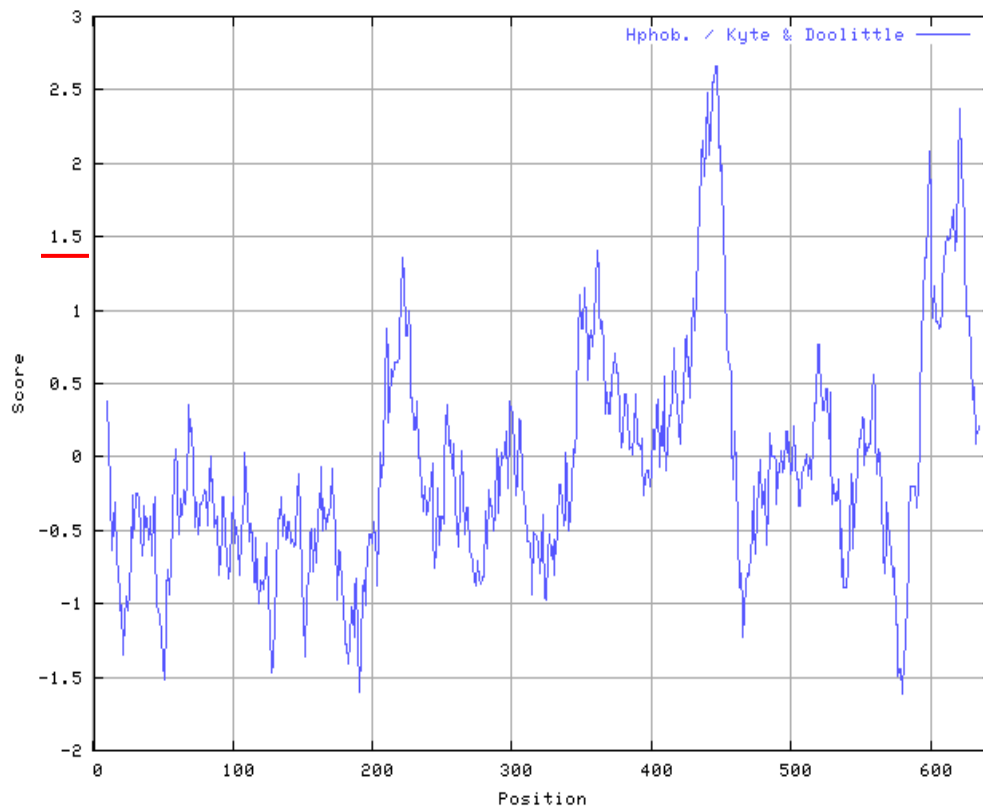
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">AY327402.2</a>	Choristoneura fumiferana defective nucleopolyhedrovirus complete gen	<a href="#">2989</a>	2989	100%	0.0	94%	
<a href="#">DQ813662.1</a>	Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus, complete genome	<a href="#">2664</a>	2664	100%	0.0	90%	
<a href="#">AY942655.1</a>	Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus strain AgMNPV-2D P74 (P7-	<a href="#">2652</a>	2652	100%	0.0	90%	<a href="#">G</a>
<a href="#">AY942656.1</a>	Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus strain AgMNPV-SF P74 (P7-	<a href="#">2643</a>	2643	100%	0.0	90%	
<a href="#">EF207986.1</a>	Antheraea pernyi nucleopolyhedrovirus isolate AnpeMNPV-L2, complete	<a href="#">1822</a>	1822	100%	0.0	81%	
<a href="#">DQ486030.3</a>	Antheraea pernyi nucleopolyhedrovirus, complete genome	<a href="#">1810</a>	1810	100%	0.0	80%	
<a href="#">U75930.2</a>	Orygia pseudotsugata multicapsid nucleopolyhedrovirus, complete genc	<a href="#">1685</a>	1685	99%	0.0	79%	
<a href="#">AF512031.3</a>	Choristoneura fumiferana MNPV polyhedrin, complete genome	<a href="#">1678</a>	1678	100%	0.0	79%	
<a href="#">M97904.1</a>	Choristoneura fumiferana nuclear polyhedrosis virus (p74) gene, compl	<a href="#">1678</a>	1678	100%	0.0	79%	<a href="#">G</a>
<a href="#">AP009046.1</a>	Hyphantria cunea nucleopolyhedrovirus genomic DNA, complete genom	<a href="#">1638</a>	1638	100%	0.0	78%	
<a href="#">AY043265.1</a>	Epiphyas postvittana nucleopolyhedrovirus, complete genome	<a href="#">1530</a>	1530	99%	0.0	77%	
<a href="#">M31301.1</a>	A.californica nuclear polyhedrosis virus p74 gene, complete cds	<a href="#">1362</a>	1362	100%	0.0	75%	
<a href="#">DQ457003.1</a>	Plutella xylostella multiple nucleopolyhedrovirus isolate CL3, complete ç	<a href="#">1357</a>	1357	100%	0.0	75%	
<a href="#">L22858.1</a>	Autographa californica nucleopolyhedrovirus clone C6, complete genom	<a href="#">1357</a>	1357	100%	0.0	75%	
<a href="#">DQ345452.1</a>	Rachiplusia ou MNPV P74 (p74) gene, complete cds	<a href="#">1348</a>	1348	100%	0.0	75%	
<a href="#">AY145471.1</a>	Rachiplusia ou multiple nucleopolyhedrovirus, complete genome	<a href="#">1339</a>	1339	99%	0.0	75%	
<a href="#">L33180.1</a>	Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus isolate T3, complete genome	<a href="#">1245</a>	1245	100%	0.0	74%	
<a href="#">EF125867.1</a>	Maruca vitrata MNPV, complete genome	<a href="#">1157</a>	1157	100%	0.0	73%	
<a href="#">AB106130.2</a>	Antheraea pernyi nucleopolyhedrovirus genes for p26, p10, p74, compl	<a href="#">787</a>	787	35%	0.0	85%	
<a href="#">AY542374.1</a>	Anticarsia gemmatalis gp64 locus, partial sequence	<a href="#">776</a>	776	29%	0.0	90%	<a href="#">G</a>
<a href="#">AY055828.1</a>	Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus P26 (p26) and P10 (p10) g	<a href="#">598</a>	598	22%	4e-167	90%	<a href="#">G</a>
<a href="#">M10023.1</a>	Autographa californica nuclear polyhedrosis virus p10 gene for late 10k	<a href="#">477</a>	477	33%	9e-131	76%	
<a href="#">U14724.1</a>	Anticarsia gemmatalis nuclear polyhedrosis virus genomic repeat regio	<a href="#">462</a>	462	18%	2e-126	89%	
<a href="#">M14883.1</a>	Orygia pseudotsugata polyhedrosis virus p10 gene	<a href="#">423</a>	423	24%	2e-114	80%	
<a href="#">AF081810.1</a>	Lymantria dispar nucleopolyhedrovirus, complete genome	<a href="#">280</a>	433	71%	1e-71	68%	
<a href="#">DQ837165.1</a>	Ecotropis obliqua NPV strain A1, complete genome	<a href="#">277</a>	505	68%	2e-70	68%	
<a href="#">DQ123841.1</a>	Agrotis segetum nucleopolyhedrovirus, complete genome	<a href="#">264</a>	408	49%	1e-66	72%	
<a href="#">AF169823.1</a>	Spodoptera exigua nucleopolyhedrovirus complete genome	<a href="#">255</a>	446	64%	5e-64	70%	

Figura 15. Comparação do gene *p74* de CvMNPV com os seus homólogos *p74* pelo BLASTN (Altschul *et al.*, 1997).

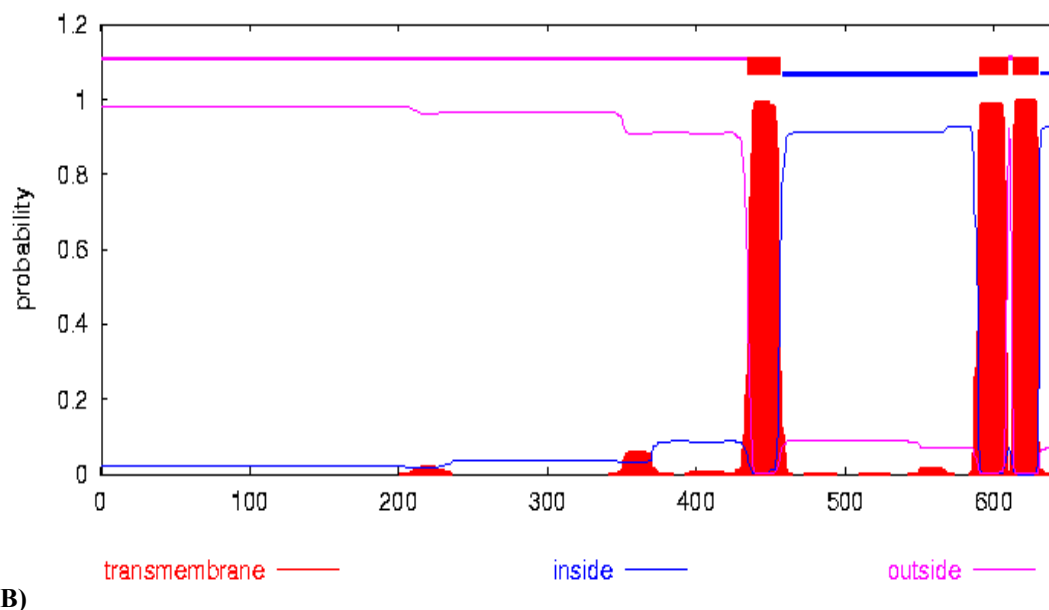
Na seqüência de aminoácidos deduzida do gene *p74* do baculovírus CvMNPV existem dois potenciais domínios conservados: um entre os aminoácidos 5 a 309 (*E-value*  $1,70e^{-219}$ ; PF08404) e outro entre os aminoácidos 385 a 582 (*E-value*  $3,40e^{-188}$ ; PF04583) (Figuras 14 e 16). Além disso, três possíveis regiões transmembranas conservadas de alta hidrofobicidade (TM) foram identificadas: posições 435 a 457, 590 a 609 e 613 a 630. Estas regiões podem estar delimitando a região extramembrana (“extra-envelope”) (posições 1 a 434) e as regiões intramembranas (“intra-envelope”) (posições 458 a 589 e 610 a 612) da proteína, as quais apresentam aminoácidos com baixo grau de hidropatia (Figuras 14, 16 e 17). Não há evidência de peptídeo-sinal na extremidade N-terminal na seqüência de aminoácidos P74 deduzida.



**Figura 16. Domínios conservados da seqüência de aminoácidos P74 deduzida (CvMNPV) pelo SMART (Schultz *et al.*, 1998). Os retângulos representam os domínios relacionados à infectividade oral viral e em azul estão representados os domínios transmembrânicos C-terminal. Os números indicam a posição do aminoácido inicial e terminal da proteína.**



A)



**Figura 17. Representação de potenciais regiões transmembranas da seqüência de aminoácidos P74 deduzida (CvMNPV) pelo PROTSCALE (Gasteiger *et al.*, 2005). (A) Escala de hidrofobicidade de Kyte e Doolittle de variação linear. Índice maior que 1,5 (traço vermelho) representa regiões altamente hidrofóbicas. (B) Probabilidade da presença de regiões transmembranas de acordo com o programa computacional TMHMM 2.0 (Sonnhammer *et al.*, 1998).**

Na proteína P74 de CvMNPV foram identificados três potenciais modificações pós-traducionais: 3 sítios para a N-glicosilação (PS00001,  $P < 5,138e^{-03}$ ), 23 sítios para a fosforilação (PS00005;  $P < 1,423e^{-02}$ ; PS00006,  $P < 1,482e^{-02}$ ) e 6 sítios para a N-miristilação (PS00008,  $P < 1,397e^{-02}$ ) (Figura 18).

#### Sítios de N-glicosilação.

Número de acesso dos prosítios: PS00001  
Probabilidade: 5,138e-03

Sítio: 11 a 14 NASR. Identidade.  
Sítio: 295 a 298 NGTL. Identidade.  
Sítio: 488 a 491 NTSR. Identidade.

#### Sítios de fosforilação Protein kinase C.

Número de acesso dos prosítios: PS00005  
Probabilidade: 1,423e-02

Sítio: 40 a 42 TLR. Identidade.  
Sítio: 68 a 70 SRR. Identidade.  
Sítio: 145 a 147 TSK. Identidade.  
Sítio: 207 a 209 SFR. Identidade.  
Sítio: 226 a 228 TFK. Identidade.  
Sítio: 321 a 323 TPR. Identidade.  
Sítio: 327 a 329 TAR. Identidade.  
Sítio: 384 a 386 SLK. Identidade.  
Sítio: 393 a 395 SQR. Identidade.  
Sítio: 397 a 399 TVR. Identidade.

#### Sítios de fosforilação Casein kinase II.

Número de acesso dos prosítios: PS00006  
Probabilidade: 1,482e-02

Sítio: 5 a 8 TAVD. Identidade.  
Sítio: 45 a 48 SSDD. Identidade.  
Sítio: 46 a 49 SDDD. Identidade.  
Sítio: 286 a 289 TLQD. Identidade.  
Sítio: 334 a 337 SISD. Identidade.  
Sítio: 447 a 450 TLAD. Identidade.  
Sítio: 489 a 492 TSRE. Identidade.  
Sítio: 507 a 510 TDDD. Identidade.  
Sítio: 563 a 566 TRLE. Identidade.  
Sítio: 576 a 579 TLLD. Identidade.

#### Sítios de N-miristilação.

Número de acesso dos prosítios: PS00008  
Probabilidade: 1,397e-02

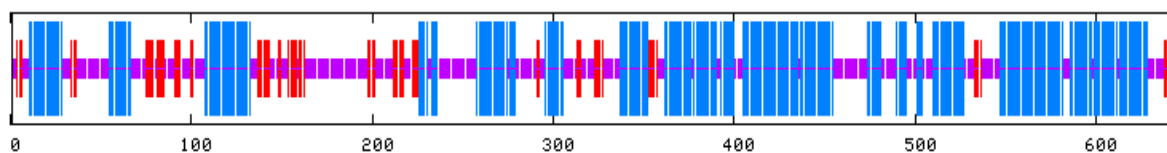
Sítio: 84 a 89 GVVSNQ. Identidade.  
Sítio: 291 a 296 GMVENG. Identidade.  
Sítio: 320 a 325 GTPRSI. Identidade.  
Sítio: 486 a 491 GTNTSR. Identidade.  
Sítio: 553 a 558 GQALAS. Identidade.  
Sítio: 600 a 605 GAAVAA. Identidade.

Sítio: 404 a 406 TYK. Identicidade.  
 Sítio: 489 a 491 TSR. Identicidade.  
 Sítio: 571 a 573 TFR. Identicidade.

**Figura 18. Identificação de potenciais modificações pós-traducionais na seqüência de aminoácidos P74 deduzida (CvMNPV) pelo PROSITE (Sigrist *et. al.*, 2002). N-glicosilação (PS00001), fosforilação por Kinase C (PS00005), fosforilação por Caseína Kinase II (PS00006) e N- miristilação (PS00008).**

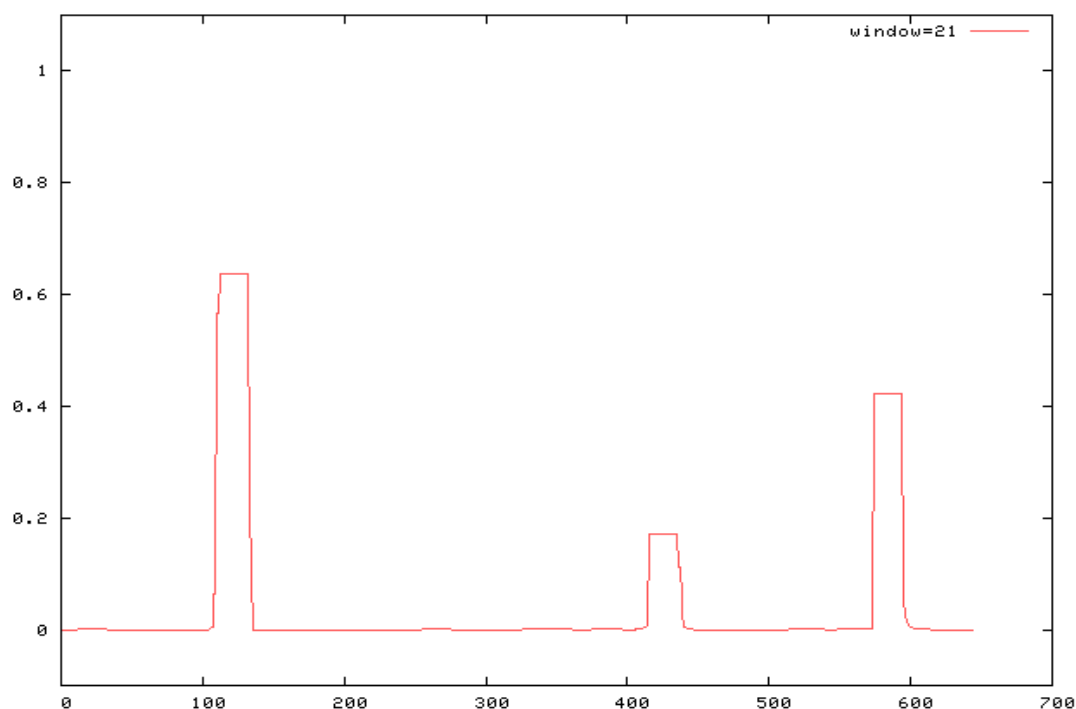
A estrutura secundária da P74 de CvMNPV predominante é  $\alpha$ -hélice (47,83%), podendo ocorrer também enovelamento aleatório (*random coil*) (40,37%) e folha- $\beta$  estendida (*extended  $\beta$ -strand*) (11,8%). A estrutura  $\alpha$ -hélice está mais concentrada na região C-terminal hidrofóbica da proteína, enquanto a folha- $\beta$  na região N-terminal (Figura 19, A). Existem três regiões potenciais de interação proteína-proteína na seqüência peptídica P74, entre os aminoácidos 100 a 130, 410 a 430 e 575 a 600 (Figura 19, B), as quais correspondem às regiões com maior probabilidade de formação de  $\alpha$ -hélices.

A)



B)





**Figura 19. Predição de estrutura secundária e de interações protéicas da seqüência de aminoácidos P74 deduzida (CvMNPV), pelo *GORIV* e *COILS* versão 2.1 (Garnier *et al.*, 1996), respectivamente. (A) Representação simplificada global da relação entre a estrutura primária e a secundária da proteína: em azul,  $\alpha$ -hélice; em vermelho, folha  $\beta$ -extendida; e em roxo, enovelamento aleatório. A estrutura  $\alpha$ -hélice apresenta-se como predominante. Os números representam à posição na estrutura primária. (B) Potenciais regiões de oligomerização da proteína. A abscissa representa a probabilidade de ocorrência de interação proteína-proteína e a ordenada a posição na estrutura primária.**

#### 4. Análise filogenética do baculovirus CvMNPV

Para estimar as relações evolutivas de CvMNPV, a seqüência nucleotídica e a de aminoácidos da proteína P74 predita de CvMNPV foi comparada com outras 40 seqüências de baculovírus depositadas no *GenBank* (Tabela 4) pelo CLUSTALX 1.81 (Thompson *et al.*, 1997).

As considerações filogenéticas apresentadas neste trabalho foram baseadas na árvore filogenética construída pelo método da máxima parcimônia, comumente utilizado em análises filogenéticas (Schneider, 2003). Dentre as árvores construídas, foram mostradas somente aquelas plausíveis com a diversificação da família *Baculoviridae* apresentada nos estudos filogenéticos até o momento (Figura 20).

A filogenia do CvMNPV, baseada na seqüência nucleotídica do gene p74 e na seqüência de aminoácidos deduzida, confirmou a clara divisão da família *Baculoviridae* em dois gêneros: *Granulovirus* (GV) e *Nucleopolyhedrovirus* (NPV). Dentro dos NPV, foi observada uma divisão em dois grupos: Grupo I e Grupo II (Figura 20). Além disso, foi representada também a diversificação dos NPV Lepidoptera, Hymenoptera e Diptera.

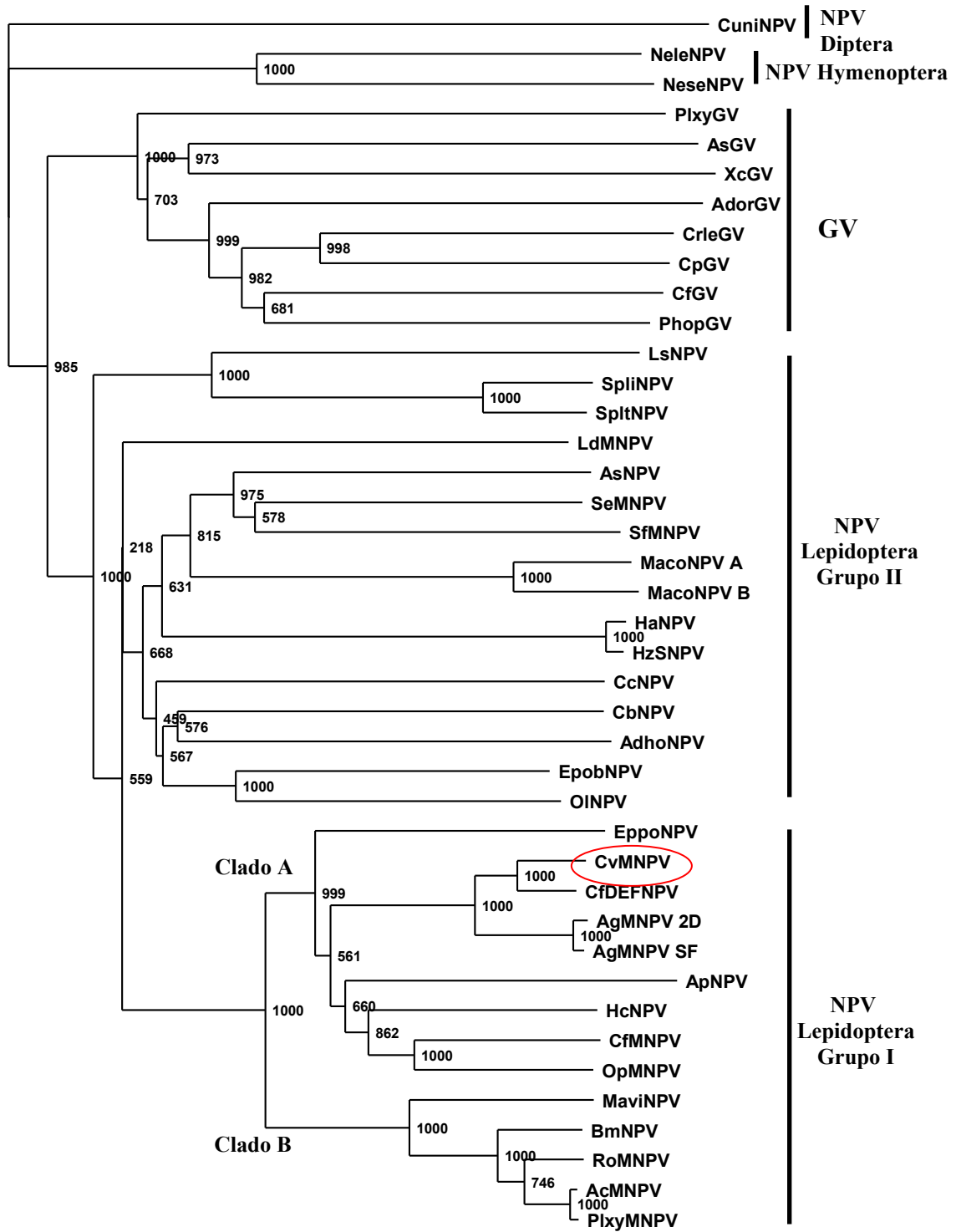
Tanto pela análise da seqüência nucleotídica quanto peptídica, o Grupo I dos NPV apresenta uma disposição de ramos que favorece sua divisão em dois cladros: Clado I-A e Clado I-B. Dentro do Clado I-A, nota-se uma ramificação, que permite a proposição de dois subclados: subclado I-Aa e subclado I-Bb. No subclado I-Aa podemos identificar a presença do baculovirus CvMNPV. Por sua vez, o Grupo II não apresenta seus ramos nitidamente divididos em cladros. De forma geral, a divisão da família *Baculoviridae* em dois gêneros ao longo da evolução, as divisões em grupos, cladros e subclados propostas pelo filograma é bem sustentada por valores significativos de replicatas (Figura 20).

A grande diferença entre as duas árvores apresentadas (uma baseada na seqüência nucleotídica e outra na seqüência peptídica) foi quanto ao grupo dos *Granulovirus* (GV). Na filogenia gênica (Figura 20, A), os GV estão mais próximos na escala evolutiva aos NPV-II que dos NPV-I, enquanto que na filogenia protéica (figura

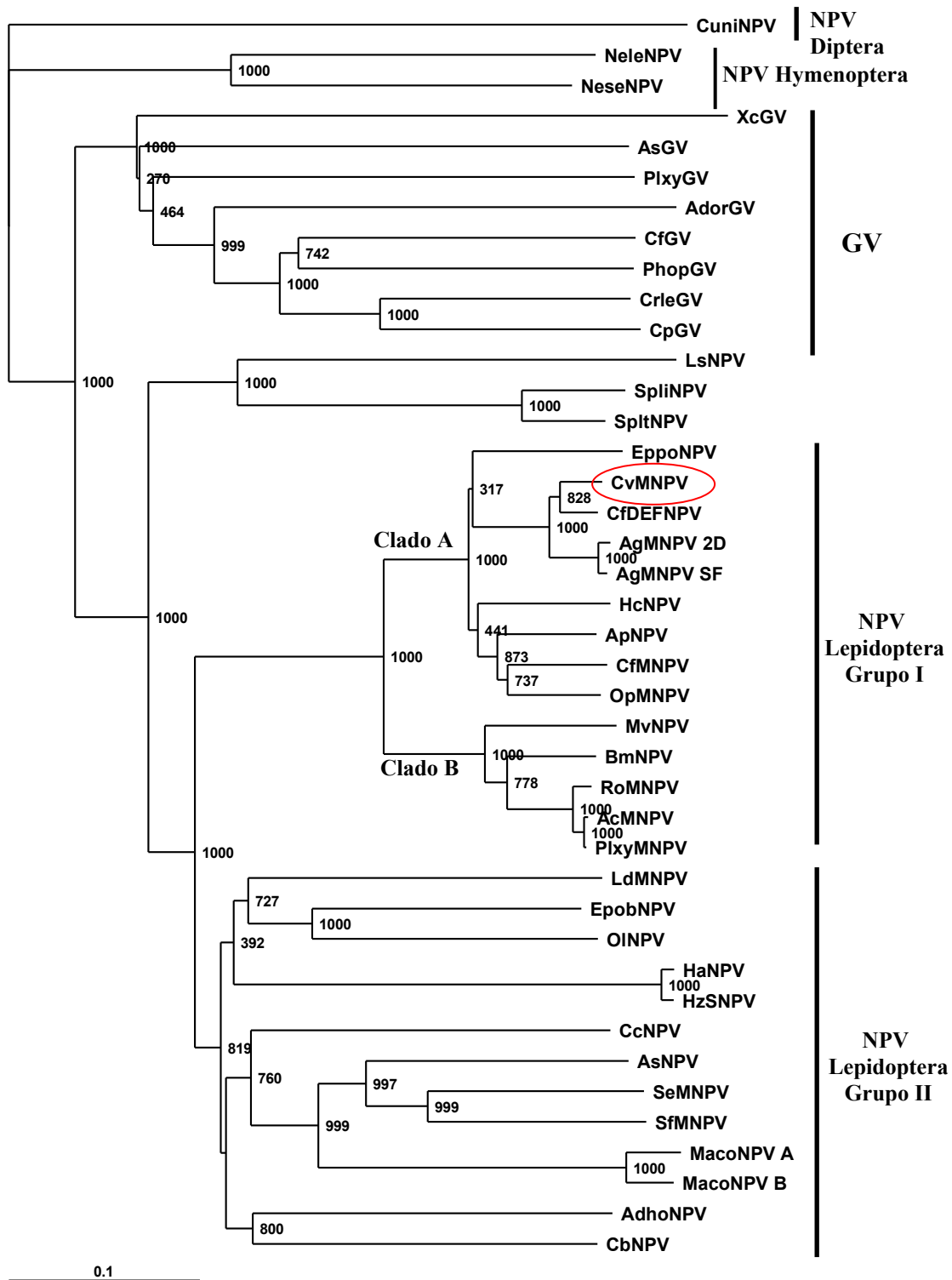
20, B), a situação se inverte. Porém, ambas colocam os GV como um grupo muito próximo dos NPV Hymenoptera e NPV Diptera (Figura 20).

Na filogenia protéica aqui apresentada (Figura 20, B), os baculovirus SpliNPV e SpltNPV estão agrupados como representantes dos NPV-I. Na literatura, estes dois baculovirus estão **mais** relacionados com os NPV-II e classificados como integrantes deste grupo (Rashidan *et al.*, 2003; 2004; Belaich *et al.*, 2006).

Em todas as árvores construídas, independentemente da abordagem escolhida (gênica ou protéica, enraizada e não enraizada, com ou sem grupo externo), o baculovirus *Condylorrhiza vestigialis multiple nucleopolyhedrovirus* (CvMNPV) está posicionado no mesmo grupo filogenético (*cluster*) que o *Choristoneura fumiferana defective nucleopolyhedrovirus* (CfDEFNPV) e também é muito próximo, na escala evolutiva, dos vírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) e *Epiphyas postvittana nucleopolyhedrovirus* (EppoNPV), componentes do mesmo subclado (subclado I-Aa) (Figura 20). Estes resultados concordam com os valores de identidade encontrados entre as proteínas P74 de CvMNPV e homólogos, apresentados pela análise de BLASTN.



(A)



(B)

**Figura 20. Filograma de seqüências p74 da família *Baculoviridae*, enraizado com o grupo externo CuniNPV. (A) Árvore filogenética baseada nas seqüências nucleotídicas. (B) Árvore filogenética baseada nas seqüências de aminoácidos deduzidas. Ambas foram construídas pelo método da máxima parcimônia utilizando o programa PAUP 4.0b4a (Swofford, 2002). A descrição das seqüências utilizadas encontra-se na Tabela 4. Os números são os *bootstraps* de cada ramo (1000 replicatas). As seqüências não informativas foram ignoradas (*gaps*). O círculo em vermelho indica o baculovirus CVMNPV.**

## DISCUSSÃO

O gene *p74*, presente em todos baculovirus já seqüenciados, codifica uma proteína associada ao envelope de partículas ODV que é essencial para a infecção oral.

No presente estudo, as seqüências nucleotídica e peptídica do gene *p74* de um baculovirus patogênico à lagarta da Mariposa-do-Álamo, nomeado como *Condylorrhiza vestigialis* MNPV (Castro *et al.*, 2003), foram determinadas, analisadas e, com base nas árvores filogenéticas construídas, estimadas suas relações filogenéticas dentro da família *Baculoviridae*.

A hibridização usando como sonda um fragmento de PCR, derivado de oligonucleotídeos obtidos a partir do alinhamento de homólogos *p74* de outros baculovirus, permitiu a localização parcial do gene nos fragmentos de restrição *HindIII* – banda de 1,0 kb e *EcoRI* – banda de 3,0 kb do genoma de CvMNPV.

A partir da seqüência do gene *p74* com 1935 pb e o alinhamento de sua seqüência de aminoácidos deduzida com outras proteínas P74 foi possível obter informações quanto à similaridade com os demais baculovirus, identificação de regiões conservadas, predição das principais características físico-químicas da proteína, modificações pós-traducionais e sua estrutura secundária.

A ORF P74 CvMNPV codifica potencialmente uma proteína de 644 aminoácidos de massa molecular de 73.613,3 Da, próxima ao da maioria das proteínas P74 depositadas em banco de dados e relatadas na literatura (Slack *et al.*, 2001; Rashidan *et al.*, 2003; Beilach *et al.*, 2006).

O ponto isoelétrico teórico de 5,12 e as demais predições físico-químicas constituem informação bastante útil para a facilitação do processo de purificação

protéica visando estudos funcionais e estruturais. O coeficiente de extinção molar está entre 0,964 e 0,961 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, a 280 nm em água.

A hidropaticidade média predita para a proteína P74 de CvMNPV foi de -0,039, o que indica que este polipeptídeo é considerado uma molécula de predominância ligeiramente hidrofóbica.

Com o alinhamento da seqüência peptídica das proteínas P74 de baculovirus, quatro regiões conservadas foram identificadas na seqüência de aminoácidos P74 deduzida em CvMNPV: dois relativos à infectividade oral do vírus e dois domínios transmembrânicos na extremidade C-terminal. De acordo com a literatura, os domínios transmembrânicos C-terminais ancoram a P74 no envelope do ODV, atravessando a membrana duas vezes (Rashidan *et al.*, 2003; 2004; Belaich *et al.*, 2006). Vale ressaltar que neste estudo sugere-se a existência de um terceiro domínio transmembrânico mais afastado da extremidade C-terminal, o qual pode estar relacionado a uma mudança evolucionária recente na P74 homóloga de PlxyGV (Kuzio *et al.*, 1989; Rashidan *et al.*, 2003).

Os domínios relacionados à infectividade oral, de maneira similar a outras proteínas de envelopes virais que desempenham um papel na infectividade do vírus (Belaich *et al.*, 2006), contêm o maior número de aminoácidos conservados, demonstrando a importância da sua preservação para a P74. Desta forma, enquanto a extremidade C-terminal ancora a proteína na membrana do ODV, os domínios P74 ficam expostos na superfície e provavelmente interagem com receptores específicos presentes na membrana plasmática da célula hospedeira. Todavia, uma região da proteína (315-380 aa.) apresentou maior variabilidade, como também relatado na P74 de AgMNPV. Belaich *et al.* (2006) sugeriram que esta região estaria diretamente relacionada com a especificidade do vírus ao inseto hospedeiro.

A maioria dos homólogos P74, inclusive a P74 de CvMNPV, apresentou um número predominante de resíduos de glicina (G) e prolina (P) na região N-terminal. Estes resíduos estão associados à superfície de alças e participam de mudanças conformacionais da proteína (Rashidan *et al.*, 2003; 2004). Os cinco resíduos de cisteína (C) presentes na P74 de CvMNPV estão conservados em todos os homólogos P74 analisados. As cisteínas estão envolvidas na criação de pontes dissulfeto, importantes para o dobramento correto da proteína (Rashidan *et al.*, 2003; 2004).

Na seqüência de aminoácidos P74 deduzida de CvMNPV não foi identificado peptídeo-sinal na extremidade N-terminal. Algumas proteínas específicas do envelope ODV (incluindo a PIF) possuem esta seqüência direcionadora, embora não tenha ainda sido demonstrado que esta seqüência N-terminal seja clivada no envelope do ODV e como participa do processo de transporte (Kikhno *et al.*, 2002; Pijlman *et al.*, 2003). No caso da proteína P74, um dos domínios hidrofóbicos C-terminais pode estar envolvido no transporte e localização da proteína no envelope do ODV.

Três importantes modificações ocorridas na P74 de CvMNPV foram previstas a partir da sua seqüência de aminoácidos deduzida: glicosilação, fosforilação e miristilação. A glicosilação é importante para o dobramento da proteína, interação com outros polipeptídeos e para o seu direcionamento no retículo endoplasmático (Darvey, 1989; Simón *et al.*, 2005). A fosforilação mediada pelas enzimas, caseína kinase II e kinase C, pode de certa forma regular a função de adesão da P74 à membrana celular das microvilosidades da célula epitelial do intestino médio da lagarta ou outras propriedades, através da transferência do grupo fosforil do ATP para a cadeia lateral de uma serina (S), treonina (T) e/ou tirosina (Y), principalmente (Lehninger *et al.*, 1999).

As proteínas integrais de membrana, como a P74, são mantidas na membrana por fortes interações entre os domínios hidrofóbicos (aminoácidos apolares) e as cadeias



laterais dos lipídeos. Assim, algumas proteínas contêm um ou mais lipídeos de vários tipos covalentemente ligados, fornecendo uma âncora hidrofóbica na membrana plasmática (ou no envelope do ODV, no caso dos baculovirus) e direcionando a proteína para a sua correta localização (Lehninger *et al.*, 1999). Um exemplo deste fenômeno é a chamada miristilação, onde um grupo N-miristoil se liga geralmente a uma glicina (G) N-terminal. Seis prováveis sítios de miristilação foram encontrados na seqüência de aminoácidos P74 deduzida de CvMNPV.

A estrutura secundária predominante ao longo da seqüência peptídica da proteína P74 de CvMNPV é a  $\alpha$ -hélice. Geralmente regiões hidrofóbicas que atravessam a membrana possuem uma conformação  $\alpha$ -hélice, pois proporcionam que as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos projetem-se para a face externa da hélice e interajam com os lipídeos de membrana, formando uma estrutura muito estável (Alberts *et al.*, 1994; Lehninger *et al.*, 1999). Por ser uma estrutura secundária muito estável, a  $\alpha$ -hélice favorece a interação proteína-proteína (Alberts *et al.*, 1994). Pode-se inferir que a probabilidade de ocorrer oligomerização entre P74 de CvMNPV e outras proteínas seja maior nas regiões helicoidais. Uma destas proteínas pode ser a 25KFP, que é essencial para a montagem normal da partícula ODV e provavelmente regula direta ou indiretamente o tráfego de algumas proteínas do envelope viral (Acosta *et al.*, 2001). Na seqüência de aminoácidos P74 deduzida de CvMNPV, dois pequenos segmentos, particularmente ricos em lisina (L), arginina (R) e prolina (P), podem ser um sinal de reconhecimento para outras proteínas, inclusive a 25KFP (Figura 14). O transporte de proteínas para o núcleo da célula depende de sinais de localização celular, geralmente seqüências pequenas (4 a 8 aa) ricas em lisina (L), arginina (R) e prolina (P). Esses sinais são reconhecidos por proteínas citosólicas que auxiliam o direcionamento da proteína ao poro nuclear (Alberts *et al.*, 1994).

Outra análise proposta com base na seqüência do gene *p74* e de sua seqüência de aminoácidos P74 deduzida foi sobre a filogenia do baculovirus CvMNPV. A reconstrução filogenética, utilizando o método da máxima parcimônia, de forma geral, apresentou resultados coerentes com propostas já descritas, que divide a família *Baculoviridae* em quatro grupos: NPV (*Nucleopolyhedrovirus*) de Lepidoptera, NPV de Diptera, NPV de Himenoptera e GV (*Granulovirus*) (Belaich *et al.*, 2006; Jehle *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2006).

As duas árvores filogenéticas construídas dividem os NPV em dois grandes ramos, o Grupo I e o Grupo II. As análises dos filogramas propostos neste trabalho mostram que Grupo II não está nitidamente dividido em clados e subclados como o Grupo I. O que se observa no Grupo II é uma maior e mais antiga diversificação entre as espécies a partir do seu ancestral comum, quando comparado com o Grupo I. De acordo com a literatura, as relações filogenéticas dentro do Grupo II são menos estáveis que no Grupo I (Cowan *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 1997). Hu *et al.* (1998) relatam que as variações apresentadas na filogenia do Grupo II são devido à diversidade apresentada pelos vírus pertencentes a este grupo ser maior que nos vírus do Grupo I.

Outro aspecto a ser comentado é que na filogenia baseada na seqüência protéica, diferentemente da filogenia gênica, os baculovirus SpliNPV e SpltNPV não são integrantes do Grupo II dos NPV ao contrário do descrito na literatura (Rashidan *et al.*, 2003; 2004; Belaich *et al.*, 2006). Herniou *et al.* (2001) verificaram que a maioria das variações topológicas da família *Baculoviridae* reside dentro dos NPV do Grupo II e dos GV. Estas variações podem ser devido ao fato de alguns representantes destes grupos apresentarem genomas muito grandes, criando um desbalanço na distribuição dos caracteres. Outra explicação, abordada no trabalho, sugere que algumas espécies são muito similares e outras divergentes, não fornecendo assim caracteres apropriados para

estabelecer suas relações filogenéticas. Portanto, análises adicionais são requeridas para validar a composição e a distribuição dos ramos do Grupo II.

Com relação ao grupo composto pelos *Granulovirus*, pelos NPV Hymenoptera e pelo NPV Diptera, os altos valores de *bootstraps* sugerem que as relações dentro destes grupos sejam bem suportadas. A diversificação entre o grupo do NPV Diptera e do NPV Hymenoptera, onde o baculovirus CuniNPV se separa dos baculovirus NeleNPV e NeseNPV, concorda com a árvore publicada por Jehle *et al.* (2006) e reforça a nova proposta de separação destes baculovirus em dois gêneros: *Gamabaculovirus* e *Deltabaculovirus*, respectivamente.

A utilização de um único de gene para construções filogenéticas ainda é controversa (Koonin *et al.*, 2000), porém muito utilizada, principalmente quando não se dispõe da seqüência completa do genoma do baculovirus, como é o caso do CvMNPV. Assim, os dados filogenéticos obtidos neste trabalho apresentaram algumas divergências aos descritos na literatura. Além disso, outro fator que pode ter influenciado esta divergência foi o número de espécies de baculovirus envolvidas na construção do filograma (41 espécies), superior ao número comumente utilizado para este tipo de estudo.

Segundo a topologia apresentada para os clados pertencentes ao Grupo I, I-A e I-B, pode-se sugerir um maior parentesco do baculovirus CvMNPV com os baculovirus CfDEFNPV e AgMNPV, pertencentes ao Clado I-A, cujas relações filogenéticas parecem ser bem suportadas devido os altos valores de *bootstraps*. Isso indica que o CvMNPV deve estar mais proximamente relacionado ao CfDEFNPV do que com outros baculovirus, compartilhando com este táxon um ancestral comum mais recente do que com os outros táxons do Clado I-A. Estudos com base na análise da seqüência do gene inibidor de apoptose (*iap-3*) e do gene da DNA polimerase (*dnapol*) de AgMNPV

também indicaram o baculovirus AgMNPV como mais próximo de CfDEFNPV (Carpes *et al.*, 2005; Dalmolin *et al.*, 2005), o que reforça a idéia de que a distribuição do Clado I-A baseada no gene *p74* de CvMNPV seja plausível. Desta forma, os dados obtidos a partir da análise filogenética do CvMNPV, objeto deste estudo e anteriormente classificado somente quanto ao gênero, suportam que esse baculovirus pertence ao Grupo I.

## CONCLUSÕES

- ✓ O gene *p74* de foi localizado parcialmente nos fragmentos *Hind*III (banda 1,0 kb) e *Eco*RI (banda 3,0 kb) no perfil de restrição do genoma de CvMNPV.
- ✓ O gene *p74* de CvMNPV foi clonado e totalmente seqüenciado.
- ✓ A análise da seqüência do gene indicou a presença de uma ORF de 1935 pb, que codifica potencialmente 644 aminoácidos de massa molecular de 73.6 kDa, pI 5,12, coeficiente de extinção molar entre 0,964 e 0,961 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (a 280 nm em água) e hidropaticidade média -0,039.
- ✓ O alinhamento do gene *p74* de CvMNPV com outros *p74* homólogos revelou a presença de 4 domínios conservados: dois relacionados à infectividade oral e dois domínios transmembrânicos na região C-terminal.
- ✓ Os domínios C-terminais ancoram a P74 no envelope ODV, já os domínios de infectividade oral ficam expostos na superfície ODV.
- ✓ A variabilidade encontrada na região da proteína de 315-380 aa. pode estar relacionada com a especificidade do vírus ao inseto hospedeiro.
- ✓ Não foi identificado peptídeo-sinal na extremidade N-terminal da seqüência de aminoácido P74 deduzida de CvMNPV. Entretanto, foram identificados potenciais regiões passíveis de modificações pós-traducionais do tipo glicosilação, fosforilação e miristilação.
- ✓ A estrutura secundária predominante é a  $\alpha$ -hélice e foram identificados três potenciais sítios de oligomerização protéica, que por sua vez estão associados às regiões de maior densidade de  $\alpha$ -hélices. Aliado a isso, dois pequenos segmentos particularmente ricos em lisina, arginina e prolina foram identificados e por sua vez podem ser sinais de reconhecimento para outras proteínas, como

por exemplo a 25KFP, que regula o tráfego de algumas proteínas do envelope ODV.

- ✓ A reconstrução filogenética, utilizando o método da máxima parcimônia, manteve a divisão da família *Baculoviridae* em quatro grupos: *Nucleopolyhedrovirus* de Lepidoptera, *Nucleopolyhedrovirus* de Diptera, *Nucleopolyhedrovirus* de Hymenoptera e *Granulovirus*.
- ✓ A estimativa filogenética baseada no gene *p74* revelou que o CvMNPV é pertencente ao Grupo I dos *Nucleopolyhedrovirus* de Lepidoptera e está proximamente relacionado na escala evolutiva com o vírus CfDEFNPV.
- ✓ As análises filogenéticas baseadas no gene *p74* e em sua seqüência de aminoácidos deduzida permitiram estabelecer preliminarmente as relações de parentesco do recém-identificado CvMNPV com os demais baculovirus.

## PERSPECTIVAS

- ✓ Características físico-químicas preditas a partir da seqüência de aminoácidos P74 deduzida de CvMNPV poderão facilitar sua purificação e conseqüentemente possibilitar a produção de anticorpos anti-P74 CvMNPV para detecção e/ou quantificação por imunodeteção nos tecidos do hospedeiro.
- ✓ A P74 poderá ser produzida em larga escala, através da expressão heteróloga recombinante em células de inseto por baculovirus, viabilizando estudos funcionais e estruturais da proteína.
- ✓ Estudos envolvendo a seqüência peptídica da P74 poderão ajudar a esclarecer o tráfego das proteínas do envelope ODV, facilitar a busca de possíveis receptores da proteína nas células epiteliais do intestino do inseto hospedeiro e a obter um maior entendimento da função dos domínios conservados nos eventos iniciais da infecção primária de baculovirus.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, G. R., BRAUNAGEL, S. C., SUMMERS, M. D. (2001). Effects of deletion and overexpression of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus *FP25K* gene on synthesis of two occlusion-derived virus enveloped proteins and their transport into virus-induced intranuclear membranes. *Journal of Virology* 75: 10829-10842.
- AFONSO, C. L., TULMAN, E. R., LU, Z., BALINSKY, C. A., MOSER, B. A., BECNEL, J. J.; ROCK, D. L.; KUTISH, G. F. (2001). Genome sequence of a baculovirus pathogenic for *Culex nigripalpus*. *Journal of Virology* 75: 11151-11165.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. D.. *Molecular Biology of the Cell* , 3<sup>th</sup> ed. , *Garland Publishing, Inc.* New York, 1994. p. 1-1294.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MEYERS, E. W., LIPMAN, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 586-605.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- AYRES, M. D., HOWARD, S. C., KUZIO, J., LOPEZ-FERBER, M., POSSEE, R. D. (1994). The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 202: 586-605.
- BALATINECZ, J. J., KRETSCHMANN, D. E. (2001). Properties and utilization of poplarwood. In: Dickmann, D. I., Isebrands, J. G., Eckenwalder, J. E., Richardson, J. (Eds.). *Poplar Culture in North America*. Ottawa , Canada. NRC. *Research Press*, p. 277-291.
- BANKOVA, V. S., POPOV, S. S., MAREKOV, N. L (1989). Isopentenyl cinnamates from poplar buds and propolis. *Phytochemistry* 28: 871-873.
- BELAICH, M. N., RODRÍGUEZ, V., BILEN, M. F., PILLOFF, M. G., ROMANOWSKI, V., SCIOCCO-CAP, A., GHIRINGHELLI, P. D. (2006). Sequencing and characterization of p74 gene in two isolates of *Anticarsia gemmatalis* MNPV. *Virus Genes* 32: 59-70.
- BENIYA, H., BRAUNAGEL, S. C., SUMMERS M. D. (1998). *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: subcellular localization and protein trafficking of BV/ODV-E26 to intranuclear membranes and viral envelopes. *Virology* 240: 64-75.
- BILIMORIA, S. L. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. In: Kurstak, E. (Ed), *Viruses of Invertebrates*. New York: Marcel Dekker, 1991. p.1-72.



BISCHOFF, D. S., SLAVICEK, J. M. (1997). Molecular analysis of an *enhacin* gene in the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology* 71: 8133-8140.

BLISSARD, G. W., ROHRMANN, G. F. (1990). Baculovirus diversity and molecular biology. *Annual Review of Entomology* 35: 127-155.

BLISSARD, G. W., WENZ, J. R. (1992). Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. *Journal of Virology* 66: 6829-6835.

BRAUNAGEL, S. C., ELTON, D. M., MA, H., SUMMERS, M. D. (1996a). Identification and analysis of an *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus structural protein of the occlusion-derived virus envelope: ODV-E56. *Virology* 217: 97-110.

BRAUNAGEL, S. C., HE, H., RAMAMURTHY, P., SUMMERS, M. D. (1996b). Transcription, translation, and cellular localization of three *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus structural proteins: ODV-E18, ODV-E35, and ODV-EC27. *Virology* 222: 100-114.

BRAUNAGEL, S. C., RUSSELL, W. K., ROSAS-ACOSTA, G., RUSSELL, D. H., SUMMERS M. D. (2003). Determination of the protein composition of the occlusion-derived virus of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *Virology* 108: 297-308.

BRAUNAGEL, S. C., SUMMERS, M. D. (1994). *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, PDV and ECV viral envelopes and nucleocapsids: structural proteins; antigens; lipid and fatty acid profiles. *Virology* 202: 315-328.

BULACH, D. M., KUMAR, A., ZAIA, A., BUFENG, L., TRIBE, D. E. (1999). Group II Nucleopolyhedrovirus subgroups revealed by a phylogenetic analysis of polyhedrin and DNA polymerase gene sequences. *Journal of Invertebrate Pathology* 73: 59-73.

CARPES, M. P., CASTRO, M. E. B., SOARES, E. F., VILLELA, A. G., PINEDO, F. J. R.; RIBEIRO, B. M. (2005). The inhibitor of apoptosis gene (*iap-3*) of *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) encodes a functional IAP. *Archives of Virology* 150: 1549-1562.

CASTRO, M. E. B., RIBEIRO, Z. M. A., SOUZA, M. L., SOUSA, N. J., MOSCARDI F. Identificação do baculovirus da lagarta do álamo *Condyloporrhiza vestigialis* (Guenée, 1854) (Lepidoptera: Pyralidae). Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 9 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 87).

COWAN, P., BULACH, D., GOODGE, K., ROBERTSON, A., TRIBE, D. E. (2004). Nucleotide sequence of the polyhedrin gene region of the *Helicoverpa zea* single nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus: placement of the virus in lepidoptera nuclear polyhedrosis virus group II. *Journal of General Virology* 75: 3211-3218.

DALMOLIN, C. C., DA SILVA, F. R., MELLO, L. V., RIGDEN, D. J., CASTRO, M. E. B. (2005). Nucleotide sequence and phylogenetic analyses of the DNA polymerase gene of the *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. *Virus Research* 110: 99 - 109.

- DARVEY, J. (1989). Sorting out the secretory pathway. *Bioassays* 11: 185-187.
- DERKSEN, A. C. G., GRANADOS, R. R. (1988). Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculovirus and enhancement of viral infectivity. *Virology* 167: 242-250.
- DI CIERO, L. (2007). Árvores para bioenergia. Boletim Agência FAPESP.
- DIODATO, M. A. (1999). Bioecologia, aspectos morfológicos e consumo de *Condylorrhiza vestigialis* (Guénee, 1854) (Lepdoptera:Crambidae) em *Populus deltoides*, Bart ex Marsh (Salicaceae), Curitiba (PR): UFPR. 100p. Tese de Doutorado.
- ENGELHARD, E. K., KAM-MORGAN, L. N., WASHBURN, J. O., VOLKMAN, L. E. (1994). The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. *Microbiology* 91: 3224-3227.
- FANG, M., WANG, H., WANG, H., YUAN, L., CHEN, X., VLAK, J. M., HU, Z. (2003). Open reading frame 94 of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus encodes a novel conserved occlusion-derived virion protein, ODV-EC43. *Journal of General Virology* 84: 3021-3027.
- FAO. Síntesis de los informes nacionales de progreso recibidos, elaborados para a 22<sup>a</sup> Reunión de la Comisión Internacional del Álamo, organizada conjuntamente por la FAO y las Comisiones Nacionales del Álamo de Chile e Argentina; Santiago de Chile 2004. p. 1- 43.
- FAULKNER, P., KUZIO, J., WILLIAMS, G. V., WILSON, J. A. (1997). Analysis of p74, a PDV envelope protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus required for occlusion body infectivity *in vivo*. *Journal of General Virology* 78: 3091-3100.
- FEDERICI, B. A. Baculovirus pathogenesis. In: Miller, L. K. (Ed.), The Baculoviruses. *Plenum Press*, New York, N.Y. 1997. p. 33-59.
- FRAZER, M. J. (1986). Ultrastructural observation of virion maturation in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infected *Spodoptera frugiperda* cell cultures. *Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research* 95: 189-195.
- FRIESEN, P. D., MILLER, L. K. (1986). The regulation of baculovirus gene expression. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 131:31-49.
- FUNK, C. J., CONSIGLI, R. A. (1993). Temporal expression and immunogold localization of *Plodia interpunctella* granulosis virus structural proteins. *Virus Research* 28: 57-66.
- GARNIER, J., GIBRAT, J. F., ROBSON, B. (1996). GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods in Enzymology* 266: 540-553.

GASTEIGER, E., HOOGLAND, C., GATTIKER, A., DUVAUD, S., WILKINS, M. R., APPEL, R. D., BAIROCH, A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker, J. M. (Ed.). *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press. 2005. p. 571-607.

GHISALBERTI, E. L. (1979). Propolis: A review. *Bee World* 60:59-84.

GRANADOS, R. R. (1978). Early events in the infection of *Heliothis zea* midgut cells by a baculovirus. *Virology* 90: 170–174.

GRANADOS, R. R., FEDERICI, B. A. (Eds). (1986). *The Biology of Baculoviruses*, vol. 1 e 2, Boca Raton, Florida, CRC Pres Inc. 304 p. e 320 p.

GRANADOS, R. R., LAWLER, K. A. (1981). *In vivo* pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. *Virology* 108: 297-308.

GRANADOS, R. R.; WILLIAMS, K. A. (1986). *In vivo* infection and replication of baculoviruses, In: Granados, R. R., Federici, B. A. (Eds.). *The Biology of Baculoviruses*, vol 1, Biological Properties and Molecular Biology. Boca Raton, FL: CRC Press. p. 89-108.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A., SANTOS, A. F., AUER, C. G. (2000). Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. *Floresta* 30: 155-165

GUTIÉRREZ, S., KIKHNO, I., FERBER, M. L. (2004). Transcription and promoter analysis of *pif*, an essential but low-expressed baculovirus gene. *Journal of General Virology* 85: 331-341.

GUTIÉRREZ, S., MUTUEL, D., GRARD, N., CERUTTI, M., FERBER, M. L. (2005). The deletion of the *pif* gene improves the biosafety of the baculovirus-based technologies. *Journal of Biotechnology* 116: 135-143.

HERNIOU, E. A., JEHL, J.A. (2007). Review: Baculovirus phylogeny and evolution. *Current Drug Targets* 10:1043-50.

HERNIOU, E. A., LUQUE, T., CHEN, X., VLAK, J. M., WINSTANLEY, D., CORY, J. S., O'REILLY, D. R. (2001). Use of the whole genome sequence data to infer baculovirus phylogeny. *Journal of Virology* 75: 8117-8126.

HERNIOU, E. A., OLSZEWSKI, J. A., CORY, J. S., O'REILLY D. R. (2003). The genome sequence and evolution of baculoviruses. *Annual Review of Entomology* 48: 211-234.

HONG, T., BRAUNAGEL, S. C., SUMMERS, M. D. (1994). Transcription, translation, and cellular localization of PDV-E66: a structural protein of the PDV envelope of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 204: 210-222.

HONG, T., SUMMERS, M. D., BRAUNAGEL, S. C. (1997). N-terminal sequences from *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus envelope proteins ODV-E66 and ODV-E25 are sufficient to direct reporter proteins to the nuclear envelope,

intranuclear microvesicles, and the envelope of occlusion-derived virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 4050-4055.

HORTON, H. M., BURAND, J. P. (1993). Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. *Journal of Virology* 67: 1860-1868.

HU, Z. H., ARIF, B. M., MARTENS, J. W. M., CHEN, X. W., SUN, J. S., ZUIDEMA, D., GOLDBACH, R. W., VLAK, J. M. (1998). Distinct gene arrangement in the *Buzura suppressaria* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome. *Journal of General Virology* 79: 2841-51.

HU, Z. H., BROER, R., WESTERLAKEN, J., MARTENS, J. W. M., JIN, F.; JEHLE, J. A., WANG, L. M., VLAK, J. M. (1997). Characterization of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene of a single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus of *Buzura suppressaria*. *Virus Research* 47: 91-97.

HUANG, X., MADAN, A. (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research* 9: 868-877.

IJKEL, W. F. J., LEBBINK R. J., op den BROUW, M. L., GOLDBACH, R. W., VLAK, J. M., ZUIDEMA, D. (2001). Identification of a novel occlusion derived virus-specific protein in *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrosis virus. *Virology* 284: 170-181.

IJKEL, W. F. J., van STRIEN E. A., HELDENS J. G. M., BROER, R., ZUIDEMA, D., GOLDBACH R, W., VLAK, J. M. (1999). Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. *Journal of General Virology* 80: 3289-3304.

ISLA, M. I., MORENO, M. I. N., SAMPIETRO, A. R. (2001). Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 76: 165-170.

JAKUBOWSKA, A. K., PETERS, S. A., ZIEMNICKA, J., VLAK, J. M., van OERS, M. M. (2006). Genome sequence of an enhancin gene-rich nucleopolyhedrovirus (NPV) from *Agrotis segetum*: collinearity with *Spodoptera exigua* multiple NPV. *Journal of General Virology* 87: 537-551.

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

JIANG, T., LI, X., SONG, J., LIANG, C., CHEN, X. (2008). Baculovirus *per os* infectivity factors are involved in HearNPV ODVs. Infection of HzAM1 cells *in vitro*. *Virologica Sinica*, 23: 25 - 30.

JONG, J. G., LAUZON, H. A., DOMINY, C., POLOUMIENKO, A., CARSTENS, E., ARIF, B., KRELL, P. J. (2005). Analysis of the *Choristoneura fumiferana* nucleopolyhedrovirus genome. *Journal of General Virology* 86: 929-943.

- KIKHNO, I., GUTIERREZ, S., CROIZIER, L., CROIZIER, G.; FERBER, M. L. (2002). Characterization of pif, a gene required for the per os infectivity of *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology* 183: 3013–3022.
- KOONIN E. V., ARAVIND L., KONDRASHOV A. S. (2000). The impact of comparative genomics on our understanding of evolution. *Cell* 101:573-576.
- KUZIO, J., JAQUES, R., FAULKNER, P. (1989). Identification of p74 a gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies. *Virology* 173:759-763.
- KUZIO, J., PEARSON, M. N., HARWOOD, S. H., FUNK, C. J., EVANS J. T., SLAVICEK, J. M., ROHRMANN G. F. (1999). Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*. *Virology* 253: 17-34.
- LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M (1999). *Princípios da Bioquímica*, 2ª ed., Ed. Sarvier, São Paulo, p. 1- 839.
- LEPORE, L. S., ROELVINK, P. R., GRANADOS, R. R. (1996). Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease. *Journal of Invertebrate Pathology* 68: 131-140.
- LI, L., DONLY, C., LI, Q., WILLIS, L. G., KEDDIE, B. A., ERLANDSON, M. A., THEILMANN, D. A. (2002a). Identification and genomic analysis of a second species of nucleopolyhedrovirus isolated from *Mamestra configurata*. *Virology* 297: 226–244.
- LI, Q., DONLY, C., LI, L., WILLIS, L. G., THEILMANN, D. A., ERLANDSON, M. (2002b). Sequence and organization of the *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus genome. *Virology* 294: 106–121.
- LI, X., SONG, J., JIANG, C., LIANG, C., CHEN, X. (2007). The N-terminal hydrophobic sequence of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus PIF-3 is essential for oral infection. *Archives of Virology* 152: 1851-1858.
- LONG, G., CHEN, X., PETERS, D., VLAK, J. M., HU, Z. (2003). Open reading frame 122 of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus encodes a novel structural protein of occlusion-derived virions. *Journal of General Virology* 84: 115-121.
- LUNG, O., WESTENBERG, M., VLAK, J. M., ZUIDEMA, D., BLISSARD, G. W. (2002). Pseudotyping *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AcMNPV): F proteins from group II NPVs are functionally analogous to AcMNPV GP64. *Journal of General Virology* 76: 5729–5736.
- LUPAS, A., van DYKE, M., STOCK, J. (1991). Predicting Coiled Coils from Protein Sequences. *Science* 252: 1162-1164.
- MANDEL, M., HIGA, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of Molecular Biology* 53: 159-162.

- MARKHAM, R. K., MITCHELL, K. A., WILKINS, A. L. (1996). HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry* 42: 205-211.
- MARUNIAK, J. E. (1986). Baculovirus structural proteins and proteins synthesis. In: Granados, R. R., Federici, B. R. (Eds.). *The Biology of Baculoviruses*, vol. I. Biological Properties and Molecular Biology. CRC Press, Boca Raton, Fla. p. 29-146.
- MAY-DE MIO, L. L., AMORIM, L. (2000). Doenças do álamo. *Floresta* 30: 139-153.
- McCARTHY C.B., DAI X., DONLY C., THEILMANN D.A. (2008) *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus *ac142*, a core gene that is essential for BV production and ODV envelopment, *Virology* 372: 325–339.
- MILLER, L.K. (Ed.) (1997). *The Baculoviruses*. Plenum Press. New York.
- MOSER, B. A., BECNEL J. J., WHITE S. E., AFONSO C., KUTISH G., SHANKER S., ALMIRA, E. (2001). Morphological and molecular evidence that *Culex nigripalpus* baculovirus is an unusual member of the family *Baculoviridae*. *Journal of General Virology* 82: 283-297.
- MUKAWA, S., GOTO, C. (2007). Enhancement of nucleopolyhedrovirus infectivity against *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) by proteins derived from granulovirus and a fluorescent brightener. *Journal of Economic Entomology* 100: 1075–1083
- OHKAWA, T., WASHBURN, J. O., SITAPARA, R., SID, E., VOLKMAN, L. E. (2005). Specific binding of *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to midgut cells of *Heliothis virescens* larvae is mediated by products of *pif* genes Ac119 and Ac022 but not by Ac115. *Journal of Virology* 79: 15258-15264.
- OLIVEIRA, J. V. C., WOLFF, J. L. C., GARCIA-MARUNIAK, A., RIBEIRO, B. M., CASTRO, M. E. B., SOUZA, M. L., MOSCARDI, F., MARUNIAK, J. E., ZANOTTO, P. M. A. (2006). Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology* 87: 3233–3250.
- O'REILLY, D. R., MILLER, L. K., LUCKOW, V. A. (1992). *Baculovirus Expression Vectors. A Laboratory Manual*. New York: W. H. Freeman. p. 1-347.
- PARK, Y. K., IKEGAKI, M., ALENCAR, S. M., MOURA, F. F. (2000). Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. *Honeybee Science* 21: 85-90.
- PARK, Y. K., IKEGAKI, M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations (1998). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 62: 2230-2232.

- PARK, Y. K., KOO, M. H., IKEGAKI, M., CURY, J. A., ROSALEN, P. L., ABREU, J. A. S. (1998). Antimicrobial activity of propolis on oral microorganism. *Current Microbiology* 34: 24-28.
- PERERA, O., GREEN, T. B., STEVENS JR., S. M. WHITE, S., BECNEL, J. J. (2007). Proteins associated with *Culex nigripalpus* nucleopolyhedrovirus occluded virions. *Journal of Virology* 81:4585–4590.
- PIJLMAN, G. P., PRUIJSSERS, A. J., VLAK, J. M. (2003). Identification of pif-2, a third conserved baculovirus gene required for per os infection of insects. *Journal of General Virology* 84: 2041–2049.
- POPHAM, H. J., BISCHOFF, D. S., SLAVICEK, J. M. (2001). Both *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus enhancing genes contribute to viral potency. *Journal of Virology* 233: 210-223.
- RASHIDAN, K. K., NASSOURY, N., GIANNOPOULOS, P. N., MAUFFETTE, Y. E GUERTIN, C. (2004 ). Identification, characterization and phylogenetic analysis of conserved genes within the p74 gene region of *Choristoneura fumiferana* granulovirus genome. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 37: 700-708.
- RASHIDAN, K. K., NASSOURY, N., TAZI, S., GIANNOPOULOS, P. N., GUERTIN, C. (2003). *Choristoneura fumiferana* granulovirus P74 protein, a highly conserved baculoviral envelope protein. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 36: 475-487.
- ROHRMANN, G. F. (1992). Baculoviral structural proteins. *Journal of General Virology* 73: 749-761.
- RUSSELL, R. L. Q., ROHRMANN, G. F. (1993). A 25-kDa protein is associated with the envelopes of occluded baculovirus virions. *Virology* 195: 532-540.
- RUSSELL, R. L., ROHRMANN, G. F. (1997). Characterization of P91, a protein associated with virions of an *Orgyia pseudotsugata* baculovirus. *Virology* 46: 584-593.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> edn. New York: Cold Spring Harbor.
- SCHNEIDER, P.J. (2003). *Métodos de Análise Filogenética – Um Guia Prático*. GRAFIPEL. Bragança, PA. 124p.
- SCHULTZ, J., MILPETZ, F.; BORK, P., PONTING, C. P. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 5857-5864.
- SIGRIST, C. J. A., CERUTTI, L., HULO, N. (2002). PROSITE: A documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Briefings in Bioinformatics* 3:265-274.

SIMÓN, O., GUTIÉRREZ, S., WILLIAMS, T., CABALLERO, P., FERBER, M. L. (2005). Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *pif* gene of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SfMNPV). *Virus Research* 108: 213-220.

SLACK, J., ARIF, B. M. (2007). The baculoviruses occlusion-derived virus: virion structure and function. *Advances in Virus Research* 69: 99–165.

SLACK, J. M., DOUGHERTY, E. M., LAWRENCE, S. D. (2001). A study of the *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ODV envelope protein P74 using a GFP tag. *Journal of General Virology* 82: 2279-2287.

SONNHAMMER, E. L. L., von HEIJNE, G., KROGH, A. (1998): *A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences*. In: Proc. of Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology. J. Glasgow, T. Littlejohn, F. Major, R. Lathrop, D. Sankoff, C. Sensen (Eds.). Menlo Park, CA: AAAI Press. p. 175-182.

SOUTHERN, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98: 503-507

STAPLETON-HAAS, E. J., WASHBURN, J. O., VOLKMAN, L. E. (2004). P74 mediates specific binding of *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to primary cellular targets in the midgut epithelia of *Heliothis virescens* larvae. *Journal of Virology* 78: 6786-6791.

SUMMERS, M. D. (1971). Electron microscopic observations on granulosis virus entry, uncoating and replication process during infection of the midgut cells of *Trichoplusia ni*. *Journal of Ultrastructure Research* 35: 606-625.

SUMMERS, M. D., SMITH, G. E. (1976). Comparative studies of baculovirus granulins and polyhedrins. *Intervirology* 6: 168-180.

SWOFFORD, D. L. (2000). PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

SWOFFORD, D.L. (2002). PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

TANADA, Y., HESS, R. T. (1976). Development of a nuclear polyhedrosis virus in midgut cells and penetration of the virus into the hemocoel of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *Journal of Invertebrate Pathology* 28: 67-76.

TANADA, Y., HUKUHARA, T. (1971). Enhanced infection of a nuclearpolyhedrosis virus in larvae of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*, by a factor in the capsule of a granulosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology* 17: 116–126.

TANADA, Y., KAYA, H.K. Insect pathology. *New York: Academic press*, 1993. p. 1-666.



THEILMANN, D. A., BLISSARD, G. W., BONNING, B., JEHLE, J. A., O'REILLY, D. R., ROHRMANN, G. F., THIEM, S., VLAK, J. M. (2005). *Baculoviridae*. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.). Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. 1259p. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. San Diego: *Academic Press*. p.177- 185.

THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D. G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.

TREFFLICH, K., SOUZA, N. J. Eficiência de três produtos químicos para o controle de *Condyloporrhiza vestigialis*. Guenée, 1854 (Lepidoptera: *Pyrilidae*). In: SANQUETA, C. R. (Ed.). Floresta. Curitiba: FUEPEF, 2000. p. 182.

TUSKAN, G.A., DiFAZIO S., JANSSON, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A., Schein, J., Sterck, L., Aerts, A., Bhalerao, R.R., Bhalerao, R.P., Blaudez, D., Boerjan, W., Brun, A., Brunner, A., Busov, V., Campbell, M., Carlson, J., Chalot, M., Chapman, J., Chen, G-L., Cooper, D., Coutinho, P.M., Couturier, J., Covert, S.F., Cronk, Q., Cunningham, R., Davis, J., Degroeve, S., Dejardin, A., dePamphilis, C., Detter, J., Dirks, B., Dubchak, I., Duplessis, S., Ehlting, J., Ellis, B., Gendler, K., Goodstein, D., Gribskov, M., Grimwood, J., Groover, A., Gunter, L., Hamberger, B., Heinze, B., Helariutta, Y., Henrissat, B., Holligan, D., Holt, R., Huang, W., Islam-Faridi, N., Jones, S., Jones-Rhoades, M., Jorgensen, R., Joshi, C., Kangasjarvi, J., Karlsson, J., Kelleher, C., Kirkpatrick, R., Kirst, M., Kohler, A., Kalluri, U., Larimer, F., Leebens-Mack, J., Leple, J.C., Locascio, P., Lou, Y., Lucas, S., Martin, F., Montanini, B., Napoli, C., Nelson, D.R., Nelson, C., Nieminen, K., Nilsson, O., Pereda, V., Peter, G., Philippe, R., Pilate, G., Poliakov, A., Razumovskaya, J., Richardson, P., Rinaldi, C., Ritland, K., Rouze, P., Ryaboy, D., Schmutz, J., Schrader, J., Segerman, B., Shin, H., Siddiqui, A., Sterky, F., Terry, A., Tsai, C-J., Uberbacher, E., Unneberg, P., Vahala, J., Wall, K., Wessler, S., Yang, G., Yin, T., Douglas, C., Marra, M., Sandberg, G., Van de Peer, Y., Rokhsar, D. (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313:1596-1604.

UCHIMA, K., HARVEY, J. P., OMI, E. M., TANADA, Y. (1988). Binding sites on the midgut cell membrane for the synergistic factor of a granulosis virus of the armyworm (*Pseudaletia unipunctata*). *Insect Biochemistry* 18: 645-650.

VOLKMAN, L. E. (1983). Occluded and budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: immunological relatedness of structural proteins. *Journal of Virology* 46: 221-229.

VOLKMAN, L. E., GOLDSMITH, P. A., HESS, R. T. (1986). Alternate pathway of entry of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: fusion at the plasma membrane. *Virology* 148: 288-297.

VOLKMAN, L.E. (1986). The 64k envelope protein of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Current Topics Microbiology and Immunology* 131: 103-118.

WANG, L., MIURA, M., BERGERON, L., ZHU, H., YUAN, J. (1994). Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell* 78: 739–750

WESTENBERG, M., VEENMAN, F., ROODE, E. C., GOLDBACH, R. W., VLAK, J. M., ZUIDEMA, D. (2004). Functional analysis of the putative fusion domain of the baculovirus envelope fusion protein F. *Journal of Virology* 78: 6946–6954.

WHITFORD, M., FAULKNER, P. (1993). Nucleotide sequence and transcription analysis of a gene encoding gp41, a structural glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology* 67: 2427.

WOLLENWEBER, E., BUCHMANN, S. L (1997). Feral honeybees in the Sonoran Desert: Propolis sources other than poplars (*Populus* spp.). *Zeitschrift für Naturforschung* 52: 530-535.

YAMAMOTO, T., TANADA, Y. (1978). Phospholipid, an enhancing component in the synergistic factor of a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *Journal of Invertebrate Pathology* 31: 48–56.

YAO, L., ZHOU, W., XU, H., ZHENG, Y. QI, Y. (2004). The *Heliothis armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus enveloped protein P74 is required for infection of the host midgut. *Virus Research* 104: 111-121.

YIN, F., WANG, M., TAN, Y., DENG, F., VLAK, J. M., HU, Z., WANG, H. (2008). A functional F analogue of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus GP64 from the *Agrotis segetum* granulovirus. *Journal of Virology* 82: 8922-8926.

ZANOTTO, P. M., KESSING, B. D., MARUNIAK, J. E. (1993). Phylogenetic interrelationships among baculovirus: Evolutionary rates and host associations. *Journal of Invertebrate Pathology* 62: 147-164.

ZHOU, W., YAO, L., XU, H., YAN, F., QI, Y. (2005). The function of envelope protein P74 from *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus in primary infection to host. *Virus Genes* 30: 139-150.

ZHU, Y., HUKUHARA, T., TAMURA, K. (1989). Location of a synergistic factor in the capsule of a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *Journal of Invertebrate Pathology* 54: 49–56.

**Endereços Eletrônicos:**

<http://en.wikipedia.org/wiki/Baculovirus>

<http://www.stratagene.com>

<http://www.promega.com>

<http://www.biotechbrasil.bio.br>

<http://www.mb.mahidol.ac.th/.../chromas/chromas.htm>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/blastn>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/vecscreen/vecscreen.html>

<http://www.pbil.univ-ivon1.fr/cap3.php>

<http://www.expasy.org/tools/#primary>

<http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>

[http://www.ch.embnet.org/software/coils\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/coils_form.html)

<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>

<http://www.smart.embl-heidelberg.de>

[http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_gor4.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)

<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>

<http://www.smart.embl-heidelberg.de>

[http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)