

***Edital ICESP/PROMOVE: 02/2017 - Bolsa de  
Iniciação Científica***

**TÍTULO DE PROJETO DE PESQUISA:**

**Análise funcional do gene inibidor de  
apoptose *iap-3* do baculovirus de *Anticarsia  
gemmatalis* (AgMNPV).**

**Prof. Dr. Francisco José Rivera Pinedo**

**Aluna: Mariana Vasconcelos Ribeiro**

**Águas Claras, DF - 2017**

## **Edital ICESP/PROMOVE: 02/2017 - Bolsa de Iniciação Científica**

### **TÍTULO DE PROJETO DE PESQUISA:**

## **Análise funcional do gene inibidor de apoptose *iap-3* do baculovirus de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV).**

### **1- INTRODUÇÃO**

#### **Baculovírus de *Anticarsia gemmatalis*: AgMNPV.**

*Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) é um vírus entomopatogênico da família Baculoviridae. Os vírus dessa família também são conhecidos como baculovirus e têm sido amplamente utilizados como biopesticidas para o controle biológico de pragas (Ribeiro *et al.*, 1998; Moscardi, 1999, Haase *et al.*, 2015). AgMNPV é um baculovírus que infecta a lagarta *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera:Noctuidae), muito frequente nas lavouras de soja no Brasil (Haase *et al.*, 2015). Cada lagarta de *A. gemmatalis* é capaz de consumir até 150 cm<sup>2</sup> de folha de soja e gera estragos por até 15 dias, antes de iniciar a sua transformação em mariposa (Hoffmann-Campo, 2000).

A partir dos anos 80, o Brasil passou a usar o baculovirus AgMNPV para controlar essa lagarta e até o final da década de 90,

aproximadamente 10% da área de soja plantada no país era tratada com esse vírus (Moscardi, 1999). Nos últimos anos, o uso do AgMNPV para controle dessa lagarta diminuiu consideravelmente, devido à modificação do sistema fitossanitário para conter o avanço da ferrugem asiática e pelo surgimento de novas pragas que são insensíveis ao AgMNPV, o que aumentou o uso de inseticidas químicos que controlam mais de uma praga. (Bueno et al., 2012).

O baculovirus AgMNPV, como outros baculovirus, produz dois fenótipos virais durante a infecção, um chamado de “Budded Vírus” (BV) que é produzido no início da infecção e sai da célula infectada para infectar outras células no interior da lagarta e, outro fenótipo, chamado “Occlusion Derived Virus” (ODV), que se encontra ocluído em uma massa proteica cristalina formando um corpo de oclusão denominado de poliedro ou OB. Esse poliedro é formado, em sua maioria, de uma única proteína chamada poliedrina e é produzido na parte final da infecção. Os poliedros aderem-se às folhas de soja no campo e são responsáveis pela infecção de novas lagartas por via oral (Rohrmann, 2013).

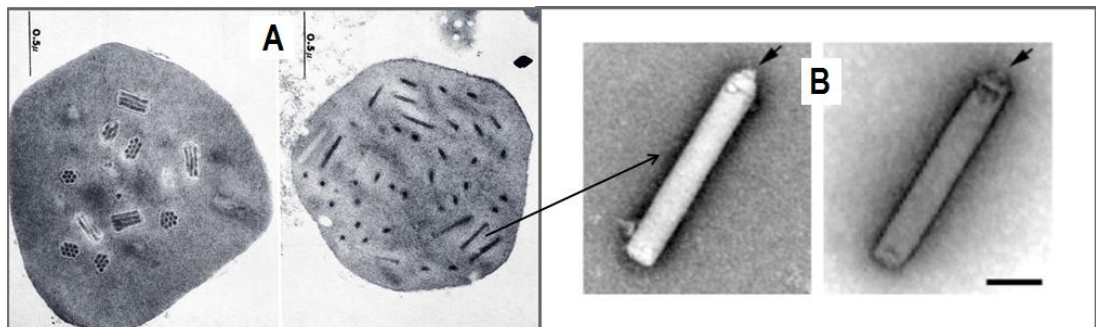


Figura 1: Microscopia eletrônica de transmissão dos dois fenótipos dos baculovirus. “A”: dois tipos de poliedros de baculovirus com partículas virais ODV envelopadas individualmente (à direita) ou em grupos (à esquerda). “B”: dois BVs isolados. Ambos fenótipos são produzidos pelas células infectadas em diferentes momentos da infecção. O OB ou poliedro possui elevada estabilidade no meio ambiente e é responsável pela infecção de lagartas por via oral. (Modificado de Rohrmann, 2013)

### **Expressão de Genes nos baculovirus.**

Os baculovirus possuem mecanismos muito particulares de controle da expressão de genes que possibilitam uma bem-sucedida infecção celular com grande produção de partículas virais e superexpressão de proteínas (Rohrmann, 2013). A expressão escalonada de genes nos baculovirus é sustentada pelos dois diferentes tipos de promotores. Um grupo de promotores assemelham-se aos promotores celulares e podem ser expressos rapidamente pela maquinaria transcricional celular (Friesen, 1997), o outro grupo de promotores só é reconhecido e transcrito por uma maquinaria transcricional que o próprio vírus codifica e produz (Lu, 1997). Após infectarem as células do inseto, os baculovirus controlam o funcionamento da célula e expressam seus genes em três fases. Primeiro, após a infecção acontecer, um grupo de genes precoces (“early”) é expresso já com meia hora de infecção e comandam modificações metabólicas que garantem o controle do funcionamento celular. Segundo, a partir de 6 h após a infecção, quando começa a replicação do DNA viral, os genes virais da fase tardia (“late”) são expressos e garantem grande produção de partículas virais extracelulares (BVs) que são responsáveis pela infecção sistêmica do inseto. Terceiro, depois da grande produção de BVs (a partir de 18h após infecção) o vírus inicia a fase muito tardia (“very late”) que é caracterizada pela superexpressão de proteínas (principalmente P10 e Poliedrina) para formação de poliedros ou OBs. No final da infecção, poliedros acumulam no núcleo das células resultando na desintegração do envelope nuclear, membrana celular e posterior desintegração da cutícula da lagarta. Os OBs são, então, liberados no meio ambiente (Rohrmann, 2013). Como a produção de poliedros ocorre em grande quantidade no final da infecção, pesquisadores do mundo inteiro usam os baculovirus como ferramenta biotecnológica para a expressão de proteínas heterólogas utilizando vetores comercialmente disponíveis (Ribeiro *et al.*, 2015).

## **Genômica estrutural versus genômica funcional.**

Nos últimos anos temos sido testemunhas do grande avanço tecnológico e pesquisas voltadas para análises de genômica estrutural, sustentados no sequenciamento automatizado e análise computacional do DNA. Atualmente, são milhares os organismos totalmente sequenciados e depositados em banco de dados de DNA, inclusive o baculovirus AgMNPV (Oliveria *et al.*, 2006). Conhece-se, por tanto, muito bem a composição de genes de muitos organismos como a do próprio homem, animais, plantas, insetos, fungos, bactérias e vírus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>). Os genes são necessários para a formação das proteínas com as quais os organismos conseguem se renovar e funcionar com eficácia, entretanto, a participação exata de muitos genes e suas proteínas não é muito bem entendida.

Vários genes do AgMNPV foram clonados e analisados quanto à sua expressão e similaridade com outros baculovirus (Rodrigues *et al.*, 2001, Razuck *et al.*, 2002; Slack *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2004 e Carpes *et al.*, 2005). O AgMNPV também foi modificado geneticamente com a inserção de genes exógenos visando a expressão de proteínas de interesse biotecnológico em células de inseto em cultura e em insetos e uma melhora na sua virulência (Ribeiro *et al.*, 2001, Pinedo *et al.*, 2003). O genoma do AgMNPV foi totalmente sequenciado e revelou a presença de 152 possíveis genes em um total de 132.239 pares de bases (Oliveira *et al.*, 2006). Além disso, as proteínas estruturais dos fenótipos virais BV e ODV do AgMNPV foram recentemente determinadas (Braconi *et al.*, 2014).

## **Genes inibidores de apoptose (p35 e *iaps*).**

Durante uma infecção viral, a célula hospedeira reage de diversas maneiras para tentar evitar a replicação do vírus. Uma dessas reações é

a morte celular programada ou apoptose, que é um mecanismo natural de eliminação de células danificadas em organismos multicelulares e também possui um papel crucial no desenvolvimento embrionário de tecidos e metamorfose em insetos (Ashe & Berry, 2003). O mecanismo de morte celular é uma cascata de eventos coordenados pela ação de enzimas denominadas de Caspases, que levam a destruição da célula e pode ser dividido em uma fase sinalizadora e outra efetora (Cohen, 1997). A apoptose é ativada por numerosos estímulos intracelulares ou extracelulares que incluem diversos estados de estresse celular como nos casos de infecção viral e depleção nutricional (Thompson, 1995; Clarke & Clem, 2003).

Os baculovirus possuem dois tipos de genes responsáveis pela expressão de proteínas que inibem a apoptose: os genes *p35* e inibidor de apoptose (*iap*). Gene homólogos ao *p35* foram encontrados até o momento apenas em baculovirus e entomopoxvirus (por exemplo, *Autografa californica multiple nucleopolyhedrovirus*, AcMNPV) e codifica a proteína P35 que é responsável pela inibição das caspases efetoras (Clem & Miller, 1994; Mehrabadi *et al.*, 2016). Já o gene *iap* foi primeiramente descrito em baculovirus, mas hoje já se sabe que está presente em várias espécies de animais, incluindo, insetos, nematóides e humanos (Clem, 1997). As proteínas IAP são capazes de inibir apoptose induzida por diferentes estímulos, como por exemplo, a radiação UV e reagentes químicos (Clem & Miller, 1994). Além disso, existe evidências de que sua ação ocorre em uma etapa anterior à ativação das Caspases efetoras (Clem, 2015).

Inibidores de apoptose (IAP) de baculovirus possuem pelo menos um domínio denominado de baculovirus IAP repeat (BIR) e uma cópia de outro domínio chamado de RING na porção C-terminal da proteína (Clem, 2015). Existem 6 tipos de genes *iaps* nos genomas dos baculovirus. Os genes *iap-1*, *iap-2* e *iap-4* foram encontrados apenas em baculovirus do gênero alphabaculovirus, os genes *iap-5* e *iap-6*, por sua vez, são encontrados exclusivamente no gênero betabaculovirus. Agora,

o gene *iap-3* foi encontrado em baculovirus dos gêneros alpha, beta e gammabaculoviruses. No baculovírus AgMNPV existem três genes do tipo *iap*, *iap-1*, *iap-2* e *iap-3* (Oliveira et al., 2006). Apenas o gene *iap-3* foi analisado parcialmente e verificou-se ser capaz de inibir a apoptose em ensaios transientes (Carpes et al., 2005). Entretanto, a função exata na cascata da apoptose e seus efeitos na produtividade viral não foram ainda esclarecidos.

## **2- JUSTIFICATIVA**

O presente trabalho representará um importante avanço na compreensão de mecanismos celulares e moleculares que possibilitam a enorme produtividade viral nos baculovirus. A análise do gene *iap-3*, proposta no presente trabalho, é inédita e acompanha análises publicadas de genes homólogos em revistas científicas internacionais nos últimos 5 anos. A compreensão dos eventos celulares e moleculares induzidos pelo gene *iap-3* facilitará próximas análises com genes relacionados, no mesmo baculovirus de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV) e representará, também, um importante avanço em genômica funcional. Estudos com o baculovirus AgMNPV são de grande repercussão, tendo em vista a enorme importância deste vírus no controle biológico da lagarta da soja, uma das mais importantes pragas da cultura de soja no Brasil.

## **3- OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral.**

O presente trabalho propõe a realização de análises funcionais do gene *iap-3* do baculovirus AgMNPV.

### **Objetivos Específicos.**

5.5.2.1- Construção de vírus AgMNPV recombinante contendo deleção no genes *iap-3*

5.5.2.4- Análise qualitativa e quantitativa do potencial do gene *iap-3* de AgMNPV na inibição da apoptose celular induzida após infecção viral de células permissivas e semipermissivas usando o baculovirus recombinante: vAg.iap-3.del-GFP

## 4- MATERIAIS E MÉTODOS

### **Culturas de Células.**

Para o presente trabalho serão usados dois tipos de células de inseto estabelecidas em culturas *in vitro*: células de *Trichoplusia ni* (falsa medideira) BTI-Tn-5B1-4 (Granados et. al., 1994) e células de *Anticarsia gemmatalis* (lagarta da soja) UFLAg-286 (Sieburth & Maruniak, 1988). As células serão mantidas em incubadora a 27 °C em meio líquido de cultura TC-100 (Gibco-BRL) suplementado com 10% de soro bovino fetal.

### **Gene antiapoptos *iap-3* e construção de vírus recombinantes .**

Para o presente trabalho será usado o gene *iap3* do AgMNPV. O gene será obtido por PCR a partir do DNA do vírus AgMNPV selvagem. Será usado o gene marcador da proteína fluorescente verde (*GFP*) sob o comando do promotor constitutivo *hsp70* (*hsp70-GFP*) de *Drosophila melanogaster*. Será gerado um plasmídeo contendo o gene *iap-3* e regiões 5' e 3' adjacentes presente no genoma viral. O gene *iap-3* será deletado parcialmente por PCR e em seu lugar inserido o cassete do gene marcador *hsp70-GFP*, este último produto (*iap-3.del-GFP*) estará inserido em um novo plasmídeo (plasmídeo final)



Para a obtenção do vírus AgMNPV recombinante será realizado o seguinte procedimento: aproximadamente 1 µg do DNA do vírus selvagem AgMNPV será misturado com aproximadamente 3 µg do DNA do plasmídeo (plasmídeo final) contendo o gene *iap-3* deletado e regiões adjacentes serão então, usada(plasmídeo final) s, juntamente com o DNA do vírus selvagem para co-transfectar células de BTI-Tn-5B1-4, acrescentado lipossomos (Cellfectin® Reagent da Invitrogen) e meio de cultura sem soro para um volume final de 220 µL, seguindo as instruções do fabricante. As células de inseto serão mantidas em incubação por 3h a 27°C e após esse período de tempo, a mistura de DNA-Lipossomo será retirada e substituída com novo meio de cultura TC-100 (Invitrogen) contendo 10% de soro bovino fetal. As células serão mantidas por pelo menos 72h em incubadora a 27°C Dentro das células de inseto ocorrerá a recombinação entre as regiões dos plasmídeos que são homólogas ao genoma viral e conseqüentemente a substituição do gene *iap-3* do vírus pelo cassete *iap-3.del-GFP*. Os vírus recombinante será purificado do sobrenadante de células de inseto co-transfectadas pelo método de diluição seriada em placa de 96 poços (O'Reilly et al., 1992).

Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação por PCR do gene *iap-3* e *hsp70-GFP* serão os seguintes:

Nome do Primer	Sequência do Primer	Número de bases
GC/IAP-3 F	ATgTCgAgCAgACCTgCTACCCTgTACg	28
GC/IAP-3 R	ATgAAggCCATTTgCATTATCAgTggAg	28
Del/IAP-3 F	gATTgCCCCAggATCCgCgCAAagATT	27
Del/IAP-3 R	CCgCgggATCCAAATAgTAgAAAagCTTg	29
EGFP F	AATTgggATCCATggTgAgCAAgggCgAggA	31
EGFP R	ggACTgTCgACTCAggTAgTggTTgTCgggC	31

### **Análise do efeito citopático das células infectadas.**

Células de inseto serão infectadas separadamente com o baculovirus recombinante e selvagem em uma multiplicidade de infecção de 10 vírus por célula (MOI:10) e fotografadas em microscopia de luz para observação e comparação da presença de apoptose.

#### **Análise por PCR em tempo real da produção de DNA viral.**

Células infectadas separadamente com os baculovirus recombinante e selvagem serão colhidas para extração de DNA viral e análise da produção de partículas virais (DNA viral) por PCR em tempo real, de forma a verificar o efeito da perda do gene *iap-3* (vAg.iap-3.del-GFP) na produtividade viral.

#### **Análise da produção de Poliedros.**

Células infectadas separadamente com os baculovirus recombinante e selvagem (MOI:10) serão colhidas após 96 h pós infecção e processadas para extração dos poliedros produzidos. Os poliedros gerados serão contabilizados em câmara de Neubauer para análise quantitativa do efeito da perda do gene *iap-3* na produção de poliedros virais

#### **Análise de quantificação da apoptose nas células infectadas.**

A quantificação da apoptose será conduzida pela análise da atividade da enzima caspase efetora celular, responsável pela condução da apoptose. Para esta análise serão infectadas células in vitro em placas de 96 poços ( $2 \times 10^5$  células por poço) durante 24, 48 e 72h para, em seguida, realizar a análise da atividade da enzima caspase celular usando o ApoLive-Glo™ Multiplex Assay (PROMEGA). Uma maior ou menor ativação da enzima caspase efetora, em células de inseto infectadas separadamente com os baculovirus recombinante e selvagem estará relacionada com a capacidade de inibição da apoptose pelo gene *iap-3*.

## 5- Referências bibliográficas

Ashe, P.C, Berry, M.D. (2003). Apoptotic signaling cascades. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 27, 199–214

Braconi, C. T.; Ardisson-Araújo, D. M. P.; Leme, A. F. P.; Oliveira, J. V. C.; Pauletti, B. A.; Garcia-Maruniak, A.; Ribeiro, B. M.; Maruniak, J. E.; Zanotto, P. M. A. (2014). Proteomic analyses of baculovirus *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus budded and occluded virus and associated host cell proteins. *J Gen Virol* 95, 980 - 989.

Bueno, A. F.; Sosa-Gómez, D. R.; Corrêa-Ferreira, B. S.; Moscardi, F.; Bueno, R. C. O. F. (2012). Inimigos naturais das pragas da soja. In: Hoffmann-Campo, C. B.; Corrêa-Ferreira, B. S.; Moscardi, F. (Ed.). Soja: manejo integrado de insetos e outros Artrópodes-praga. Brasília, DF: Embrapa, p. 493-630.

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. *Arch Virol* 150, 1549-1562.

Clarke T. E. & Clem R. J. (2003). Insect defenses against virus infection: The role of apoptosis. *Int Rev Immunol* 22, 401–424.

Clem R. J. & Miller, L. K. (1994). Control of programmed cell death by the baculovirus genes *p35* and *iap*. *Mol Cell Biol* 14, 5212–5222.

Clem R. J. (2015). Viral laps, then and now. *Stem Cell Dev Biol* 39, 72-79.

Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326, 1–16.

FRIESEN, P. D. (1997). Regulation of baculovirus early gene expression. *The baculoviruses*. Plenum Press, New York. p7-32.

Haase, S., Sciocco-Cap, A., Romanowski, V. (2015). Baculovirus insecticides in Latin America: Historical overview, current status and future perspectives. *Viruses* 7, 2230-2267.

Hoffmann-Campo, *et al*, 2000. Pragas da Soja no Brasil e seu manejo integrado. Londrina: Embrapa Soja, 70p (circular técnica, n. 30)

Lima, L.; Pinedo, F. J. R.; Ribeiro, B. M.; Zanotto, P. M. A. & Wolff, J. L. C. (2004). Identification, expression and phylogenetic analysis of the *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) helicase gene. *Virus Genes* 29, 345-352.

Mehrabadi, M.; Hussain, M.; Matindoost, L. & Asgari, S. (2015). The Baculovirus Antiapoptotic p35 Protein Functions as an Inhibitor of the Host RNA Interference Antiviral Response. *J Virol* 89, 8182-8192.

Moscardi, F. (1999). Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Ann Rev Entomol* 44, 257-289.

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). The genome of the *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV-2D): a successful viral biopesticide. *J Gen Virol* 87, 3233-3250.

Pinedo, F. J. R.; Moscardi, F.; Luque, T.; Olszewski, J. A. & Ribeiro, B. M. (2003). Inactivation of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (egt) gene of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) improves its virulence towards its insect host. *Bio Control* 27, 336 - 344.

Razuck, F. B., Ribeiro, B., Vargas, J. H., Wolff, J. L., Ribeiro, B. M. (2002). Characterization of the p10 gene region of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. *Virus Genes* 23, 243 - 247.

Ribeiro, B. M.; Souza, M. L. & Kitajima, E. W. (1998). Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus de insetos. In: ALVES, S. B. Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ, p. 481-507.

Ribeiro, B. M.; Gati, C. C.; Costa, M. H.; Maruniak, J. E.; Possee, R. D.; Moscardi, F. & Zanotto, P. M. A. (2001). Construction of a recombinant *Anticarsia gemmatalis* Nucleopolyhedrovirus (AgMNPV-2D) harbouring the  $\beta$ -galactosidase gene. *Arch Virol* 146, 1355-1367.

Ribeiro, B. M.; Morgado, F. S.; Ardisson-Araujo, D. M. P.; Silva, L. A.; Chaves, L. C. S.; Quirino, M. S.; Andrade, M. S.; Correa, R. F. T. (2015). Baculovirus para expressão de proteínas recombinantes em células de insetos In: Biotecnologia Aplicada à Saúde - Volume 2.1 ed. São Paulo : Blucher, v.2, p. 255-306.

Rodrigues, J. C. M., Souza, M. L., O'Reilly, D.; Velloso, L. M., Pinedo, F. J. R., Razuck, F. B., Ribeiro, B. & Ribeiro, B. M. (2001). Characterization of the Ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (egt) gene of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. *Virus Genes* 22, 103- 112.

Rollie J. C. & Miller, L. K. (1994). Control of Programmed Cell Death by the baculovirus genes P35 and IAP. *Mol Cell Biol* 14, 5112-5122.

Rohrmann, G.F. (2013). *Baculovirus Molecular Biology*. 3<sup>rd</sup> edition  
Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), NCBI,  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114593/>

Sieburth, P.J. & Maruniak, J.E. Growth characteristic of a continuous line from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro Cell Dev Biol* 24, 195-198.

Slack, J M; Ribeiro, B.M. & Souza, M.L. (2004). The gp64 locus of *Anticarsia gemmatilis* nucleopolyhedrovirus multicapsid nucleopolyhedrovirus contains a 3' exonuclease repair homologue and lack v-cath and ChiA genes. *J Gen Virol* 85, 11-219.

Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.