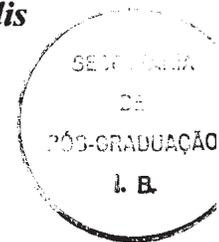


BC/27961
IB/80673

T/UNICAMP
C314

ANÁLISE COMPARATIVA DO DENSOVÍRUS DE *Diatraea saccharalis*
COM OUTROS DENSOVÍRUS



Este exemplar corresponde à redação final
da tese apresentada pelo(s) candidato(s)
Angela Cristina Cavallaro
e aprovada pela Comissão Julgadora.

19/4/96

A handwritten signature in black ink, appearing to be "AC" or similar initials, with a long horizontal stroke extending to the right.

ANGELA CRISTINA CAVALLARO

TESE APRESENTADA AO INSTITUTO DE BIOLOGIA
DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: GENÉTICA

ORIENTADOR: PROFESSOR DR. OCTAVIO HENRIQUE DE OLIVEIRA
PAVAN

CAMPINAS - SÃO PAULO

1996



UNIDADE IB
N.º CATEGORIA: 11/UNICAMP
C314a
27961
667196
P. CO R\$ 11,00
DATA 04/07/96
N.º CPD CM00089467-0

BIB:000105971

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

C314a Cavallaro, Angela Cristina
Análise comparativa do Densovirus de *Diatraea saccharalis* com outros Densovirus / Angela Cristina Cavallaro. -

Orientador: Octávio Henrique de Oliveira Pavan.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Parvovirus 2. * Densovirus. I. Pavan, Octávio .
Henrique de Oliveira. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 19 de abril de 1996

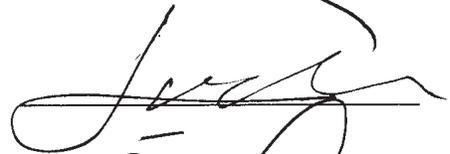
BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

PROF. DR. OCTAVIO HENRIQUE DE OLIVEIRA PAVAN



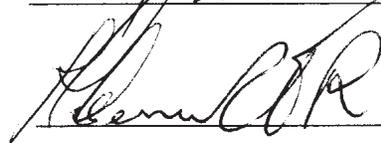
PROF. DR. JORGE VEGA



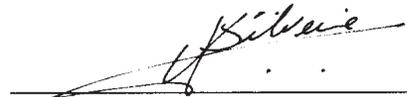
PROF. DR. TOMOMASA YANO



DR^a. HELENA CAMARÃO TELLES RIBEIRO



PROF. DR. WANDERLEI DIAS DA SILVEIRA

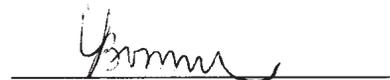


SUPLENTES:

DR^a SUZETE APARECIDA LANZA DESTEFANO



PROF. DR^a YOKO BOMURA ROSATO



APROVADA

**Ao Guerreiro e Pedro
Dedico**

À l'éternelle triple question toujours demeure sans réponse qui sommes-nous? D'où venons-nous? Où allons-nous? Je répons, en ce qui me concerne personnellement, je suis moi, je viens de chez moi et j'y retourne.

Pierre Dac

AGRADECIMENTOS / REMERCIEMENTS

Agradeço ao Prof. Dr. Octavio Henrique de Oliveira Pavan pelo apoio e incentivo que me foi dedicado nestes anos todos.

Sou também grata ao CNPq/RHAE, pelo suporte financeiro concedido, sem o qual não teria sido possível a realização da parte experimental de meu trabalho na França.

Aos Professores Doutores Tomomasa Yano, Jorge Vega e à Dra. Helena Camarão Telles Ribeiro pelo tempo dedicado no exame prévio desta tese.

Ao Professor Dr. Wanderlei Dias da Silveira, à Professora Dra. Yoko Bomura Rosato e Dra. Suzete Aparecida Lanza Destefano, pela gentileza e disposição em participar no julgamento desta tese.

Je remercie Monsieur le Professeur Max Bergoin, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Je remercie aussi mes collègues stagiaires qui m'ont très agréablement reçu.

Je remercie à tout le personnel de la Station de Recherches de Pathologie Comparée de St Christol spécialement à Xavière, Andrée, Josphine, Jean, Jackie, Monique, Claudine, Renée, Nadine, Jean-Claude pour leur amitié.

Je tiens à remercier mon cher ami Yi LI, qui m'a appris toutes les techniques en Biologie Moléculaire avec sa compétence et patience chinoise.

Pour finir avec les REMERCIEMENTS en français j'en profite pour remercier le personnel du labo de Montpellier, spécialement Charlette et François.

Je remercie aussi tous les amis que j'ai laissé en France.

Agradeço, enfim meu marido pelo apoio, paciência e confiança e minha família, particularmente meus pais pela ajuda inestimável.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Densovírus.....	3
2.1.1 Propriedades.....	3
2.1.2 Sintomas da doença.....	6
2.2 Detecção do vírus.....	9
2.3 Infecção múltipla.....	9
2.4 Gama de hospedeiro.....	10
2.5 Utilização em controle biológico.....	11
2.6 Multiplicação viral em cultura de células.....	13
2.7 Partícula viral.....	15
2.8 Composição protéica.....	16
2.9 Genoma dos DNVs.....	18
2.9.1 Propriedades.....	18
2.9.2 Organização das sequências codificadoras.....	21
2.9.3 Estrutura das extremidades.....	25
2.9.4 Replicação e transcrição do genoma viral.....	26
2.10 Clonagem do genoma de JcDNV e DsDNV.....	29
2.10.1 JcDNV.....	29
2.10.2 DsDNV.....	30
2.11 Organização do genoma viral de JcDNV.....	30
2.12 Homologia entre os Parvovírus.....	35

3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Vírus.....	37
3.2 Insetos.....	37
3.3 Plasmídeos	38
3.4 Bactérias e meio de cultura.....	38
3.5 Linhagens celulares e meios de cultura.....	39
3.6 Preparo dos inóculos para infecção de insetos e células.....	39
3.7 Inoculação de lagartas	40
3.7.1 <i>Spodoptera littoralis</i>	40
3.7.2 <i>Ephestia khuniella</i>	40
3.7.3 <i>Sesamia sp.</i>	41
3.7.4 <i>Diatraea saccharalis</i>	41
3.7.5 <i>Galleria mellonella</i>	41
3.7.6 <i>Acheta domestica</i>	41
3.8 Infecção e titulação em cultura de células.....	42
3.9 Infecção de frascos de cultura	42
3.10 Titulação da solução viral empregada para infecção de linhagens celulares e insetos.....	43
3.11 Imunofluorescência.....	43
3.12 ELISA	44
3.13 Purificação viral.....	45
3.14 Centrifugação em cloreto de cézio.....	45
3.15 Observação em microscópio eletrônico	46
3.16 Eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS	46
3.17 Western blot.....	47
3.18 Dot blot.....	47
3.19 Revelação das proteínas transferidas.....	47
3.20 Extração do DNA viral.....	48

3.21 Reações enzimáticas.....	49
3.22 Eletroforese em gel de agarose	49
3.23 Purificação do DNA.....	50
3.24 Preparo de sondas	50
3.25 Southern blot	51
3.26 Dot blot.....	52
3.27 Preparação e transformação de bactérias competentes.....	52
3.27.1 Minipreparações.....	53
3.27.2 Maxipreparações.....	54
3.28 Escolha dos clones.....	55
3.28.1 Screening X-GAL/IPTG.....	55
3.28.2 Screening por hibridação <i>in situ</i>	56
3.29 Obtenção de plasmídeos superenrolados.....	56
3.30 Digestão Exo III/Mung Bean.....	57
3.31 Obtenção e preparação dos fragmentos a serem subclonados	58
3.32 Desfosforilação.....	59
3.33 Preparo dos plasmídeos para sequenciamento.....	60
3.34 Sequenciamento.....	60
3.35 Análise das sequências de DNA.....	61
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
4.1 Purificação do DsDNV a partir de lagartas de <i>D. saccharalis</i>	62
4.2 Características gerais do DsDNV.....	64
4.2.1 Densidade do DsDNV.....	64
4.2.2 Avaliação sobre especificidade de hospedeiro.....	64
4.2.2.1 Multiplicação do DsDNV em lepidópteros.....	65
4.2.2.2 Infecção de linhagens celulares.....	66

4.3 Caracterização e analogia a nível protéico.....	67
4.3.1 Determinação da massa molecular das proteínas estruturais.....	68
4.3.2 Relações Antigênicas.....	71
4.3.2.1 Dot Blot	71
4.3.2.2 Western Blot.....	72
4.3.3 Considerações gerais sobre a comparação dos AdDNV, DsDNV, GmDNV e JcDNV a nível protéico.....	76
4.4 Caracterização e analogia a nível de DNA.....	78
4.4.1 Determinação das concentrações de DNA detectadas pelas diferentes sondas.....	78
4.4.2 Eletroforese de DNA	79
4.4.3 Southern Blot.....	80
4.4.4 Sequenciamento do DsDNV.....	83
4.4.5 Considerações gerais sobre a comparação dos AdDNV, DsDNV, GmDNV e JcDNV a nível genômico.....	86
5. CONCLUSÕES.....	109
6. RESUMO.....	111
7. SUMMARY.....	112
8. ANEXOS.....	113
9. BIBLIOGRAFIA.....	122

1. INTRODUÇÃO

Os vírus de insetos vêm sendo extensivamente estudados sob vários aspectos. Suas propriedades fundamentais, como: forma de replicação, especificidade em relação ao hospedeiro, interação com outros vírus, recombinações entre si ou com o hospedeiro, são essenciais para sua utilização como agente de controle biológico, vetor de expressão, assim como instrumento na pesquisa básica.

Vários destes vírus já são utilizados de forma prática como vetor de expressão de proteínas de interesse farmacêutico ou como bioinseticida. Salienta-se nos dois casos, o emprego dos Baculovírus, que possuem propriedades importantes que permitem a utilização em ambos, destacando-se a qualidade das proteínas obtidas. Os Baculovírus foram durante muito tempo os únicos a serem estudado largamente. Devido à sua inclusão protéica que protege os virions de agentes externos durante a fase extracelular de seu ciclo, eles são utilizados em aplicações aéreas e em grandes extensões.

Recentemente foi evidenciado o papel de pequenos vírus icosaédricos, cujo material genético é composto por DNA. Trata-se dos Densovirus da família dos Parvoviridae que apresentam propriedades notáveis. Infectam insetos de interesse agrônômico, como lepidópteros desfoliadores e outros de interesse médico como alguns dípteros, vetores de doenças e nestes podem causar epizootias naturais ou provocadas. São altamente específicos em relação à seus hospedeiros e inócuos ao homem. Devido ao seu pequeno genoma constituem-se num bom modelo para estudos de organização, modo de expressão e também de regulação gênica em sistemas celulares eucariotos. Desde a descoberta do primeiro Densovirus em lagartas de *Galleria mellonella* (MEYNADIER et al., 1964), vários outros foram relatados.

Entre os DNVs mais estudados encontram-se o Densovirus de *Junonia coenia* (JcDNV) e o Densovirus de *Galleria mellonella* (GmDNV) que apresentam grande homologia a nível genômico sem contudo serem patogênicos em hospedeiros cruzados.

O Densovirus de *Diatraea saccharalis* (DsDNV) foi pela primeira vez descrito por MEYNADIER et al. (1977) e desde então foi pouco estudado. Mais recentemente estes vírus foram encontrados em criações artificiais de lagartas de *D. saccharalis* no Laboratório de Virologia de Inseto - IB - UNICAMP por CAVALLARO et al., (1988). Amostras destes vírus foram encaminhadas ao Laboratoire de Pathologie Comparée em St-Christol-les-Alès, França, sob supervisão do Prof. Max Bergoin. E, através de um acordo foi proposto o aprofundamento no estudo deste DNV, já que esta linha de pesquisa era seguida neste laboratório. Realizou-se inicialmente o mapa genômico e a clonagem do genoma total num plasmídeo (KOUASSI, 1993). E a continuação deste estudo foram os objetivos deste trabalho de tese.

Procurou-se neste trabalho caracterizar as proteínas estruturais do DsDNV, e do Densovirus de *Acheta domestica*, comparar a massa molecular destas proteínas com as de JcDNV e GmDNV através de eletroforese e de testes serológicos, estudar a especificidade do DsDNV *in vivo* e *in vitro*, comparar a massa molecular do DNA de DsDNV com os de JcDNV, GmDNV e AdDNV, comparar estes DNAs através de Southern Blot e sequenciar parcialmente o genoma do DsDNV.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Densovirus

2.1.1 Propriedades

Os Densovirus pertencem à família Parvoviridae, que inclui ainda, dois outros gêneros, os Dependovirus ou Vírus Adeno-Associados (AAV) e os Parvovirus autônomos (Tabelas 1 e 2) (SIEGL, 1985). Eles possuem duas moléculas de DNA de fita simples, que são complementares entre si mas encapsidadas separadamente. Ambas apresentam replicação autônoma. Os virions são isométricos não envelopados, e com diâmetro de 19 a 24 nm (KURSTAK, 1972a e KAWASE, 1985). A massa molecular do DNA do Densovirus de *Galleria mellonella* quando em fita simples é da ordem de $1,9$ a $2,2 \times 10^6$ d e quando em fita dupla de $3,9$ a $4,1 \times 10^6$ Da (KAWASE, 1985).

O nome Vírus de Densonucleose foi atribuído por VAGO et al., (1966a) devido às características citológicas por estes induzidas, ou seja, hipertrofia do núcleo e acúmulo de inclusões densas, que descobriu-se mais tarde serem os virions. Posteriormente o nome foi alterado, tornando-se Densovirus (DNV) (KAWASE, 1985).

O primeiro DNV descrito, foi isolado em lagartas de *Galleria mellonella* (Pyrilidae) por MEYNADIER et al., (1964), sendo outros encontrados posteriormente nas seguintes ordens: Lepidoptera, Diptera, Orthoptera, Odonata e Decapoda (Crustáceos) (KAWASE et al., 1990) (Tabela 3).

Os DNVs são classificados de acordo com a espécie da qual foram isolados, assim refere-se ao Densovirus de *G. mellonella* por GmDNV (iniciais em inglês). Ainda hoje a nomenclatura é baseada na espécie na qual foi isolado e, se existem mais que um tipo isolado

na mesma espécie, estes são identificados por um número, por exemplo Densovirus de *Bombyx mori*, BmDNV tipo 1, 2, 3 etc (SIEGL, 1985).

TABELA 1 - Relação de alguns dos principais Parvovirus Autônomos e seus hospedeiros naturais.

Parvovirus autônomos	Hospedeiros
B19 (Human parvovirus)	Homem
Lu III (Human parvovirus Lu III)	
H-1 (Human tumor HEp-1 vírus)	
BPV (Bovine parvovirus)	Boi
PPV (Porcine parvovirus)	Porco
KRV (Kilham rat vírus)	Roedores
MVM (Minute vírus of mice)	
CPV (Canine parvovirus)	Carnívoros
FPV (Feline parvovirus)	
MEV (Mink enteritis vírus)	
ADV (Aleutian disease vírus)	

TABELA 2 - Relação de alguns dos principais Vírus Adenoassociados (AAV) e seus respectivos hospedeiros.

Vírus Adeno-associados	Hospedeiros
AAV1	Homem
AAV2	
AAV3	
AAV4	Macaco
AAV Equino	Cavalo
BAAV	Boi
CAAV	Cachorro

TABELA 3 - Ordens e espécies de insetos das quais foram isolados os principais Densovírus

ORDEM	ESPÉCIES	REFERÊNCIAS
LEPIDOPTERA	<i>Galleria mellonella</i>	MEYNADIER et al., 1964
	<i>Junonia coenia</i>	RIVERS & LONGORTH, 1972
	<i>Sibine fusca</i>	MEYNADIER et al., 1977a
	<i>Diatraea saccharalis</i>	MEYNADIER et al., 1977b
	<i>Bombyx mori</i> (DNV-1)	SHIMIZU, 1975
	<i>Bombyx mori</i> (DNV-2)	MAEDA et al., 1982
	<i>Bombyx mori</i> (DNV-3)	LI-REN et al., 1982
	<i>Agraulis vanillae</i>	KELLY et al., 1980
	<i>Pieris rapae</i>	SUN et al., 1981
	<i>Lymantria dispar</i> *	GRIGNON, 1982
	<i>Pseudoplusia includens</i>	CHAO et al., 1985
<i>Casphalia extranea</i>	FÉDIÈRE et al., 1981	
<i>Euxoa auxiliaris</i>	SUTTER, 1973	
DIPTERA	<i>Aedes aegypti</i>	LEBEDEVA et al., 1973
	<i>Simulium vittatum</i>	FEDERICI, 1976
	<i>Aedes pseudocutelarisi</i> *	GORZIGLIA et al., 1980
ORTOPTERA	<i>Acheta domestica</i>	MEYNADIER et al., 1977c
DICTYOPTERA	<i>Periplaneta fuliginosa</i>	SUTO et al., 1979
ODONATA	<i>Leucorrhinia dubia</i>	CHARPENTIER, 1979
DECAPODA	<i>Penaeus merguensis</i>	LIGHTNER & REDMAN, 1985
	<i>P. semisulcatus</i>	LIGHTNER & REDMAN, 1985
	<i>P. orientalis</i>	LIGHTNER & REDMAN, 1985
	<i>P. monodon</i>	LIGHTNER & REDMAN, 1985
	<i>Carcinus mediterraneus</i>	MARI & BONAMI, 1988
	<i>Macrobrachium rosebergii</i>	ANDERSON et al., 1990

* isolado em linhagens celulares

O JcDNV foi descrito em 1972 por RIVERS & LONGWORTH. Eles descobriram o vírus por acaso quando tentavam infectar lagartas de *Aglais urticae* (Nymphalidae) com amostras de vírus de granulose isolados em *Junonia coenia* (Nymphalidae).

Devido a ausência de normas gerais de classificação comumente são cometidos erros taxonômicos, pois novos isolados são referidos como novas espécies se estes apresentam espectro diferente de hospedeiro e/ou um novo tropismo de tecido. Não existem testes serológicos padronizados para determinar a relação antigênica entre os DNVs (SIEGL, 1985). São necessárias novas bases de classificação dos DNVs estruturadas nas características de seus respectivos genomas. Atualmente são conhecidos dois grupos de DNVs, distinguidos por suas estratégias de replicação e expressão dos genes (TIJSSEN et al., 1990).

Os DNVs são restritos à subclasse Pterygota da classe Insecta, mas fazem parte da família Parvoviridae. Entre os Parvovirus estão os Adeno-Associados que são em certos casos persistentes e infectam vertebrados (BELLONCIK, 1990). Apesar disto, não foi descrito casos de interação dos DNVs com células de vertebrados.

2.1.2 Sintomas da doença

Sabe-se que os densovirus causam uma doença letal nos insetos e que apresentam uma alta especificidade em relação ao hospedeiro. A morte do inseto pode ocorrer de 2 a 20 dias após a infecção. Os primeiros sintomas são anorexia, letargia, seguido de flacidez e inibição da muda e da metamorfose. São também observadas lagartas não viáveis e pupas aberrantes (KAWASE et al., 1990).

A maioria dos DNVs apresentam politropismo tissular como os de *D. saccharalis*, *A. aegypti*, *G. mellonella*, *C. extranea* e *P. includens*. A infecção é observada em células do

tecido gorduroso, onde as células apresentam o núcleo hipertrofiado e são Feulgen positivas. O vírus pode ser observado em outros tecidos tais como, hipoderme, células peritraqueais, hemócitos, glândulas da seda, túbulos de Malpighi, gônadas, epitélio do intestino anterior e posterior e músculos (AMARGIER et al, 1965; BERGOIN & BRES, 1968 e CHAO et al., 1985). Outros DNVs, como aqueles de *B. mori*, *S. fusca*, *E. auxiliaris* e *P. fuliginosa*, infectam somente células do intestino médio (SHIMIZU, 1975; AMARGIER et al., 1979; SUTO et al., 1979; KAWASE, 1985 e KAWASE et al., 1990). Alguns DNVs provocam a proliferação das células intestinais aparentando-se à tumores. Essas massas tumorais foram descritas no intestino médio de *S. fusca* e *C. extranea* (MEYNADIER et al, 1977a e FÉDIÈRE, 1983) e também, no intestino posterior de *P. fuliginosa* (SUTO et al., 1979).

Em *G. mellonella* os primeiros sintomas são letargia, seguida de paralisia progressiva e melanização dos tecidos (KAWASE et al., 1990). As lagartas começam a morrer a partir de 4 a 5 dias após a infecção, quando os tecidos são destruídos (AMARGIER et al., 1965). O núcleo das células infectadas hipertrofia-se rapidamente tornando-se eosinófilo. São também observados os corpos densos ou virions.

A sintomatologia está em muitos casos relacionada ao estágio de desenvolvimento larval em que o vírus foi inoculado. Lagartas de *G. mellonella* inoculadas com uma alta concentração do vírus no último estágio, tem o desenvolvimento bloqueado no estágio de pré-pupa. As lagartas do mesmo estágio inoculadas com baixa concentração viral transformam-se em pupas, mas os órgãos imaginais são afetados (KAWASE et al., 1990).

As lagartas de *D. saccharalis* infectadas pelo DNV começam a morrer 15 dias após a infecção pois, os DNVs se manifestam de uma forma mais lenta que o descrito para *G. mellonella* (MEYNADIER et al., 1977b). Os sintomas externos provocados pela doença não são tão claros como os observados em *A. vanillae*, *C. extranea* e *P. fuliginosa* (KAWASE et

al., 1990), mas no final da evolução da doença pode-se observar modificação na coloração e paralisia (MEYNADIER et al., 1977b).

Em espécies em que o DNV só se multiplica em células do intestino, como *B. mori*, a flacidez após 7 dias é o sinal mais nítido da infecção quando estas são infectadas *per os* com o BmDNV-1 (KAWASE et al., 1990). As células colunares do intestino se hipertrofiam e reagem com o reativo de Feulgen, se degeneram e os vírus são liberados na cavidade do intestino médio (KAWASE & KURSTAK, 1991).

Para o BmDNV- 2 e 3, os núcleos infectados no último estágio da infecção são duas vezes maiores que os normais. O aumento do núcleo ocasiona danos no citoplasma, causando rompimento da membrana e conseqüente liberação do vírus na cavidade do intestino (KAWASE & KURSTAK, 1991).

As primeiras modificações ultraestruturais são observadas no núcleo de 6 a 12 h após a infecção. Pode-se notar a hipertrofia do nucléolo onde os componentes fibrilares e granulares se separam. Um estroma virogênico denso aos elétrons se forma no centro do núcleo. O nucléolo e a cromatina são empurrados para a periferia do núcleo e 4 a 5 dias após a infecção, o estroma virogênico ocupa totalmente o núcleo. O núcleo fica hipertrofiado, enquanto que no interior do estroma os virions se individualizam e se agrupam em pequenas ilhas. Em estágio avançado da infecção, a hipertrofia do núcleo é tanta, que o citoplasma fica reduzido a uma fina camada na superfície da célula. A membrana nuclear termina por se romper liberando os virions no citoplasma. (VAGO et al., 1966a; MEYNADIER et al., 1977a e GARZON e KURSTAK, 1976). Acumulações citoplasmáticas do vírus em estruturas paracristalinas foram descritas em células de *S. littoralis*, com grande acúmulo de partículas virais de JcDNV (DIALLO, 1978). O mesmo foi observado em *A. aegypti*, *L. dubia* e linhagens celulares de *A.*

pseudocutelar e *L. dispar* infectadas cronicamente (BUCHATSKY & RAIKOVA, 1987; CHARPENTIER, 1979; GORZIGLIA et al., 1980 e GRIGNON, 1982).

2.2 Detecção do vírus

Na ausência de sintomas externos típicos da doença provocada pelo DNV é necessário o emprego de testes bioquímicos simples para constatação da presença do vírus. Assim utilizando-se a hemolinfa de uma lagarta supostamente infectada em testes ELISA, eletroforese de DNA ou proteínas podemos constatar a presença viral por padrões típicos nas eletroforeses e a detecção em baixas concentrações (nanogramas-ng) nos imunoenaios (TIJSSEN et al., 1990). Com a hemolinfa pode-se também confeccionar telas em contraste negativo para observação em microscópio eletrônico.

Em cultura de células a presença do vírus é detectada através de imunofluorescência (LI et al., 1990; FÉDIÈRE et al., 1990 e GIRAUD, 1991). Estes testes podem também ser utilizados *in vivo* (TIJSSEN et al., 1990; KURSTAK et al., 1968; SATO & INOUE, 1978 e MAEDA & WATANABE, 1970). A autoradiografia também foi utilizada para estudo da síntese nucléica (KURSTAK, 1972a). Atualmente pode-se utilizar a técnica de dot blot para uma confirmação rápida e segura da presença do vírus (JOUSSET, comunicação pessoal).

2.3 Infecção múltipla

Quando a inoculação do GmDNV foi precedida pelo menos 16 h da inoculação de um vírus de Poliedrose Nuclear (NPV) em lagartas de *G. mellonella* observou-se uma inibição na entrada do segundo vírus inoculado em células do tecido gorduroso. (KURSTAK &

GARZON, 1975 e ODIER, 1975). Ao contrário, as glândulas de seda que não são susceptíveis ao NPV, desenvolvem sintomas típicos de infecção por DNV. Quando as inoculações do DNV e NPV foram realizadas simultaneamente, sinais da infecção por DNV aparecem em todas as células. ODIER (1975) observou os dois vírus em diferentes estágios de desenvolvimento no núcleo de uma mesma célula, e que a inoculação inicial com o DNV impediu o desenvolvimento do NPV. KURSTAK & GARZON (1975) também observaram numa mesma célula o vírus iridescente de *Tipula* e o DNV sem que ocorresse antagonismo.

A modificação de tropismo de tecido foi observada quando ocorreu infecção múltipla. Em lagartas de *S. littoralis* infectadas com JcDNV, raramente pode-se observar o vírus em células do tecido gorduroso. Quando ocorre a coinfeção com baculovírus, o tropismo do DNV por este tecido aumenta e as células são infectadas pelos dois vírus (KAWASE et al., 1990).

2.4 Gama de hospedeiros

A especificidade dos DNVs varia de um vírus a outro mas parece estar restrita à uma mesma ordem (BELLONCIK, 1990), ou seja, um DNV isolado em lepidóptero pode vir a infectar outro lepidóptero, mas certamente não um díptero. Assim, o GmDNV é restrito ao inseto no qual ele foi isolado, o mesmo acontecendo com o AdDNV e CeDNV. Ao contrário, o JcDNV, muito semelhante ao GmDNV, infecta várias outras espécies como *Mamestra brassicae* (Noctuidae), *S. exigua*, *S. littoralis* (Noctuidae), *B. mori* (Bombylidae), *L. dispar* (Lymantridae), *Aglais urticae* (Nymphalidae), mas não infecta *G. mellonella* (GIRAN, 1966; FÉDIÈRE et al., 1990; JOUSSET et al., 1986; RIVERS & LONGWORTH, 1972 e KAWASE & KURSTAK, 1991).

Uma grande variação na gama de hospedeiros é também encontrada para *Aedes* DNV que infecta diferentes espécies de mosquitos como: *A. vexans*, *A. geniculatus*, *A. caspius dorsalis*, *A. cantans*, *A. albopictus*, *Culex pipiens pipiens*, *C. pipiens molestus* e *Culiseta anulata*. Assim como o *P. fuliginosa* DNV que infecta adultos de *P. austrasiae* e *P. brunnaea* e ninfas de *P. japonica*. Já os adultos de *P. americana* são menos susceptíveis a este vírus (KAWASE & KURSTAK, 1991).

Segundo KURSTAK (1972a) o pequeno genoma dos DNVs poderia explicar sua considerável especificidade, uma vez que estes dependem do sistema celular do hospedeiro.

A interação DNV/mamíferos tem sido pouco estudada e são escassas as informações a respeito de sua patogenicidade. A inoculação de GmDNV em camundongos e coelhos parece ser inócua (GIRAN, 1966). O mesmo ocorre para o JcDNV e AaDNV quando inoculados nestes mesmos animais para obtenção de anti-soro (JOURDAN et al., 1990). A infecção de ratos com DNV foi também infrutífera (KURSTAK et al., 1977).

Em relação ao homem não foi realizado nenhum experimento, porém não se tem notícias de acidentes causados por estes vírus em laboratórios de pesquisa.

2.5 Utilização em controle biológico

Grande parte das pesquisas realizadas até hoje investigou os seguintes vírus para controle biológico de insetos: Vírus de Poliedrose Nuclear (NPV), Vírus de Granulose (GV) e Vírus de Poliedrose Citoplasmática (CPV). Todos eles possuem proteção contra a degradação no meio ambiente. A utilização de vírus não inclusos como inseticida biológico, depende principalmente da natureza do problema a ser resolvido, do inseto a ser controlado e

sobretudo, do vírus a ser empregado. Entretanto, experimentos com dispersão de DNVs no ambiente têm revelado uma alta porcentagem de mortalidade dos insetos no campo. A população de uma importante praga de palmeiras oleaginosas, *C. extranea*, foi controlada a nível de 92 % após duas semanas de aplicação do CeDNV (FÉDIÈRE et al., 1986). A utilização do DNV de *Sibine fusca*, também praga de palmeiras, induziu uma mortalidade de 94 a 97 % da população de insetos, quinze dias após a aplicação. A mortalidade chegou a 100 % após um mês (BELLONCIK, 1990).

A interação destes vírus com outros entomopatógenos como: baculovírus, CPV e *Bacillus thuringiensis*, assim como sua relação com inseticidas químicos, vem sendo estudada como possibilidade da sua utilização como controle integrado (BELLONCIK, 1990).

Como dito anteriormente pouco é conhecido sobre a interação destes vírus com células de vertebrados. Pesquisas sobre esta interação e sobre a indução de multiplicação de vírus latentes se fazem necessárias antes de sua utilização em controle biológico. Estudos básicos sobre eles, assim como vírus a manipulação genética podem tornar seu emprego mais seguro.

Outro aspecto a ser analisado no estudo dos DNVs a serem utilizados em controle biológico é sua disseminação sob forma epizootica (BELLONCIK, 1990). WATANABE & SHIMIZU (1980) concluíram que uma epizootia causada pelo vírus em fazendas de sericicultura no Japão foram devidas a dois fatores: 1) criação de insetos susceptíveis ao BmDNV-1 e, 2) transmissão por um inseto parasita.

A transmissão horizontal do vírus pode ocorrer se existe canibalismo na população a ser controlada. A formação de células tumorais no intestino pode levar a exteriorização do vírus no ambiente. Ainda existem parasitas que tem papel importante na disseminação do

vírus (KURSTAK & VAGO, 1967). Estes dados podem ser considerados a fim de aumentar a eficiência do controle.

2.6 Multiplicação viral em cultura de células

O estabelecimento de linhagens celulares permissivas aos DNVs é recente, mas as primeiras tentativas neste sentido foram realizadas na mesma época em que estes começaram a ser descritos e caracterizados (MIALHE et al., 1984; FÉDIÈRE et al., 1990 e LI et al., 1990).

VAGO et al. (1966b) infectaram culturas primárias de células ovarianas de *B. mori* com o GmDNV. Posteriormente foi observado o desenvolvimento do GmDNV em ovários, glândulas de seda e tecido gorduroso de lagartas de *G. mellonella* mantidas em culturas organotípicas (QUIOT et al., 1970). Foi também relatado que o BmDNV multiplicou-se em cultura de células de embrião de linhagens susceptíveis ao bicho da seda, mas não em linhagens resistentes (KAWASE, 1985).

As primeiras linhagens celulares que se apresentaram permissivas ao GmDNV e JcDNV foram obtidas por MIALHE et al. (1984) a partir de ovariolos de crisálidas de *S. littoralis*. FÉDIÈRE et al. (1990) verificaram que a linhagem celular SPC Bm 40 de *B. mori* é permissível ao CeDNV. LI et al. (1990) utilizaram as linhagens SPC-SL 52 (MIALHE et al., 1984) e SPC-PL 65 que se mostraram susceptíveis à infecção e transfecção pelo JcDNV.

Deve-se salientar a constatação de uma linhagem celular de *L. dispar* (SCLd 135) infectada cronicamente LdDNV (QUIOT et al., 1976 e GRIGNON, 1982). O aparecimento do vírus foi constatado após um estresse para cultura celular (JOUSSET, dados não

publicados). Estes dados sugerem a integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira. Esta hipótese foi mais tarde demonstrada por ROLLING (1992), após a transfecção de linhagens celulares com um plasmídeo contendo o genoma viral inteiro de JcDENV. Este autor construiu dois vetores para exprimir o gene da resistência à neomicina, derivados do genoma de JcDENV clonado no plasmídeo pBr322. O gene da resistência à neomicina foi inserido sob o controle do promotor dos genes de proteínas do capsídeo. Um deles apresentando os genes não estruturais intactos e o outro com estes genes deletados, mas conservando sempre suas sequências terminais invertidas repetidas (ITR). Ele observou que quando os genes não estruturais estão presentes, o genoma viral se integra no DNA celular em uma só cópia e num sítio diferente para cada clone analisado, sugerindo um mecanismo de integração não específico. Quando os genes não estruturais estão ausentes o plasmídeo recombinante persiste sob a forma de um replicon autônomo dentro das células transfectadas, sem se integrar.

O estabelecimento de técnicas de transfecção de linhagens celulares foi realizada por LI et al., 1990 com enorme sucesso. Utilizando-se esta técnica pode-se estudar vários fatores relacionados ao DENV, como: integração no sistema celular do hospedeiro, infecciosidade das partículas virais produzidas, estudos sobre a transcrição e tradução (GIRAUD, 1991; ROLLING, 1992; LI, 1993; BOUBLIK, 1993 e KOUASSI, 1993).

As linhagens descritas mostraram-se permissivas a alguns DENVs assim, para cada DENV estudado deve-se testar as linhagens disponíveis ou até mesmo estabelecê-las. Aparentemente a especificidade *in vitro* não é a mesma que *in vivo*, pois, o GmDENV que não se multiplica em outros insetos mostrou-se infeccioso para células ovarianas de *B. mori* (KURSTAK et al., 1977 e VAGO et al., 1966b).

Embora a descoberta destas linhagens tenha permitido um enorme progresso no estudo dos DNVs é necessário otimizar esta técnica visando minorar problemas, como o decréscimo da titulação do vírus no decorrer de sucessivas passagens (LI et al., 1990).

KURSTAK et al. (1969a, b) demonstraram a oncogenicidade dos DNVs infectando células L de camundongos com GmDNV. Eles observaram a transformação, a produção de vírus pelas células de camundongo e a patogenicidade destes vírus em lagartas de *G. mellonella*. Os mesmos resultados foram observados em células de embrião de rato (KURSTAK & ONJI, 1972). Outros pesquisadores tentaram infectar células de vertebrados e invertebrados sem sucesso (LONGWORTH, 1978). Posteriormente observou-se que a linhagem celular VERO pode ser infectada com *P. rapae* DNV (HO et al., 1985).

Apesar destes trabalhos constatando o poder de transformação destes vírus em relação à células de mamíferos, as pesquisas não foram prosseguidas e até hoje nenhum outro trabalho confirmou estes dados.

2.7 Partícula viral

Os DNVs possuem partículas esféricas, sem envelope de 19 a 24 nm de diâmetro e são compostos de 65 % de proteínas e 35 % de DNA (KURSTAK, 1972a; KAWASE, 1985 e MATHEWS, 1982). Não possuem fração glicídica nem lipídica (SUTO et al., 1979). A densidade das partículas varia entre 1,39 e 1,45 g/ml em CsCl, com massa molecular entre 5,5 e $6,2 \times 10^6$ d e com coeficiente de sedimentação em gradiente de sacarose situado entre 117-119 S para partículas completas ou cheias e 59-60 S para partículas vazias (LONGWORTH et al., 1968; TRUFFAUT et al., 1967; MATHEWS, 1982 e SIEGL, 1985). As partículas ocas apresentam densidade de 1,31 g/ml (SIEGL, 1985).

O capsídeo é formado por 12 capsômeros e apresenta uma estrutura icosaédrica. Cada capsômero é constituído de agregados pentaméricos da menor proteína sintetizada (VP4), porém sintetizada em maior quantidade (TIJSSEN & KURSTAK, 1979a; KURSTAK et al., 1977 e NAKAGAKI & KAWASE, 1982).

Associados aos JcDNV, GmDNV e PfDNV foram observadas partículas de 7 a 9 nm, sem DNA e não se conhece até o momento a sua função (KURSTAK & COTE, 1968; DIALLO, 1978 e SUTO et al., 1979).

Ainda fazem parte da composição de alguns DNVs poliaminas como: espermina, espermidina e putrescina que são associadas ao DNA viral e são provavelmente responsáveis por sua carga negativa (KELLY & ELLIOT, 1977 e BANDO et al., 1983).

Os virions são estáveis em pH ácidos, resistentes a vários solventes orgânicos como éter, clorofórmio e também a temperaturas entre 56 e 65°C (BOEMARE et al., 1970 e SUTO et al., 1979) e são inativados por irradiação UV (SIEGL, 1985).

2.8 Composição protéica

Todos os DNVs até hoje estudados apresentam quatro proteínas estruturais (VP1, VP2, VP3 e VP4) com massa molecular variando de 42 a 110 KDa (Tabela 4). Na maioria dos casos a VP4 que apresenta a menor massa molecular aparece em maior concentração (CHAO et al., 1985; NAKAGAKI & KAWASE, 1980; TIJSSEN & KURSTAK, 1979a, b e KELLY et al., 1980). Variações na massa molecular das proteínas observadas para um mesmo DNV são provavelmente associadas às diferentes técnicas empregadas para avaliação e também às diferentes proveniências ou fontes do vírus.

Diferentemente dos DNVs, os Parvovirus Autônomos e AAVs possuem 3 proteínas estruturais, com massa molecular variando entre 40 e 96 KDa. A VP3 é a presente em maior concentração, representando 80-85 % da massa total de proteínas, sendo a concentração de VP1 e VP2 muito variáveis. A sequência de VP1 contém a sequência de VP2 e VP3 (appud BOUBLIK, 1993).

Segundo TIJSSEN et al. (1982) as proporções relativas de uma mesma proteína como VP4 variam segundo o estágio de desenvolvimento larval, sugerindo a hipótese de uma variação na síntese e do mecanismo de maturação da proteína durante o desenvolvimento.

Segundo FÉDIÈRE (1983) as concentrações de VP1, VP2, VP3 e VP4 em JcDNV são 14, 26, 21 e 39 % respectivamente, mas parecem variar de um isolado a outro uma vez que KELLY et al. (1980) encontraram 11, 28, 22 e 37 % para GmDNV e 15, 22, 24 e 38% para as mesmas proteínas de JcDNV.

Quanto à composição protéica dos DNVs existem duas exceções, uma para o *Aedes* DNV, que possui somente dois polipeptídeos de 40 e 38 KDa e outra para o *A. albopictus* Parvovirus (AaPV) que possui 3 proteínas de 53, 41 e 40 KDa (AFANASIEV et al., 1991 e JOUSSET et al., 1993). Esses vírus cujo genoma é menor que dos DNVs clássicos devem constituir um novo grupo de Parvovirus de invertebrados (BOUBLIK, 1993).

A soma dos pesos moleculares das proteínas estruturais (270 KDa) ultrapassa a capacidade codificadora do genoma (170 KDa), sugerindo que as proteínas estruturais são obtidas através de genes superpostos (KELLY et al., 1980). Vários dados corroboraram esta hipótese.

As primeiras indicações que os quatro polipeptídeos apresentavam sequências comuns foram observadas por TIJSSEN & KURSTAK (1979b) através do mapa peptídico das proteínas do GmDNV. Estes mesmos pesquisadores observaram que as quatro proteínas estruturais tinham determinantes antigênicos comuns e que VP1 apresentava sequências únicas. Posteriormente outros pesquisadores utilizando as mesmas técnicas observaram resultados semelhantes para o BmDNV, GmDNV e JcDNV (BANDO et al., 1984 e MOORE & KELLY, 1980).

Recentemente, pode-se obter os mesmos resultados *in vitro* inserindo-se em pontos do genoma viral o gene procarioto lac Z, obtendo-se proteínas quimericas VP2-βgal, VP3-βgal e VP4-βgal. A proteína VP1-βgal não pode ser detectada por ser pouco expressada (GIRAUD, 1991).

2.9 Genoma dos DNVs

2.9.1 Propriedades

A constatação de que o material genético dos DNVs era composto por DNA foi feita pela primeira vez em 1967 por TRUFFAUT et al. Eles observaram DNAs bicatenários com massa molecular de $3,9 \times 10^6$ Da. Entretanto, esta massa molecular era incompatível com o tamanho do virion. Posteriormente outros pesquisadores concluíram que dentro do capsídeo encontravam-se DNAs de fita simples e que a forte concentração iônica utilizada no procedimento de extração juntava as fitas complementares tornando-o dupla fita (BARWISE & WALKER, 1970 e KURSTAK, 1972a). Este resultado levou à conclusão que, assim como para os vírus Adeno-Associados (AAV), as fitas (+) e (-) dos DNAs dos DNVs são

encapsidadas de forma equimolar (BERNS & ROSE, 1970; KURSTAK et al.; 1971 e KELLY et al., 1977). Já os Parvovirus Autônomos encapsidam preferencialmente fitas de polaridade negativa (BERNS & ADLER, 1972). A molécula de DNA representa 1/3 da massa total do virion (TRUFFAUT et al., 1967; KELLY et al., 1977; NAKAGAKI & KAWASE, 1980; SUTO et al., 1979; MEYNADIER et al., 1977c e CHAO et al., 1985).

Diferentes métodos como, microscopia eletrônica, constante de sedimentação em ultracentrifugação analítica e eletroforese em gel de agarose foram utilizados para calcular a massa molecular do DNA do BmDNV, GmDNV, CeDNV, JcDNV. Eles possuem de 5 a 6 Kb e respectivamente $3,4 \times 10^6$, $3,9 \times 10^6$, $3,9 \times 10^6$ e $4,1 \times 10^6$ Da, quando em fita dupla (KAWASE & KURSTAK, 1991; FÉDIÈRE, 1983; TRUFFAUT et al., 1967; KELLY et al., 1980 e JOUSSET et al., 1986). O *Aedes* DNV apresenta 4 kb e, diferentemente dos outros DNVs 85 % das moléculas de DNA encapsidadas são de polaridade negativa (AFANASIEV et al., 1991).

A observação destes DNAs em microscópio eletrônico levou a conclusão de que eles possuem extremidades coesivas. Foram verificadas moléculas circulares monocatenárias, concatâmeros bicatenários e algumas moléculas com tamanhos não compatíveis com sua massa molecular (KELLY & BUD, 1978 e KAWASE & KURSTAK, 1991). A presença de moléculas circulares monocatenárias com uma protusão (panhandle) sugere a existência de sequências terminais invertidas repetidas (ITRs) (CHAO et al., 1985; BANDO et al., 1990 e KAWASE & KURSTAK, 1991). Essas sequências representam 6-7% do genoma e correspondem a aproximadamente 440 pb em *Pseudoplusia includens* DNV (CHAO et al., 1985).

TABELA 4 - Massa Molecular (Da) das proteínas estruturais (VP) de diferentes Densovirus.

DNV	VP1	VP2	VP3	VP4	REFERÊNCIAS
<i>G. mellonella</i> *	98000	69000	58500	49000	TIJSSEN et al., 1976
<i>G. mellonella</i>	92000	67000	58500	49000	TIJSSEN et al., 1982
<i>G. mellonella</i>	107300	70900	61100	42600	KELLY et al., 1980
<i>J. coenia</i> *	109600	70800	58700	41900	KELLY et al., 1980
<i>J. coenia</i>	101000	68000	58000	49000	FÉDIÈRE, 1983
<i>B. mori</i>	77000	70000	57000	50000	NAGAKAKI & KAWASE, 1980
<i>C. extranea</i>	82000	74000	54000	49000	FÉDIÈRE, 1983
<i>A. pseudocutelarlis</i>	100000	75000	70000	52000	GORZIGLIA et al., 1980
<i>P. includens</i>	87000	64000	54000	46500	CHAO et al., 1985
<i>L. dispar</i>	74000	59000	48000	29000	GRIGNON, 1982
<i>A. vanillae</i>	11000	72000	82000	43000	KELLY et al., 1980
<i>C. mediterraneus</i>	84000	80000	42000	26000	MARI & BONAMI, 1988

*Pode-se observar variações para um mesmo DNV.

Com relação a infecciosidade destes DNAs em insetos susceptíveis verificou-se que, lagartas de *G. mellonella* e *S. littoralis* desenvolveram a doença quando foram infectadas com o DNA de fita dupla. O poder infeccioso do DNA também foi evidenciado em linhagens celulares permissivas transfectadas com DNA de CeDENV e JcDENV (FÉDIÈRE, 1983). Ao contrário, insetos de *Acheta domestica* infectados com o DNA de AdDENV não desenvolveram a doença (JOUSSET et al., 1986).

Apesar do grande número de DNVs relatados na literatura, poucos tiveram seus genomas clonados e sequenciados. Atualmente conhece-se a sequência dos genomas dos densovirus de *Bombyx mori* (BANDO et al., 1987a, b, 1990) de *Galleria mellonella* (TIJSSEN et al., 1990), *Aedes aegypti* (AFANASIEV et al., 1991 e *Junonia coenia* (DUMAS et al., 1992, BERGOIN et al., 1989; JOURDAN et al., 1990, DUMAS et al., 1992) e *P. includens* (TIJSSEN & BERGERON, 1993). Recentemente foi também clonado o genoma do densovirus de *Diatraea sachtaralis* (KOUASSI, 1993).

2.9.2 Organização das sequências codificadoras

Entre os genomas de DNVs sequenciados existem dois grupos distintos em relação ao quadro aberto de leitura (Open reading frame) (Figura 1). O primeiro grupo é constituído por genomas, cuja organização destes quadros é semelhante à dos Parvovirus de vertebrados com dois grandes quadros de leitura (Right e Left ORF) na mesma fita (Figura 1d). O BmDENV e AaDENV fazem parte deste grupo. Apesar desta semelhança, o que os diferencia dos Parvovirus de vertebrados é a presença de um terceiro quadro de leitura menor (ORF 3 ou Minus ORF), situado na fita complementar (BANDO et al., 1987a, b; 1990 e AFANASIEV et al., 1991, 1994).

As proteínas não estruturais são codificadas pelo quadro de leitura situado na extremidade 5' (ORF 1 ou Left ORF), enquanto que o quadro seguinte, situado na extremidade 3' codifica para as proteínas estruturais (ORF 2 ou Right ORF). No caso de AaDNV, os dois ORFs se superpõem e um quadro de leitura menor suplementar situa-se na extremidade 5' do genoma (Mid ORF) que codificaria proteínas não estruturais. (BANDO et al., 1987a, b; 1990 e AFANASIEV et al., 1991, 1994).

O segundo grupo foi revelado com a clonagem e sequenciamento do JcDNV mostrando uma organização diferente da descrita acima, ou seja, única na família dos Parvovirus. O JcDNV juntamente com GmDNV e PiDNV formam o segundo grupo quanto a organização dos quadros de leitura (DUMAS et al., 1992; TIJSSEN, 1990 e TIJSSEN & BERGERON, 1993). No JcDNV um quadro de leitura maior (ORF 1) situa-se na extremidade 5' de uma das fitas e os três outros (ORF 2, 3 e 4) encontram-se na extremidade 5' da fita complementar (Figura 2). Demonstrou-se também que ORF 1 é responsável pela síntese das quatro proteínas estruturais. Os quadros de leitura da fita complementar codificam as proteínas não estruturais envolvidas na replicação. A constatação de que as duas fitas são codificadoras confunde o conceito de fita (+) e (-). Se considerarmos que o ORF 1 situa-se na fita (+) o vírus não poderá se multiplicar na ausência dos genes não estruturais (JOURDAN et al., 1990). No caso do GmDNV existe um quadro de leitura que codifica as proteínas não estruturais localizado na extremidade esquerda e um segundo localizado na fita complementar na extremidade direita que codifica as proteínas estruturais (TIJSSEN, 1990; TIJSSEN & BERGERON, 1993; CHEJANOVSKY & TAL, 1992 e TAL & ATTATHOM, 1993).

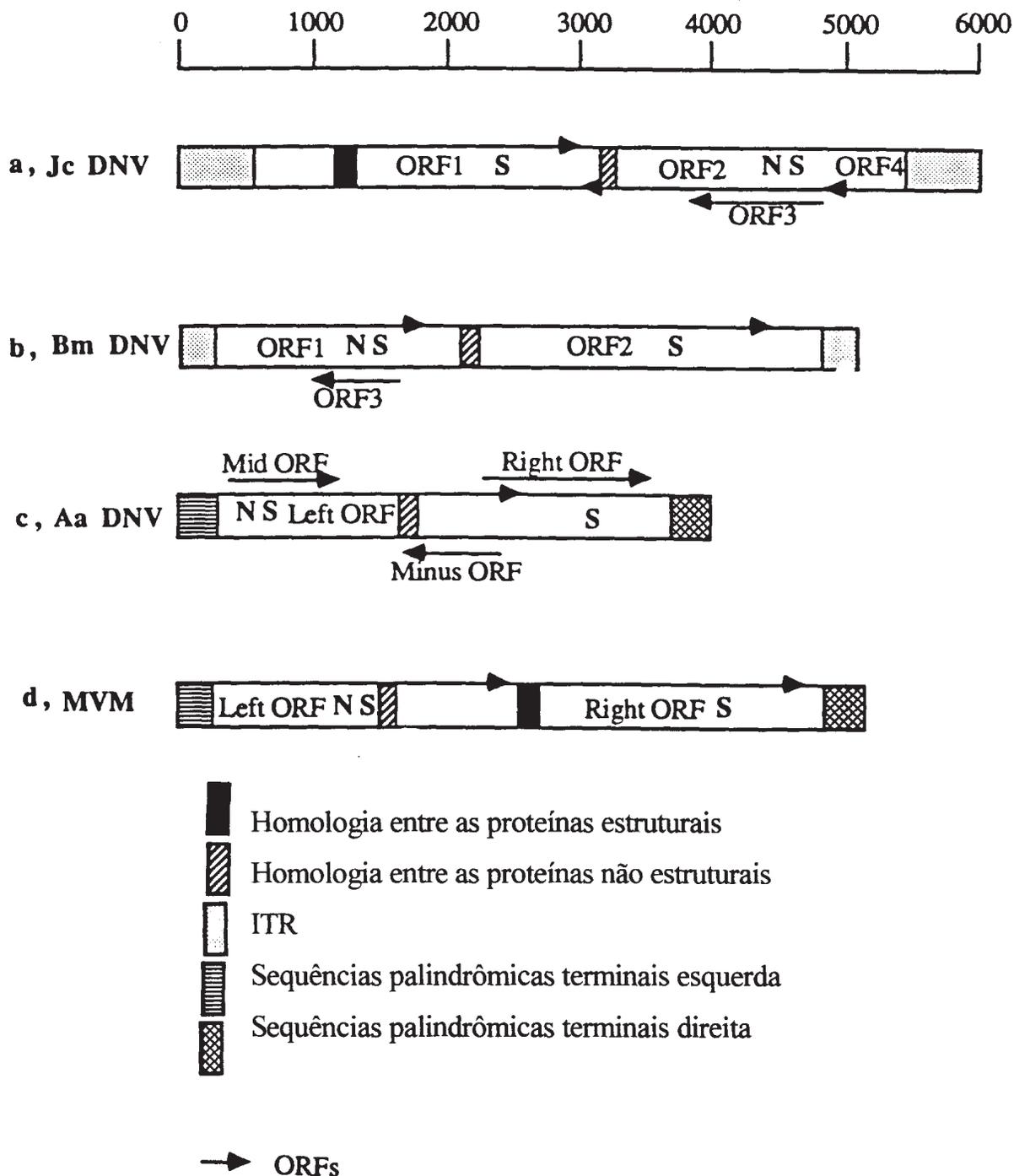


FIGURA 1 - Organização genômica de JcDNV (DUMAS et al., 1992), BmDNV (BANDO et al., 1990), AaDNV (AFANASIEV et al., 1991) e do Parvovírus de vertebrados MVM (SHADE et al., 1986). ITR - Sequência terminal invertida repetida; NS - Proteína não estrutural; S - Proteína estrutural; ORF - Quadro de leitura (open reading frame).

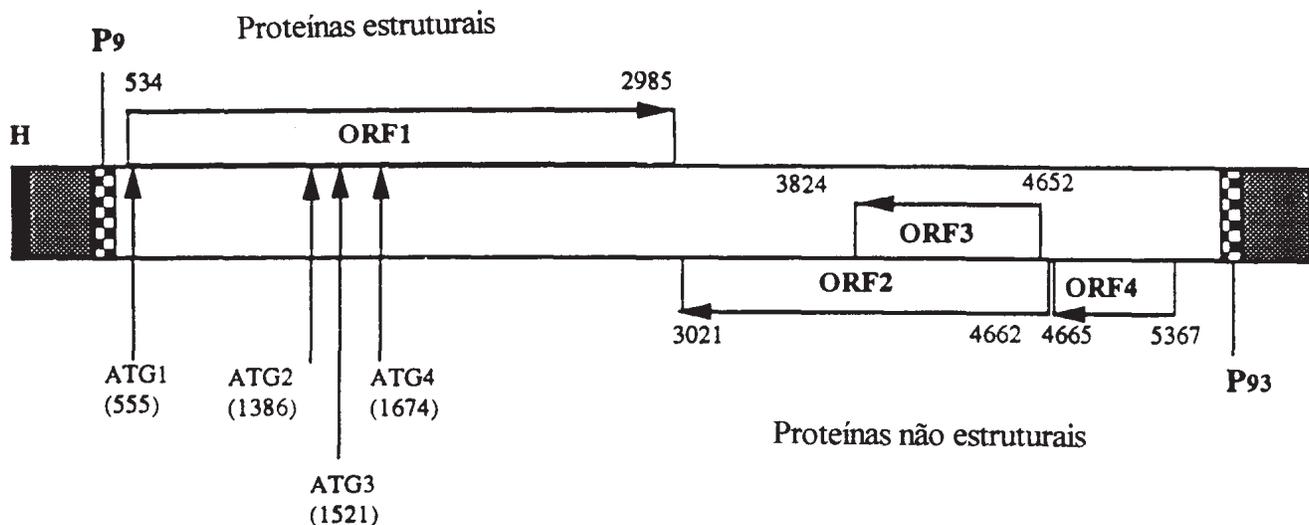


FIGURA 2 - Organização do genoma viral do Densovírus de *Junonia coenia* clonado no plasmídeo pBR 322 (DUMAS et al., 1992). O genoma viral é contituído de 5908 pb e possui quatro quadros abertos de leitura (ORFs) localizados na extremidade 5' de cada fita. A capacidade de codificação destes é 89, 60, 30 e 20 KDa para os ORFs 1, 2, 3 e 4 respectivamente. O genoma foi inserido ao acaso, sendo a fita codificadora das proteínas estruturais posicionadas na extremidade 5' do lado esquerdo. Existe em cada extremidade do genoma uma longa sequência palindrômica formando uma repetição terminal invertida (ITR) (▨▨▨). As 96 primeiras bases da extremidade esquerda podem se dobrar para formar uma estrutura de "hairpin" (H). Em consequência de uma deleção de 88 pb na clonagem, a inserção viral de pBRJ não possui hairpin na extremidade direita. Os dois promotores (▨▨) do ORF 1 (P9) e dos ORFs 2, 3 e 4 (P93) são incluídos parcialmente na sequência palindrômica. A posição dos códons de iniciação dos 4 polipeptídeos estruturais são indicados pelas flechas verticais.

2.9.3 Estrutura das extremidades

KELLY & BUD, 1978 e CHAO et al., 1985 observaram por microscopia eletrônica e através da digestão pela nuclease S1 moléculas circulares monocatenárias e concatâmeros bicatenários indicando a presença de sequências terminais repetidas e invertidas (ITRs) em cada extremidade. A presença de sítios de restrição simétricos foi também observada como evidência deste fato (JOUSSET et al., 1990). Posteriormente, o sequenciamento destes genomas confirmou estas informações (TIJSSEN, 1990; JOURDAN et al., 1990; DUMAS et al., 1992 e BANDO et al., 1990).

O sequenciamento das extremidades de GmDNV mostrou que suas ITRs são compostas de 350 pb (TIJSSEN, 1986). CHAO et al. (1985), estimaram por microscopia eletrônica que estas sequências em *Pseudoplusia includens* DNV apresentavam 440 pb, mas a ausência de sequências palindrômicas internas não permite a formação de estruturas em T. As ITRs de JcDNV possuem 517 nt, a maior entre os Parvovirus. Devido ao seu tamanho e sequências palindrômicas podem formar estruturas secundárias complexas (Figura 3) (DUMAS et al., 1992).

As repetições terminais invertidas são encontradas nos AAV e Parvovirus Autônomos. Estes também podem formar estruturas secundárias complexas, graças a presença de numerosas sequências palindrômicas complementares. Estas estruturas em forma de T ou Y são característica dos AAVs e de parvovirus autônomos. A presença de ITRs de JcDNV levou a supor, por analogia com as propriedades integrativas dos AAVs, que seu genoma poderia integrar-se no genoma de seu hospedeiro. Essa hipótese foi confirmada posteriormente por ROLLING, 1992.

O genoma de BmDENV apresenta ITRs de 225 pb, onde as primeiras 153 formam estruturas de "hairpin" (grampo de cabelo), sem que se formem as estruturas em T ou Y, características estas, comuns aos Parvovírus de vertebrados e aos DNVs (KAWASE, 1985 e BANDO et al., 1990).

O genoma de *Aedes* DNV apresenta em cada extremidade uma sequência palindromica única em sequência primária. Possuem 146 nt na extremidade 5' e 164 na 3', podendo formar estruturas em T (AFANASIEV et al., 1991).

2.9.4 Replicação e transcrição do genoma viral

Contrariamente aos AAV2, os densovirus são vírus autônomos em sua replicação assim como outros Parvovirus. Estudos recentes dos genomas de BmDENV e JcDENV mostraram que as ITRs estão envolvidas na replicação (BANDO et al., 1990 e JOURDAN et al., 1990). Deleções simétricas de 149 a 258 pb dentro das ITRs do genoma de JcDENV anulam o poder transfectante dos plasmídeos nos quais foram clonados. Através destes resultados concluiu-se que as ITRs tem papel fundamental na replicação do genoma viral pois serviriam de primer (JOURDAN et al., 1990 e TIJSSEN et al., 1990). Os mecanismos de replicação dos Parvovirus são muito diversificados e restam ainda a ser elucidados para os DNVs.

Até hoje, foram poucos os DNVs estudados quanto ao aspecto da tradução e transcrição de seu genoma entre eles encontra-se o GmDENV. Foram observados cinco "transcritos" poliadenilados gerados no hospedeiro natural. Estes RNAs mensageiros apresentaram 1,8, 2,4, 3,5, 4,0 e 5,0 kb (GROSS et al., 1990). A tradução destes fragmentos gerou polipeptídeos de 30, 49, 55, 65 e 94 kDa respectivamente, sendo que os quatro últimos

parecem corresponder aos pesos moleculares das quatro proteínas estruturais que formam o capsídeo. O polipeptídeo de 30 kDa foi o mais abundante e corresponde a uma proteína não estrutural. Embora sendo de tamanho compatível ao fragmento 1,8 kb, estes pesquisadores não puderam definir se este polipeptídeo corresponde à este fragmento transcrito ou a um produto de degradação do polipeptídeo viral maior de 49 kDa.

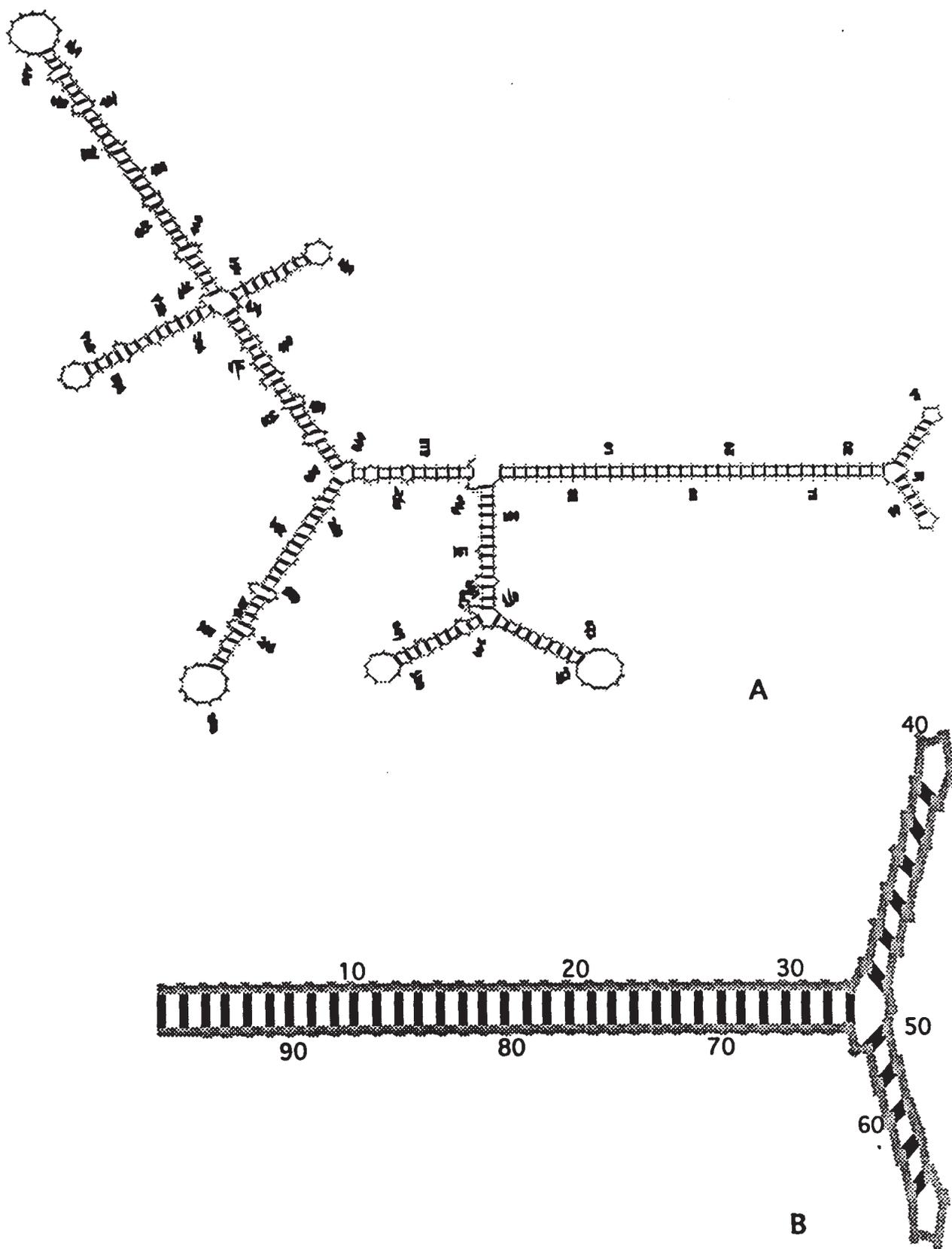


FIGURA 3 - Organização secundária da extremidade do genoma do densovírus de *J. coenia*. A. 517 primeiras bases e B. 96 primeiras bases que constituem o "hairpin" terminal (DUMAS et al., 1992).

Os produtos da tradução *in vitro* dos RNAs mensageiros extraídos de células do intestino médio de lagartas de *B. mori* infectadas com o BmDENV-2 mostraram a presença de seis polipeptídeos de 115, 53,5, 49, 46,5, 17 e 16,5 kDa (KOBAYASHI et al., 1986). Três deles (53,5, 49 e 46,5 kDa) correspondem aos polipeptídeos estruturais. Cinco promotores potenciais foram identificados antes dos três quadros abertos de leitura e dois na sequência codificadora do ORF 2 (BANDO et al., 1987b e 1990).

LI (1993), identificou dois RNAs mensageiros virais de 2,6 e 2,2 kb nos tecidos larvais e em culturas de células transfectadas com JcDENV. Ele demonstrou que o mensageiro de 2,6 kb é o produto de transcrição do promotor P9, dentro do ORF 1 e codificando as proteínas estruturais. Enquanto que o o mensageiro de 2,2 kb é o produto de transcrição à partir do promotor P93, situado na fita complementar e codificando as proteínas não estruturais. Os produtos de transcrição *in vitro* do RNA de 2,6 kb revelaram 4 polipeptídeos maiores correspondentes em tamanho aos quatro polipeptídeos do capsídeo, VP1, VP2, VP3 e VP4. A transcrição e tradução *in vitro* das sequências não estruturais mostraram dois polipeptídeos menores de 20 e 30 kDa e outro maior de 68 kDa. O tamanho destes três polipeptídeos é compatível com a capacidade teórica de codificação dos ORF 4, 3 e 2 respectivamente.

2.10 Clonagem do genoma de JcDENV e DsDENV

2.10.1 JcDENV

O genoma de JcDENV foi clonado no sítio Eco RV do plasmídeo pBR 322 (JOURDAN et al., 1990). O plasmídeo recombinante foi denominado pBRJ e mostrou-se tão infeccioso por transfecção em lagartas de *Spodoptera littoralis* quanto o DNA viral. Os

virions obtidos a partir desta infecção apresentam as mesmas características do vírus selvagem. O DNA viral é capaz de deixar o plasmídeo e gerar uma infecção em lagartas de *S. littorallis*. Estes mesmos plasmídeos podem transfectar as seguintes linhagens celulares SPC-PL 65, SPC-SL 52.

2.10.2 DsDNV

O genoma de DsDNV é composto de 5950 pb (determinado através de eletroforese) e foi clonado no sítio Hind II do plasmídeo pEMBL 19 (Figura 4), e o plasmídeo recombinante foi denominado pDst 50. Determinou-se que o genoma clonado possui 5890 pb e como ocorreu para pBRJ, aproximadamente 60 pb do genoma foram deletadas no momento da clonagem (KOUASSI, 1993). Foi também estabelecida pelo mesmo autor o mapa de restrição deste vírus (Figura 5). O pDst 50 foi utilizado para transfectar várias linhagens celulares de lepidopteros, sendo que apenas BCIRL-PX 2 HNU3 (*Plutela xylostella*) mostrou-se susceptível (KOUASSI, 1993).

2.11 Organização do genoma viral de JcDNV

A inserção viral clonada (pBRJ) e sequenciada permitiu definir a organização genômica deste vírus. O genoma viral é constituído 5908 pb sendo que a sequência codificadora é flanqueada por duas longas ITRs, regiões não codificadoras. Enquanto que nos Parvovírus sequenciados até hoje, as sequências codificadoras se encontram numa só fita de DNA, no JcDNV estas sequências se encontram nas duas fitas complementares (DUMAS et al., 1992).

O ORF 1 foi posicionado ao acaso na posição 5', à esquerda de uma das fitas, ocupando metade desta. A outra metade da fita complementar comporta os outros três quadros de leitura. O ORF 1 possui 2453 bases que corresponde a uma capacidade codificadora de 89 kDa. O ORF 1 codifica as quatro proteínas estruturais. Os outros três quadros de leitura (ORF 2, ORF 3 e ORF 4) situados na fita complementar possuem capacidade codificadora de 60, 30 e 20 kDa. Posicionado à esquerda do ORF 1, encontra-se um promotor funcional, P9, onde seu "TATA" box se situa a 35 nucleotídeos do primeiro ATG.

Os ORFs 2, 3 e 4 se posicionam no sentido 5'→3' na seguinte ordem: ORF 4, ORF 2 e depois ORF 3 e estão sob controle de um só promotor P93, que é simétrico ao do ORF 1. Um único codon stop separa o ORF 4 do ORF 2. O ORF 3 começa 11 nt após o início do ORF 2 e está deslocado em um nucleotídeo em relação aos outros dois ORFs. Estes três ORFs codificam as proteínas não estruturais envolvidas na replicação.

O plasmídeo pBRJ não apresenta a sequência viral total do JcDENV. Dados publicados por JOURDAN et al. (1990) mostraram que a ITR da extremidade direita foi deletada em 88 pb no momento da clonagem. No entanto, sua capacidade infecciosa, não foi alterada, e os vírus obtidos a partir da transfecção tem o perfil do vírus selvagem. É provável que esta deleção seja reparada durante o processo de replicação viral como no caso dos AAVs (SAMULSKI et al., 1983). Os 429 nt desta extremidade são complementares à sequência da extremidade esquerda entre os nucleotídeos 89 e 517. Pode-se concluir que o vírus "selvagem" possui em cada extremidade uma repetição terminal invertida de 517 pb. O JcDENV é o único entre os Parvoviridae que apresenta uma sequência ITR mais longa.

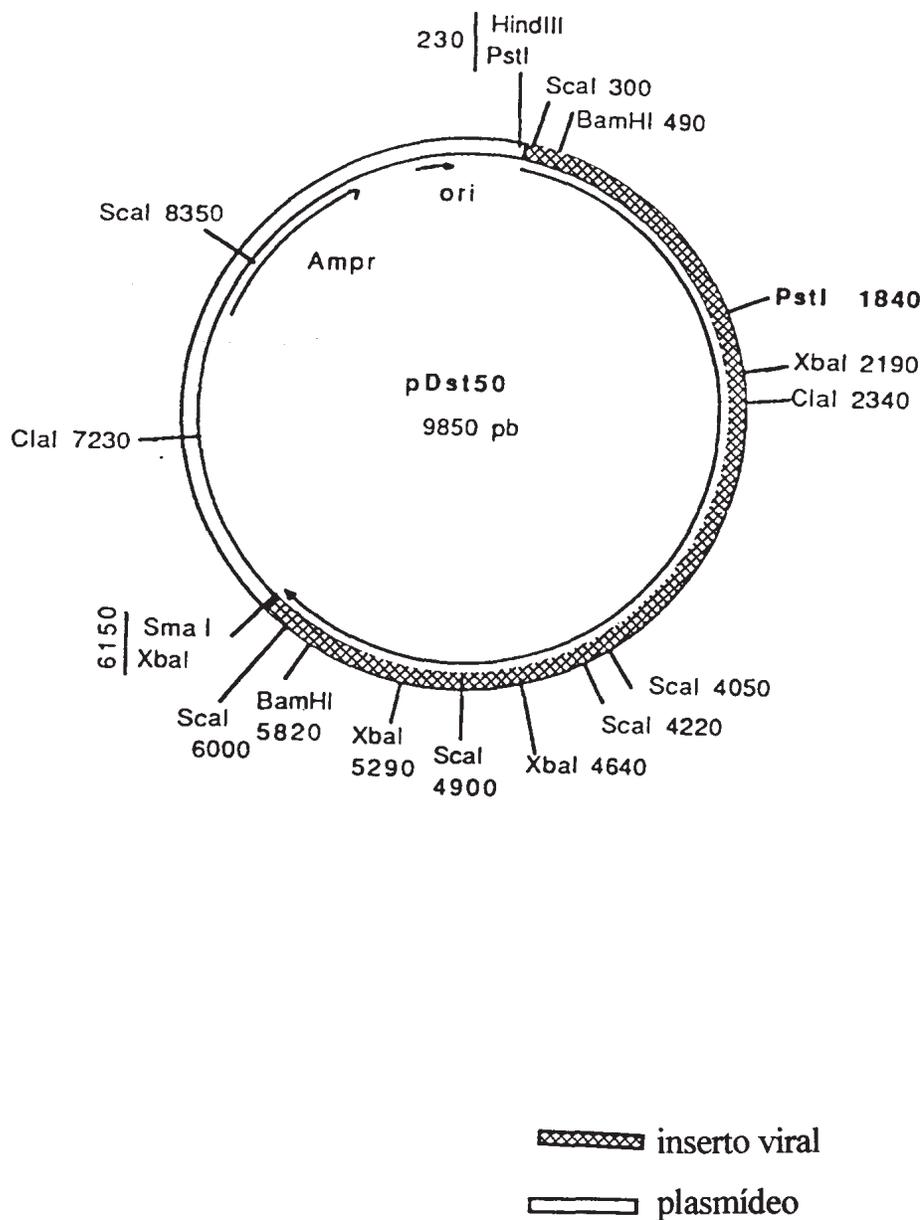


FIGURA 4 - Plasmídeo recombinante no qual foi inserido o genoma de DsDNV. A inserção foi feita no sítio Hind II de pEMBL 19 e o plasmídeo recombinante foi denominado de pDst50 (KOUASSI, 1993).

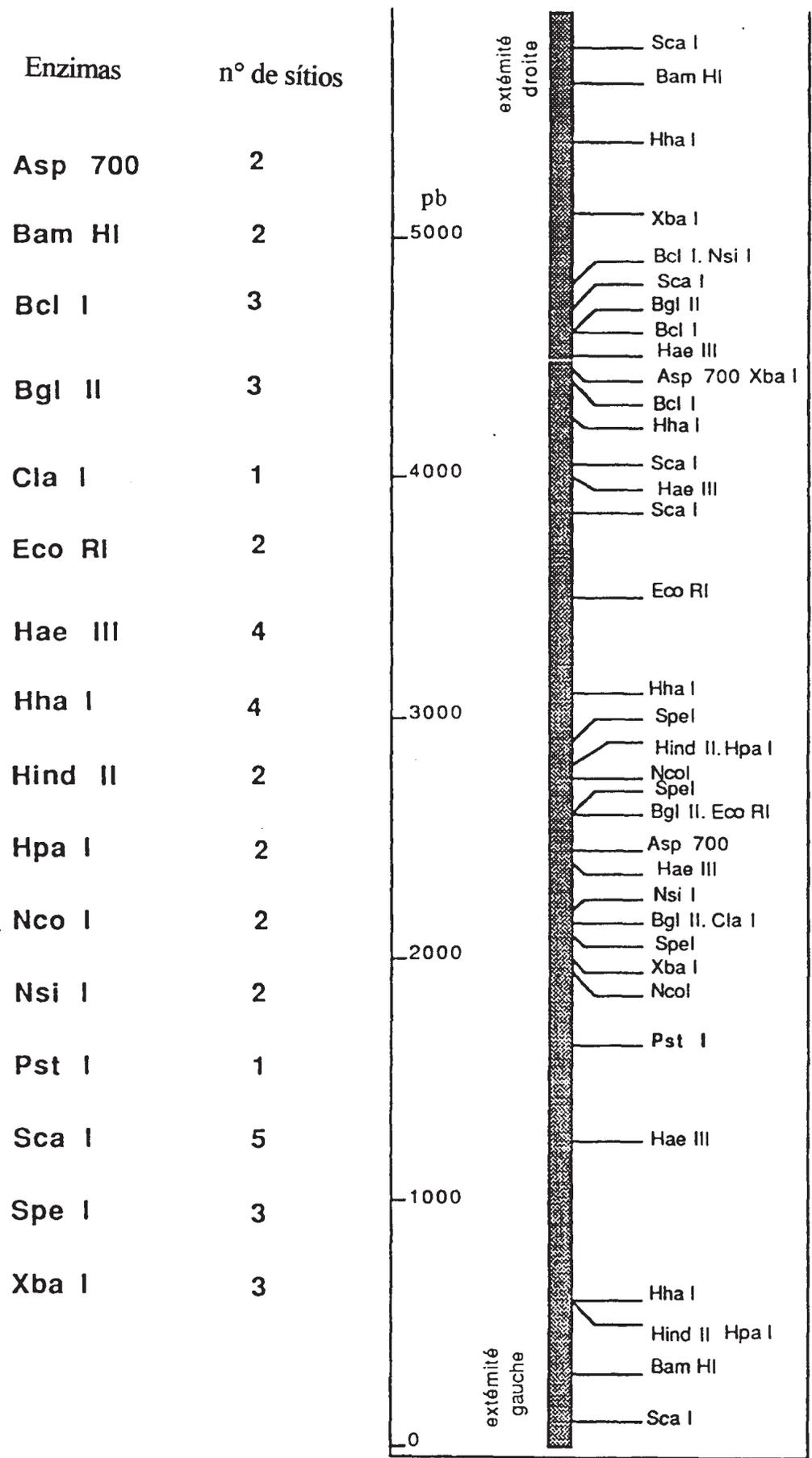


FIGURA 5 - Mapa de restrição do DNA de DsDNV mostrando esquematicamente a posição dos sítios de restrição (KOUASSI, 1993).

Através do sequenciamento do genoma pode-se observar que as sequências invertidas apresentam repetições diretas de 6 à 12 nt, e que os 96 nt de cada extremidade formam, por dobramento, uma estrutura secundária de "hairpin" em forma de Y (Figura 3). Este tipo de estrutura comum a todos os Parvovírus tem um papel fundamental na replicação, podendo ser responsável pela encapsidação e reconhecimento pelas enzimas de replicação e da transcrição. Os pBRJ deletados utilizando-se enzimas de restrição em 149 pb ou de 258 pb em suas ITRs, transfectados em lagartas de *S. littoralis* não foram capazes de gerar uma infecção (DUMAS et al., 1992). Provou-se também que as extremidades do JcDENV permitem ao vírus integrar-se no genoma do hospedeiro, propriedade comum aos AAVs (GIRAUD, 1991 e ROLLING, 1992). O pBRJ também foi empregado como vetor de expressão e integração. Foram inseridos os genes de lac Z de *E. coli*, da poliedrina do Baculovírus de *Autographa californica*, da resistência à neomicina e da eritropoetina humana (GIRAUD, 1991; ROLLING, 1992 e BOSSIN, 1993). Depois destes trabalhos publicados utilizando o JcDENV como vetor de expressão, vários pesquisadores utilizaram outros DNVs também como vetor de expressão. TAL & ATTATHOM, 1993 usaram o promotor das proteínas estruturais do GmDENV para expressar o gene de cloranfenicol acetil transferase e AFFANASIEV et al., 1994 que também expressaram o gene da β -galactosidase no genoma do AeDENV.

KOUASSI (1993) construiu quimeras dos genomas de DsDENV-JcDENV onde as ITRs de cada um dos vírus foi conservada no plasmídeo recombinante e o genoma viral (sequência interna codificadora) foi clonado sem suas ITRs visando novamente mostrar a função destas sequências. O genoma dos dois vírus possui em cada extremidade um sítio BamH I que indica a localização das ITRs. Assim pBRJ + ITRs recebeu o genoma de DsDENV sem suas próprias ITRs e o pDst50 + ITRs recebeu a sequência interna do JcDENV. Deve-se lembrar que o DsDENV não foi capaz de transfectar as linhagens celulares (SPC-PL 52 e SPC-SL 65) em que se replica o pBRJ. Entretanto, o plasmídeo quimera (BamH I fragmentos terminais - ITRs - de

JcDENV e fragmento BamH I interno de DsDENV) foi capaz de transfectar linhagens celulares de *S. litoralis* indicando que as ITRs podem atuar como origem de replicação para JcDENV (KOUASSI, 1993)

2.12 Homologia entre os Parvovírus

Como mencionado anteriormente os DENVs apresentam quatro proteínas estruturais variando de 42000 a 110000 Da (Tabela 4). Vários estudos de comparação foram realizados entre JcDENV e o GmDENV. Foi observado que estes vírus apresentam pequenas diferenças em relação à massa molecular das proteínas estruturais. As VP1, VP2, VP3 e VP4 de JcDENV apresentam 42600, 61100, 70900 e 107300 Da enquanto que as do GmDENV 41900, 58700, 70800 e 109600 Da (KELLY et al., 1980). Quando comparados por suas propriedades biofísicas, bioquímicas e serológicas eles podem ser considerados similares mas não idênticos, ainda deve-se a estes mesmos pesquisadores estudos de cinética de reassociação dos dois DNAs, mostrando que os dois vírus apresentam uma identidade de 87 % a nível genômico.

JOUSSET et al. (1986 a, b) observou que estes mesmos vírus apresentam mapas de restrição semelhante, diferindo em relação a oito enzimas entre todas experimentadas. A comparação destes com o genoma de AdDENV mostrou ser totalmente diferente dos dois .

Recentemente estudos comparativos tem sido realizados sobretudo em relação à sequência nucleotídica. Os parvovírus de vertebrados são os mais conhecidos e estudados em relação à sequência nucleotídica, modo de ação, organização e replicação. Entre eles estão o H-1(Human tumor Hep-1virus), MVM (Minute virus of mice) e AAV-2 (Adeno-Associated virus). DUMAS et al. (1992) verificaram que uma parte da sequência do JcDENV, dentro da

região codificadora de proteínas estruturais apresenta 54 % de homologia com o AAV, 64 % com o H-1 e MMV, 76 % com o PPV e 69 % com o CPV (Canine Parvovirus), FPV (Feline Parvovirus) e MEV. Existe também uma região do ORF-1 de JcDNV que apresenta 57 % de homologia com a região do ORF-2 de BmDNV (DUMAS et al., 1992).

Outros pesquisadores encontraram uma homologia de 35 % entre BmDNV-1 e H-1, MVM e 300 pb para AAV (BANDO et al., 1987b). Estas regiões homólogas encontram-se localizadas no ORF-2 e na parte do genoma que codifica proteínas não estruturais (ORF 1). Através dos resultados obtidos por H-1, MVM, AAV e BmDNV, concluiu-se que todos os vírus da família Parvoviridae apresentam um ancestral comum. O fato destas homologias situarem-se na região codificadora de proteínas não estruturais (NS), que tem importante papel na replicação, leva a crer que existe em relação à todos os Parvovirus modalidades comuns nesta etapa do seu ciclo (LI, 1993).

Enquanto que um grande número de parvovirus de vertebrados tem seus genomas clonados e sequenciados, entre os 25 DNVs descritos apenas seis foram sequenciados o BmDNV (BANDO et al., 1987b, 1990), GmDNV (TIJSEN et al., 1990, 1993), AaDNV (AFANASIEV et al., 1991), JcDNV (DUMAS et al., 1992), PiDNV (TIJSEN & BERGSON, 1993) e mais recentemente o AaPV que não se enquadra na categoria dos DNVs típicos (BOUBLIK, 1993).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Vírus

Utilizaram-se nos experimentos vírus de duas procedências. Os vírus de denonucleose de *Junonia coenia* (JcDNV), de *Galleria mellonella* (GmDNV) e *Acheta domestica* (AdDNV) foram obtidos do Laboratoire de Pathologie Comparée - INRA - Saint Christol-les-Alès - França e o vírus de denonucleose de *Diatraea saccharalis* (DsDNV) da coleção do Laboratório de Virologia de Insetos, Departamento de Genética e Evolução - IB - UNICAMP - Campinas - Brasil.

3.2 Insetos

Para multiplicação do JcDNV empregaram-se lagartas de *Spodoptera littoralis* Boisduval (Noctuidae). Lagartas de *Diatraea saccharalis* provenientes da criação do Laboratório de Virologia de Insetos - IB - UNICAMP e do CIRAD foram utilizadas para a multiplicação do DsDNV, e também em experimentos de especificidade de hospedeiros. A dieta oferecida para estas lagartas foi a mesma utilizada nas criações de *S. littoralis*.

Várias espécies de lepidópteros foram inoculadas com DsDNV com o intuito de avaliar a eficiência de multiplicação do vírus e a especificidade de hospedeiro. São elas: *Spodoptera littoralis* (11 dias) e *Ephestia khuniela* (20 dias), obtidas do insetário mantido pelo Institut de Recherches du Coton et Textile (IRCT - CIRAD atualmente CIRAD-CA - Montpellier - França), e lagartas de *Sesamia sp.* provenientes de criações artificiais em Atenas, Grécia. Lagartas de *Galleria mellonella* foram fornecidas pelo insetário mantido na Station de Pathologie Comparée - INRA - St Christol-les-Alès e adultos de *Acheta domestica* foram coletadas no campo.

3.3 Plasmídeos

∅ pDst 50 - compreende o plasmídeo pEMBL 19 (Boehringer) com o genoma completo de DsDNV, clonado e fornecido por KOUASSI, 1993.

∅ pDst 9 - mesmo plasmídeo com o genoma no sentido inverso.

∅ pBSK - pBluescript II SK - Stratagene

3.4 Bactérias e meio de cultura

∅ JM 83 - *E. coli* (YANNISH-PERRON et al., 1985): ara, D. (lac - pro AB), rsp L, F 80, lac Z, DM 15.

∅ DH5 α F' - *E. coli* (WOODCOCK et al., 1989 e RALEIGH et al., 1989) F'/ end A1 hsd R17, sup E 44 thi - rec A1 gyr A, rel A1, lac ZYA, arg F, U 169, lac Z M15.

∅ XL1 Bleu - *E. coli* (BULLACK et al., 1986) F': Tn10 pro A+ B+, lac Z M15/ rec A1, end A1, gyr 96, thi hsdh 17, sup E 44 rel A1 lac.

Foi empregado o meio LB (anexo 1), cuja composição encontra-se descrita no Anexo 2, para as pré-culturas e culturas de todas as bactérias utilizadas. Utilizou-se ampicilina na concentração de 50 mg/ml tanto no meio líquido como no sólido.

3.5 Linhagens celulares e meios de cultura

As culturas celulares são mantidas por repicagens semanais em placas de cultura de 25 cm² contendo 5 ml de meio de cultura. As culturas são homogeneizadas aspirando e voltando o meio, com uma pipeta Pasteur, sobre o tapete celular, até que as células se descolem da parede. Uma alíquota desta mistura (0,5 a 1 ml) serve para semear uma nova placa e o volume é aumentado até 5 ml através de meio fresco. As placas são conservadas em estufa à 28°C.

Foram utilizadas cinco linhagens celulares de inseto, são elas: linhagem SPC-PL 65, derivada de hemócitos *Spodoptera litura* (QUIOT, dados não publicados), clone Sf9IPBL-Sf-21 de *Spodoptera frugiperda* (VAUGHN et al., 1977), SPC-SL 52 de *Spodoptera littoralis* (MIALHE et al., 1984), SPC-GM 17 de *Galleria mellonella* (QUIOT, dados não publicados) e BCIRL-PX2-HNU3 de *Plutella xylostella* (CHEN et al., 1983).

Para as três primeiras linhagens foi utilizado o meio TG3 (anexo 2) e para as duas últimas BM25 (QUIOT, dados não publicados). Para todas as linhagens adicionou-se 10% de soro fetal bovino com exceção de PX 2-HNU3 que também foi utilizada sem soro (ss).

3.6 Preparo dos inóculos para infecção de insetos e células

Lagartas de *D. saccharalis* infectadas com o DsDNV foram homogeneizadas em meio de cultura celular TG3. Esta suspensão foi clarificada e filtrada em filtro Millipore 0,45 µm em condições estéreis para inoculação em lagartas de *S. littoralis* e nas linhagens celulares. Para inoculação de *Sesamia sp.*, as lagartas de *D. saccharalis* foram homogeneizadas em tampão Tris-ácido ascórbico.

Lagartas de *S. littoralis* infectadas com JcDNV foram homogeneizadas em Tris-ácido ascórbico seguindo-se o mesmo procedimento descrito acima e, esta solução foi empregada para a inoculação de lagartas de *D. saccharalis*.

3.7 Inoculação de lagartas

Este experimento teve por finalidade testar a especificidade e virulência do DsDNV em lagartas criadas na estação de pesquisa e na utilizada para multiplicação do JcDNV. Após a assepsia das lagartas inoculou-se o vírus utilizando-se uma seringa de insulina adaptada à um micro aplicador.

3.7.1 *Spodoptera littoralis*

Lagartas de *S. littoralis* de 11 dias foram infectadas com o DsDNV em suspensão, injetando-se 16 µl por lagarta, empregou-se como controle o tampão Tris-EDTA (TE) e o meio de cultura no qual o vírus estava suspenso. As lagartas inoculadas foram deixadas por 24 h sem alimento e, as que sobreviveram a injeção foram colocadas em caixas individuais com dieta. Estas foram observadas diariamente para coleta de lagartas mortas e pupas.

3.7.2 *Ephestia khuniella*

Lagartas de *E. khuniella* foram inoculadas com 9 µl de DsDNV (7,65 µg de virion). Como alimento para estas lagartas utilizou-se sêmola de milho. Após a inoculação seguiu-se o mesmo procedimento descrito acima.

3.7.3 *Sesamia* sp.

O mesmo procedimento descrito acima foi empregado para infecção de lagartas de *Sesamia* com o DsDNV. Neste caso injetou-se 27 µl de suspensão viral/lagarta. Estas lagartas estavam com 20 dias.

3.7.4 *Diatraea saccharalis*

Lagartas de *D. saccharalis* de 15 dias foram inoculadas com 27 µl de JcDNV. Foram escolhidas lagartas com o mesmo tamanho e aparência sadia para que pudessem sobreviver à injeção. Após 15 dias da inoculação as lagartas e pupas de cada espécie foram homogeneizadas individualmente para serem empregadas em testes ELISA para confirmação da multiplicação dos vírus. A hemolinfa da lagartas de *S. littoralis* e *E. khuniella* foi utilizada para preparações e observada em microscópio eletrônico.

3.7.5 *Galleria mellonella*

Lagartas de *G. mellonella* de 11 dias, foram inoculadas com 16 µl de DsDNV. As lagartas foram selecionadas 24 h depois da inoculação e mantidas em dieta artificial por 15 dias. As lagartas mortas e pupas foram analisadas posteriormente como as das outras espécies.

3.7.6 *Acheta domestica*

Adultos desta espécie de grilo foram coletados durante a primavera nos arredores da estação experimental, não sendo, portanto, definida a idade dos mesmos. Os insetos foram

inoculados com 16 µl de DsDNV, deixados 24 h sem alimentação, selecionados e observados diariamente. Após 15 dias, todos os insetos mortos ou não, foram analisados.

3.8 Infecção e titulação em culturas de células

Foram utilizadas placas de cultura de tecido de 96 cavidades. Cada placa foi dividida de forma a empregar-se três linhagens por ensaio. Na primeira placa foram testadas as linhagens Sf9, SPC-SL 52 e SPC-PL 65 e na segunda SPC-GM 17, PX2 e PX2 ss. Colocou-se 100 µl de suspensão celular por cavidade. Após 24 h à 28°C o meio de cultura livre de vírus foi retirado e substituído pelo meio contendo o vírus, diluído em até 10^6 . Como controle positivo, utilizou-se a suspensão viral pura e como controle negativo, o meio de cultura livre do vírus. Após 5 dias foram realizados testes de imunofluorescência para constatação da presença do vírus.

3.9 Infecção de frascos de cultura

Definida a titulação ideal do vírus, empregou-se frascos de 25 cm² para infecção de linhagens celulares que se mostraram mais susceptíveis ao DsDNV. As células foram semeadas na razão de 1:5, sendo 1 ml de suspensão celular para 5 ml de meio de cultura. Para cada inóculo, foram realizadas duas repetições. Após 24 h à 28°C retirou-se 1 ml do meio e adicionou-se 1 ml de suspensão viral a 10^1 . As células foram incubadas 6 dias à 28°C quando o meio foi retirado, e as células, coradas por imunofluorescência e observadas em microscópio de luz ultra violeta. O meio de cultura retirado dos frascos foi reinoculado em

frascos contendo células sadias. As células foram repicadas em várias passagens, sempre com duas repetições e a cada uma um frasco foi corado por imunofluorescência.

3.10 Titulação da suspensão viral empregada para infecção de linhagens celulares e insetos

A dose infecciosa de uma suspensão viral foi determinada pelo método da diluição limite. O meio de cultura proveniente dos frascos utilizados para imunofluorescência foram estocados e empregados para titulação em insetos e células. O meio de cultura dos frascos inoculados foi denominado como sendo a primeira passagem (1P), da infecção. Frascos de cultura contendo células novas foram inoculados com o meio 1P e foram, então denominados de SN-1P (sobrenadante da 1^o passagem).

Para testar a infecciosidade destes vírus, o meio foi inoculado em lagartas de *D. saccharalis* de 15 dias. A suspensão viral usada como inóculo inicial foi diluída 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} e 10^{-11} vezes. Os meios de cultura referente às diferentes passagens também foram diluídos de 10^{-1} até 10^{-3} e inoculado.

Foram inoculadas aproximadamente 15 lagartas com cada uma das diluições e estas foram analisadas individualmente.

3.11 Imunofluorescência

O diagnóstico da infecção foi baseado na detecção do complexo antígeno-anticorpo por imunofluorescência. A técnica utilizada foi aquela descrita por STITZ et al (1988) com modificações (LI, Y., dados não publicados)

As células inoculadas com o DsDNV, depois de 7 dias foram fixadas com tampão PBS (anexo 3) contendo 3% de formaldeído por 20 min à temperatura ambiente. Adicionou-se a seguir 3% de Triton X-100 em tampão PBS e incubou-se no mesmo tempo e temperatura. As células foram lavadas com PBS e, então adicionou-se anti-soro anti-virion de DsDNV, preparados a partir de camundongos ou coelhos diluídos na razão de 1/500. Incubou-se de 40 à 120 min à 37°C. O anti-soro foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com PBS. As células foram então incubadas no tampão PBS contendo anticorpo anti-IgG de camundongo, marcado com fluoresceína e azul de Evans por 40 à 60 min à temperatura ambiente, na ausência de luz. Após este período observou-se em microscópio UV.

3.12 ELISA

As lagartas inoculadas nos diferentes experimentos foram homogeneizadas individualmente em tampão PBS sendo 90 µl desta suspensão depositado por cavidade da placa. Foi empregado como controle negativo e como branco da placa o próprio tampão PBS e como controle positivo a hemolinfa de lagartas contaminadas com o vírus. Após a incubação durante a noite à 4°C, as cavidades foram lavadas com PBS-Tween (Anexo 4) três vezes por 3 min. O anti-soro (anti-DsDNV ou anti-JcDNV) foi diluído 500 vezes em PBS-T ao qual foi adicionado 0,5% de BSA e depositado à razão de 90 µl/cavidade. A placa foi incubada com esta solução durante toda a noite à 4 °C. A seguir foram realizadas três lavagens por 3 min com PBS-T. Adicionou-se então 90 µl de PBS-T + anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase, diluído 500 x + 5 % de BSA, incubou-se 2 h à temperatura ambiente. Após este período lavou-se a placa seguindo-se o mesmo procedimento descrito anteriormente. A revelação foi realizada adicionando-se 200 µl de substrato (1,1

mg/ml de ABTS - 2,2 Azino-D, 3-ethylbenzothiazoline 6 sulfonato) dissolvido em tampão citrato pH 4,7 e H₂O₂ a uma concentração final de 0,003%. A absorbância foi lida à 405 nm num leitor de placas Titertek Multiskan.

3.13 Purificação viral

Trinta lagartas de *Diatraea saccharalis* infectada com DsDNV foram homogeneizadas em Omni Mixer em 30 ml de tampão Tris + ácido ascórbico (Anexo 5) (pH-7,5) por 5 min. A seguir o homogeneizado foi filtrado e sonicado de 2 a 6 min e submetido à centrifugação à 10000 g durante 10 min para clarificação. O precipitado P-1 foi descartado e o sobrenadante S-1 foi submetido à centrifugação em gradiente de renografina 20-76% à 120000 g, 4°C por 16 h. As bandas de cada tubo foram recuperadas e dializadas contra tampão PBS durante 48 h, sendo o trocado o tampão a cada 12 h. As bandas obtidas foram observadas em microscópio eletrônico e a concentração viral estimada através de espectrofotometria.

3.14 Centrifugação em cloreto de céσιο

Para a determinação da densidade do DsDNV empregou-se gradiente de cloreto de céσιο (CsCl) pré-formado nas concentrações de 20 e 44% diluído em tampão PBS 0,1 X. A densidade deste gradiente variou de 1,23 a 1,49 g/ml. A suspensão viral clarificada descrita no procedimento anterior foi colocada sobre o gradiente e centrifugada à 120000 g - 4°C por 16 h. Após a centrifugação, alíquotas de 1 ml foram recuperadas em um coletor de fração Autodensiflow e a absorbância à 254 nm foi determinada e registrada em um monitor ISCO UA5 u.v.

3.15 Observação em microscópio eletrônico

A eficiência das inoculações em experimentos de especificidade de hospedeiro foi avaliada através da hemolinfa de lagartas, assim como de suspensões virais clarificadas e purificadas. As suspensões virais foram tratadas negativamente com ácido fosfotungstico à 2 % e observadas.

3.16 Eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS

As eletroforeses foram realizadas em aparato vertical de pequenas dimensões 80 x 85 x 1 mm. A metodologia empregada no preparo dos géis foi a descrita por Laemmli (1970) com modificações. Adicionou-se às amostras virais o tampão da amostra 4 X (Anexo 6) e desnaturou-se as proteínas à 100°C por 3 min. Nos anexos 7 a 14 encontram-se a composição dos géis, das soluções estoque, tampões, soluções corante e descorante.

O tempo de duração das corridas foi aproximadamente 1:30 h utilizando-se corrente constante de 15 mA até o limite do gel de empacotamento e 25 mA até o final. A concentração de acrilamida foi de 5 % para o gel de empacotamento e 8,5 a 10% para o gel de resolução. Como padrão protéico foi empregado o kit LMW da Pharmacia, com as seguintes proteínas: fosforilase β -94000 Da, albumina 67000 Da, ovoalbumina 43000 Da, anidrase carbônica 30000 Da, inibidor de tripsina 20100 Da e α -lactoalbumina 14400 Da e/ou kit Boehringer com α -2 macroglobulina 170000 Da, fosforilase β -97400 Da, glutamato desidrogenase 55400 Da, lactato desidrogenase 36500 Da e inibidor de tripsina 20100 Da.

3.17 Western blot

Após a eletroforese em SDS-PAGE as bandas foram transferidas para membrana de nitrocelulose. A transferência foi realizada em aparelho da BioRad, Trans Blot Cell e os componentes do sistema foram montados na seguinte ordem: esponja Scotch-brite, papel Whatman 3 MM, gel, filtro de nitrocelulose (0,45 μm), papel Whatman e esponja Scotch-brite. Todos os papéis e esponjas foram umedecidos no tampão da cuba. A transferência de proteínas do gel para o filtro de nitrocelulose foi realizada com amperagem constante de 150 mA à 4°C durante 2 h. A composição do tampão da cuba encontra-se descrito no anexo 15. Após o tempo de corrida, o filtro de nitrocelulose foi colocado entre folhas de papel de seda, para depois de seco, ser revelado.

3.18 Dot blot

Esta técnica é uma variação do Western Blot e foi utilizada para detectar a quantidade mínima do antígeno homólogo revelado por diferentes diluições do anticorpo. Para cada vírus foram feitas as seguintes diluições: 1 μg , 100 ng, 10 ng, 1ng, 100 pg e 10 pg. As diluições dos anticorpos para os diferentes vírus foram: 1/200, 1/500, 1/1000 e 1/2000. Em cada cavidade da placa, sobre a membrana colocou-se 100 μl de cada diluição do antígeno. O aparelho utilizado foi o Bio-dot da BioRad.

3.19 Revelação das proteínas transferidas

O filtro de nitrocelulose utilizado tanto nos Western Blot quanto no Dot foi imerso numa solução de tampão PBS e leite em pó desnatado à 1 %, por 1 h à temperatura ambiente. Este procedimento tem por finalidade saturar a membrana para que ocorram somente reações

específicas. Esta solução foi eliminada e a membrana lavada com PBS-Tween 20 à 0,05 % por três vezes por 1, 5 e 1 min. A seguir os anticorpos de cada vírus foram diluídos em 1/1000 (na solução de PBS-leite) onde a membrana foi incubada por 1 h à temperatura ambiente. Realizou-se nova lavagem com PBS-Tween. Posteriormente a membrana foi incubada à mesma temperatura e mesmo tempo em solução de PBS-leite e anticorpo conjugado (anti IgG de camundongo marcado om peroxidase) diluído 1/1000.

Após a lavagem em PBS-Tween adicionou-se o meio de revelação. Utilizou-se o 4 cloro-naphtol durante 10 a 30 min ou o diamino benzidina de 5 a 20min, ambos na ausência de luz. A reação de coloração foi encerrada lavando-se as membranas com água. As soluções e tampões empregados neste procedimento estão nos anexos 16 a 18.

3.20 Extração do DNA viral

A suspensão viral purificada foi ajustada à concentração final de 4 mM de EDTA, adicionou-se 2% (p/v) de sarcosil, 200 mg/ml de proteinase K e incubou-se à 37°C por 2 h. A seguir, adicionou-se o mesmo volume de fenol (saturado com TE 10:1) agitou-se por 5 min e centrifugou-se à 12000 rpm por 3 min. Repetiu-se o mesmo procedimento. Adicionou-se à fase aquosa o mesmo volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) seguido de centrifugação nas mesmas condições. Em seguida foi adicionado duas vezes o volume de etanol 100 % e acetato de sódio na concentração final de 0,3 M. Esta solução foi incubada durante à noite à - 20°C ou durante 30 min à -70°C. Após centrifugação o precipitado foi lavado com etanol 100% e em seguida 70 %. O DNA foi secado em Speed Vac e depois ressuspendido em tampão TE.

3.21 Reações enzimáticas

As enzimas empregadas neste trabalho (Southern) foram fornecidas pela Boehringer Mannheim e utilizadas conforme as condições preconizadas. São elas: Bgl II, ClaI, Eco RI, Hind II, Hind III e Nco I. Respeitou-se as condições indicadas pelo fornecedor e empregou-se de 0,5 à 1 µg de DNA viral, sendo utilizada 4 unidades de enzima por µg de DNA. A solução foi incubada 2 h à 37°C e a reação foi interrompida colocando-se à 0°C. Para a digestão do DNA de AdDNV empregou-se Cla I e Hind III, de DsDNV HindIII e NCo I, de GmDNV Bgl II e HindII e de JcDNV Eco RI e Hind II.

As reações enzimáticas com endonucleases e exonucleases de restrição, fragmentos de Klenow, T4 DNA ligase foram utilizadas segundo as normas preconizadas pelo fornecedor, Boehringer e Biolab, assim como o Kit Exo III/Mung Bean (Stratagene).

3.22 Eletroforese em gel de agarose

Análise do DNA total e/ou seus respectivos produtos de digestão foram realizada em gel de agarose a 1% em tampão TEP (anexo 19). Aos DNAs adicionou-se a solução corante (anexo 20) e, após a migração, o gel foi corado em solução de brometo de etídio 0,5 mg/ml durante 5 min e, em seguida lavado em água corrente pelo mesmo tempo, sendo então observado em transiluminador UV. Foram utilizados como padrão de peso molecular os marcadores da Boehringer-Mannheim **I** (3530, 4878, 5643, 7421 e 21226 pb), **III** (125, 564, 831, 947, 1357, 1584, 1904, 2027, 3530, 4268, 4973, 5148 e 21226 pb), **VI** (154, 220, 234, 298, 394, 453, 517, 653, 1033, 1230, 1766, 2176 pb) e **VII** (370, 490, 680, 1000, 1150, 1400, 1500, 1850, 1900, 2700, 3500, 4800, 6000, 7100 e 8000 pb) que são respectivamente: lambda EcoRI, Lambda EcoRI e HindIII, pBR328 Bgl I e Hinf I e SPP1 DNA EcoRI.

A análise dos DNAs plasmidiais e seus produtos de digestão foi realizada em gel de agarose de 1 a 1,6 % em tampão TEP.

3.23 Purificação do DNA

O procedimento empregado é o descrito no Kit GeneClean™ OZYME. Aproximadamente 10µg de DNA foi migrado nas condições descritas acima. Após a migração e coloração a banda foi cortada em pequenos fragmentos e colocada em um tubo Eppendorf. Adicionou-se para cada 100 mg de gel 250 µl de NaI e incubou-se por 5 min à 55°C, até o dissolvimento completo da agarose. Adicionou-se 7 µl de Glassmilk (sílica), incubou-se por 5 min à 0°C e centrifugou-se por 30 segundos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 250 µl de solução de lavagem (new wash - anexo 21). Centrifugou-se 30 segundos e repetiu-se o procedimento por mais duas vezes. O último precipitado foi ressuspendido em em 100 µl de TE. A seguir, utilizou-se uma alíquota de 5 µl para observar a pureza e a concentração do DNA obtido. Este DNA foi empregado para digestão com enzimas e no preparo de sondas.

3.24 Preparo de sondas

Para o preparo das sondas foi utilizada a marcagem não radioativa, utilizando-se a digoxigenina-11-dUTP do Kit Boehringer Mannheim, conforme as condições preconizadas pelo fabricante.

As sondas do DNA total de AdDNV, DsDNV, GmDNV e JcDNV foram preparadas partir de 0.5 µg de DNA num volume final de 15 µl. Este foi desnaturado à 95°C por 10 min, sendo colocado imediatamente no gelo. Adicionou-se então as diferentes soluções na seguinte ordem: 2 µl de solução de mistura de nucleotídeo, 2 µl de dNTP (solução contendo dATP 1mM, dCTP 1mM, dGTP 1mM, dTTP 0,65 mM, dioxigenina 11 dUTP 0,35 mM) e 1 µl de fragmento de Klenow de DNA polimerase (2U/µl). Incubou-se à 37°C por 1:30 h. Interrompeu-se a reação adicionando-se 2 µl de EDTA 0,2 M. As sondas foram estocadas à -20°C para posterior utilização.

3.25 Southern blot

O procedimento empregado é o descrito no Kit Boehringer Mannheim. Após eletroforese em gel de agarose dos diferentes DNAs digeridos por enzimas de restrição foi realizada a transferência das bandas para membrana de nylon (Boehringer).

O gel foi colocado em solução desnaturante (anexo 22) durante 30 min à temperatura ambiente, sob agitação. A seguir foi montada a cuba de transferência na seguinte ordem: três folhas de papel 3 M como ponte do tampão SSC 20 X (anexo 23), gel, membrana, três folhas de papel 3 M, todos umedecidos no tampão, uma caixa de lenço de papel e um peso. As laterais do gel foram vedadas com Parafilm. A transferência foi realizada à temperatura ambiente durante a noite. A membrana foi exposta à radiação UV durante 3 min e colocada em um saco plástico com a solução de hibridação (anexo 24) por pelo menos 6 h à 68°C. Esta solução serviu para pré-hibridação e após este período foi trocada pela mesma solução adicionada de uma das sondas (AdDNV, DsDNV, GmDNV e JcDNV). Antes de ser adicionada à solução a sonda foi desnaturada durante 5 min à 95°C. A hibridação foi realizada durante a noite à 68°C. A membrana foi lavada duas vezes com a solução de lavagem 1

(anexo 25) à temperatura ambiente e duas vezes por 15 min com a solução de lavagem 2 (anexo 26) à 68°C.

A membrana foi então incubada no tampão 2 (anexo 27) por 30 min à temperatura ambiente e sob agitação. Foi lavada rapidamente no tampão 1 (anexo 28) e incubada 30 min no tampão 1 mais o anticorpo anti digoxigenina conjugado com fosfatase alcalina (1:5000). O anticorpo foi removido lavando-se a membrana por 15 min no tampão 1 e a seguir 2 min no tampão 3 (anexo 29). A reação de revelação foi realizada colocando-se a solução corante (anexo 30) e incubando-se de 15 min a 2 h, na ausência de luz. A reação foi bloqueada lavando-se a membrana em TE.

3.26 Dot blot

Esta técnica teve por finalidade definir a concentração mínima de DNA capaz de ser revelada pelas diferentes sondas. Uma alíquota inicial de 2 µl contendo aproximadamente 500 ng de DNA foi diluída oito vezes em tampão TE. Depositou-se sobre a membrana 2 µl destas diluições contendo 500, 50, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,312, 0,156 e 0,078 ng de DNA. Utilizou-se o TE como controle negativo. Foram confeccionadas quatro membranas e cada uma delas foi hibridizada com uma das sondas. O procedimento utilizado para revelação foi o mesmo descrito acima para as membranas do Southern Blot.

3.27 Preparação e transformação de bactérias competentes

O preparo e transformação de bactérias competentes foram aqueles descritos no "Current Protocols in Molecular Biology" (1987). Uma colônia foi semeada em dois tubos de

ensaio contendo 2 ml de meio LB e incubada durante a noite a 37°C sob agitação 195 rpm. Esta suspensão foi adicionada a um frasco erlenmeyer contendo 200 ml de meio LB sendo novamente incubado a 37°C sob agitação até a obtenção de uma D.O. de 0,375 à 590 nm. Esta suspensão foi então repartida em 4 tubos Corex de 30 ml e centrifugada a 5000 rpm durante 7 min à temperatura ambiente. O precipitado foi ressuscitado em 5 ml de uma solução de CaCl₂ (Anexo 31) gelada e incubado por 30 min no gelo, sendo em seguida novamente centrifugado a 5000 rpm por 5 min-TA. O precipitado foi ressuscitado em 5 ml de CaCl₂, incubado e centrifugado da mesma forma descrita acima, sendo então ressuscitado em 1 ml de TE. A suspensão bacteriana foi mantida de 12 a 24 h a 4°C e foram então alíquotadas para conservação a -80°C.

A partir deste passo procedeu-se a transformação destas bactérias ditas competentes. Adicionou-se a 100 µl de bactérias, 10 µl de plasmídeo (10 a 100 ng/DNA) e incubou-se 10 min no gelo, 5 min a 37°C e adicionou-se então, 1 ml de meio LB (sem ampicilina), incubou-se à 37°C sob agitação durante 60 min. As bactérias foram inoculadas em placas de Petri contendo meio LB + ampicilina e mantidas em estufa a 37°C.

3.27.1 Minipreparações

As mipreparações de DNA foram realizadas por lise alcalina (Birnboim & Doly, 1979). Cada clone foi semeado em 2 ml de meio LB + ampicilina e mantido durante a noite a 37°C sob agitação. A suspensão foi colocada num tubo Eppendorf e centrifugada a 5000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se ao precipitado 100 µl de solução BD1 à 4°C + 10 mg/ml de lisozima (Anexo 32), incubando-se por 5 min à temperatura ambiente. Adicionou-se 200 µl de solução BD2 recém preparada (Anexo 33), e manteve-se

por 5 min no gelo. Adicionou-se 150 µl de BD3 (Anexo 34) e o eppendorf foi agitado em vortex e colocado por 5 min no gelo, sendo então centrifugado a 12000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi recuperado e submetido a uma lavagem fenol/clorofórmio, após centrifugação adicionou-se 1 ml de etanol 100 %, manteve-se por 30 min a -80°C. Após nova centrifugação a 12000 rpm por 15 min, o precipitado foi lavado com etanol 70 %, secado em Speed Vac e ressuspendido em 40 µl de água destilada. Os plasmídeos assim obtidos foram digeridos por uma ou duas enzimas de restrição e submetidos à eletroforese para controle.

3.27.2 Maxipreparações

As maxipreparações foram realizadas por lise alcalina, precipitação com PEG e/ou centrifugação em cloreto de céσιο. Uma colônia ou 10 a 20 µl de meio contendo bactérias, foi semeada num erlenmeyer contendo 200 ml de meio LB + ampicilina sendo a suspensão, incubada durante a noite a 37°C sob agitação (pré-cultura). A cultura foi então transferida para tubos de Nalgene de 250 ml. Neste passo pode-se retirar alíquotas de 600 µl da suspensão, para estocagem, adicionando-se 400 µl de glicerol autoclavado, em freezer à -80°C. Os tubos foram centrifugados a 3700 rpm por 20 min. O sobrenadante foi descartado, o precipitado ressuspendido em 10 ml de BD1 e 1 ml de lisozima 10 mg/ml e incubado 5 min à temperatura ambiente. Adicionou-se BD2 recém preparada e incubou-se novamente 10 min a temperatura ambiente. Adicionou-se 15 ml de BD3 à 4 °C, agitou-se vigorosamente em vortex e incubou-se 10 min no gelo. A seguir a mistura foi centrifugada 5 min a 5000 rpm e posteriormente o sobrenadante foi filtrado em um lenço de papel. Adicionou-se o mesmo volume de isopropanol incubou-se 10 min a temperatura ambiente. A solução foi centrifugada a 5000 rpm durante 15 min. O precipitado foi lavado com etanol 70 % e depois de retirado todo traço de álcool ressuspendeu-se em 3 ml de TE. Adicionou-se então 3 ml de LiCl 5M e

centrifugou-se a 10000 rpm durante 10 min a 4°C. Ao sobrenadante foi adicionado o mesmo volume de isopropanol e este foi novamente centrifugado a 10000 rpm durante 10 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 70 % e seco em Speed Vac. Adicionou-se 450 µl de TE, 50 µl de RNase 1 mg/ml (100 µg, concentração final) e incubou-se à temperatura ambiente durante 30 min. Adicionou-se 500 µl de NaCl 1,6 M, 13 % de PEG 8000, homogeneizou-se bem e centrifugou-se a 10000 rpm 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 400 µl de TE. Lavou-se uma vez com fenol, fenol/clorofórmio e clorofórmio. Adicionou-se então à fase aquosa 40 µl de acetato de sódio 3M e 1 ml de etanol 100 %, precipitou-se a -80°C durante 30 min. Centrifugou-se a 10000 rpm a 4°C durante 10 min. O precipitado foi lavado com etanol 70 %, seco em Speed Vac e ressuspensionado em 500 µl de TE. Em seguida esta solução foi lida em espectrofotometro a 260 nm e estimou-se a concentração de DNA sendo uma alíquota analisada em gel de agarose. Os plasmídeos foram então alíquotados em eppendorfs e estocados a -20°C.

3.28 Escolha dos clones

3.28.1 Screening X-GAL/IPTG

Empregou-se X-Gal (2 % em DMF) e IPTG (0,1 M) na razão de 1 ml e 200 µl respectivamente, na preparação de 500 ml de meio LB sólido como controle de inserção dos fragmentos do genoma viral. Foram também preparadas placas individuais onde adicionou-se 50 µl de X-Gal, 10 µl IPTG e 40 µl de água destilada a solução foi espalhada, e após estarem secas as placas foram utilizadas para repicagem dos clones. O plasmídeo pEMBL 19 possui um indicador de seleção do gene lac Z. Após uma incubação durante a noite a 37°C, as

bactérias transformadas pelos plasmídeos recombinantes formam colônias brancas e aqueles nos quais os fragmentos não foram inseridos formam colônias azuis. Apenas os clones que se revelaram positivos foram utilizados nas minipreparações.

3.28.2 Screening por hibridação *in situ*

Cada clone obtido foi repicado numa placa de Petri contendo meio LB ao qual foi adicionado X-gal e IPTG e mantidos durante a noite a 37°C. Sobre os clones foi colocado o filtro Millipore (0,45 µm - HATF 08550) por 30 a 60 segundos.

Preparou-se folhas de papel Whatman 3 MM embebidas em solução desnaturante (Anexo 35), neutralizante (Anexo 36) e de lavagem (Anexo 37) e colocou-se o filtro por 5 min em cada um dos papéis embebidos nas diferentes soluções. A seguir os filtros foram colocados em duas camadas de papel Wathman 3 MM e fixou-se o DNA em estufa a vácuo a 80°C por 1 a 2 h. O procedimento seguido é o mesmo utilizado para dot e Southern blotting. Os clones revelados positivos foram preparados (miniprep) para análise por dupla digestão, de forma a obter o plasmídeo e a inserção.

3.29 Obtenção dos plasmídeos superenrolados

Para a obtenção de 85 % de plasmídeos superenrolados, porcentagem necessária para emprego nos experimentos de digestão com enzimas Exo III, seguiu-se o protocolo de extração por fenol ácido descrito por ZASLOFF et al. (1978). Os plasmídeos foram obtidos pelos métodos usuais descritos acima, reprecipitados e ressuspensos em água deionizada

sendo adicionado acetato de sódio pH 4,0 e cloreto de sódio na concentração final de 50 mM e 75 mM respectivamente. A seguir foi adicionado o mesmo volume de fenol redestilado equilibrado com 50 mM de acetato de sódio pH 4,0. A mistura foi agitada em vortex por 1 min, mantida em repouso por 1 min e novamente agitada por 1 min, sendo então centrifugada a 10000 g por 5 min. A fase aquosa foi removida e submetida mais duas ou três vezes ao mesmo tratamento, visando eliminar o DNA linear e fragmentos. Adicionou-se 0,05 volume de Tris-HCl 1 M pH 8,6 e 1 volume de clorofórmio. Recuperou-se a fase aquosa, adicionou-se 0,1 v de NaCl 2 M e etanol 100 %. O DNA foi lavado em fenol/clorofórmio, secado, ressuspensionado em TE e estocado a -20°C.

3.30 Digestão Exo III/Mung Bean

Os plasmídeos extraídos em fenol ácido segundo o protocolo descrito acima foram digeridos com a enzima Kpn I de forma a obter uma extremidade "overhangs 3'" protegendo a extremidade, e Sma I que corta "blunt" para ser digerido pela exonuclease.

A temperatura empregada para digestão foi de 32°C, que segundo cálculos obtidos a partir do Kit Exo III/Mung Bean Nuclease Deletions, nesta temperatura apresenta uma velocidade de deleção de 300 pb/min. Partindo-se do inserto de pDst 50, planejou-se 21 pontos (minutos) para obtenção de todos os clones necessários para o sequenciamento dos 3500 pb iniciais. Para cada minuto de digestão foi empregado 5 µg DNA e adicionou-se 12,5 µl de tampão Exo III 2 X, 2,5 µl de β mercaptoetanol 100 mM, 100 U de Exonuclease III e água até o volume de 25 µl.

Realizou-se coletas sucessivas de 25 µl da solução a cada 1 min e colocou-se em eppendorfs contendo tampão Mung Bean mantidos no gelo, a seguir os tubos foram incubados a 68°C por 15 min e novamente mantidos no gelo. Adicionou-se para cada alíquota 15 U de nuclease Mung Bean e incubou-se por 30 min a 30°C. Adicionou-se então 4 µl de SDS 20 %, 10 µl de Tris-HCl pH 9,5, 20 µl de LiCl 8 M e 250 µl de fenol/clorofórmio. Centrifugou-se a 10000 rpm recuperou-se a fase aquosa e adicionou-se 20 µl de acetato de sódio 3 M pH 5,2, 2 µl de tRNA na concentração final de 10 ng/µl, 650 µl de etanol 100% à 4°C, centrifugou-se a 12000 rpm a 10 min e lavou-se com etanol 70%. O precipitado foi ressuspendido em 15 µl de Tris-HCl 10 mM e 0,1 mM EDTA pH 7,5.

Alíquotas foram coletadas durante os 21 min de digestão de Exo III/ Mung Bean e estas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose como forma de controle da digestão e para cálculo do tamanho dos plasmídeos.

A seguir realizou-se a ligação dos plasmídeos assim digeridos utilizando-se de 1 a 2 µl de DNA, 2,0 µl do tampão de ligação, 2 µl de ATP 5 mM pH 7,0-7,5, 2,0 µl de T4 DNA ligase adicionando-se água q.s.p. 20 µl, a reação foi realizada durante a noite a 4°C. Os plasmídeos assim obtidos foram utilizados para a transformação de bactérias DH5αF'1Q. Os clones obtidos foram preparados e digeridos permitindo a separação do genoma viral digerido e do plasmídeo.

3.31 Obtenção e preparação dos fragmentos a serem subclonados

Para o sequenciamento dos 3500 pb referente ao ORF 1 e partindo da extremidade 5' esquerda foram preparados onze plasmídeos. Quatro deles foram obtidos por corte e ligação:

pA - pDst50 cortado por BamH I e ligado

pB - pDst50/Hinc II-Sma I e ligado

pC - pDst50/Xba I e ligado

pD - pDst50/Pst I e ligado (Figuras 4 e 5).

Os outros foram obtidos a partir de digestão dupla ou simples e ligados seja em pEMBL 18, 19 ou pBSK. São eles:

pE - pDst50 cortado por Pst I-Nsi I - fragmento de 550 pb clonado em pBSK/Pst I

pF - pDst50/Spe I - 540 pb - pBSK/Xba I

pG - pDst50/Pst I-Hinc II - 1050 pb - pBSK/Pst I-Hinc II

pH - pDst50/Spe I - 280 pb - pBSK/Xba I

pI - pDst50/Spe I-Eco RI - 600 pb - pEMBL 18 e 19/XbaI-Eco RI

pJ - pDst50/Bgl II - 440 pb - pBSK/BamH I

pK - pDst50/Eco RI - 900 pb - pBSK/Eco RI.

Os fragmentos foram purificados utilizando-se o kit "GeneClean" e os plasmídeos foram lavados em fenol/clorofórmio e desfosforilados.

3.32 Desfosforilação

Os plasmídeos com os diferentes insertos foram digeridos com as enzimas escolhidas, lavados em fenol/clorofórmio e precipitados. A seguir foram ressuspensos num volume mínimo de tampão Tris 10 mM pH 8,0. Adicionou-se 5 µl de tampão CIP 10 X, 2 µl de fosfatase alcalina e água q.s.p. 50 µl, a mistura foi incubada 15 min a 37°C, 15 min a 56°C

adicionou-se o mesmo volume de enzima e repetiu-se as incubações. Lavou-se em fenol/clorofórmio e ressuspendeu-se em 13 μ l de água destilada. Utilizou-se 1 μ l para controle em gel de agarose.

3.33 Preparo dos plasmídeos para sequenciamento

Os plasmídeos denominados pA, pB, pC, pD, pE, pF, pG, pH, pI, pJ, pK foram preparados para sequenciamento utilizando-se o Kit Qiagen 20 S procedendo-se da mesma forma nos passos iniciais descritos acima (minipreparações).

O precipitado de bactérias foi ressuspendido em 300 μ l de tampão P1 (Anexo 38), adicionou-se 300 μ l de tampão P2 (Anexo 39) e incubou-se 5 min à temperatura ambiente. Adicionou-se 300 μ l do tampão P3 à 4°C (Anexo 40) e a mistura foi incubada por 10 min em gelo. Centrifugou-se em seguida a 10000 rpm durante 15 min. A coluna Qiagen foi equilibrada com 1 ml de tampão QBT (Anexo 41). O sobrenadante foi filtrado na coluna e esta foi lavada quatro vezes com 1 ml de tampão QC (Anexo 42). O DNA é então eluído com 800 μ l de tampão QF (Anexo 43), precipitado com 0,7 volumes de isopropanol e centrifugado a 10000 rpm por 30 min. O DNA é lavado em etanol 70%, seco, redissolvido no volume desejado de água e dialisado. Uma alíquota foi empregada em gel de agarose e este DNA pode ser utilizado para sequenciamento.

3.34 Sequenciamento

O sequenciamento dos fragmentos foi realizado em sequenciador automático Applied Biosystem modelo 373 A, utilizando-se o Kit DyeDeoxyTM Terminator n° 401150 da Applied Biosystem onde os ddNTPs são acoplados a 4 fluorocromos diferentes. Para cada reação foi

utilizado 5 μ l de DNA (250 ng), 9,5 μ l de premix, 3,2 pmol de primer e 20 μ l de água q.s.p., sendo a solução premix composta de: 4 μ l de tampão TACS 5X, 1 μ l de mistura de dNTPs, 1 μ l dye deoxy A terminator, 1 μ l dye deoxy C terminator, 1 μ l dye deoxy G terminator, 1 μ l dye deoxy T terminator e 0,5 μ l taq DNA polimerase (8U/ μ l). Adicionou-se 20 μ l de óleo mineral e a solução foi introduzida em aparelho PCR, onde foram realizados ciclos de 96°C-4 min, 96°C-30 segundos, 50°C-15 segundos e 60°C-4 min, sendo realizado 25 ciclos das três últimas temperaturas. Após este procedimento a solução foi incubada a 4°C e foram realizadas duas extrações fenol/clorofórmio, o DNA foi ressuspendido em 1 μ l de 50 mM EDTA e 5 μ l de formamida deionizada. A seguir as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% por 14 h.

3.35 Análise das sequências de DNA

As comparações por alinhamento entre os fragmentos de sequências do DsDNV foram realizadas utilizando-se o programa Blasta e Fasta do GeneBank e EMBL e para mapa de restrição e ORFs foi utilizado o programa DNA Strider (MacIntosh).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho serão descritos e discutidos a seguir, subdivididos em 4 itens. O primeiro item relaciona-se à técnica de multiplicação do DsDNV, para sua utilização experimental. Os demais vírus (AdDNV, GmDNV e JcDNV) foram obtidos da coleção do Laboratoire de Pathologie Comparée. No segundo item são discutidos algumas das propriedades gerais dos DNVs, como a densidade e especificidade. As caracterizações e comparações a nível protéico e molecular são relatadas e discutidas respectivamente nos itens 3 e 4.

4.1 Purificação do DsDNV a partir de lagartas de *D. saccharalis*

Grande quantidade de DsDNV foi obtida a partir de purificações em gradiente de renografina. Em parte das purificações realizadas foram observadas duas bandas localizadas à 2,5 e 1,5 cm do fundo do tubo. Estas foram denominadas de B-1 e B-2 respectivamente. A banda B-1 quando observada através de contraste negativo em ME, apresentou somente partículas vazias do vírus, revelando ausência de seu material genético. No entanto, na maioria das amostras purificadas observou-se somente a banda B-2, que em todas as purificações apresentou o vírus inteiro. O resultado de uma destas purificações pode ser observado na Figura 6. As partículas de DsDNV obtidas nestas bandas, mostraram-se posteriormente ser infecciosas. As bandas contendo os vírus, foram dialisadas e estocadas à -20°C para utilização posterior. Observações periódicas das amostras contendo partículas virais completas revelaram um aumento no número de partículas vazias. Supõe-se que alterações frequentes na temperatura (descongelamentos sucessivos) podem ser responsáveis pela degradação observada. Estas informações foram evidentemente consideradas na utilização destas amostras em experimentos de infecciosidade e multiplicação viral, assim como eletroforeses de proteína e DNA.

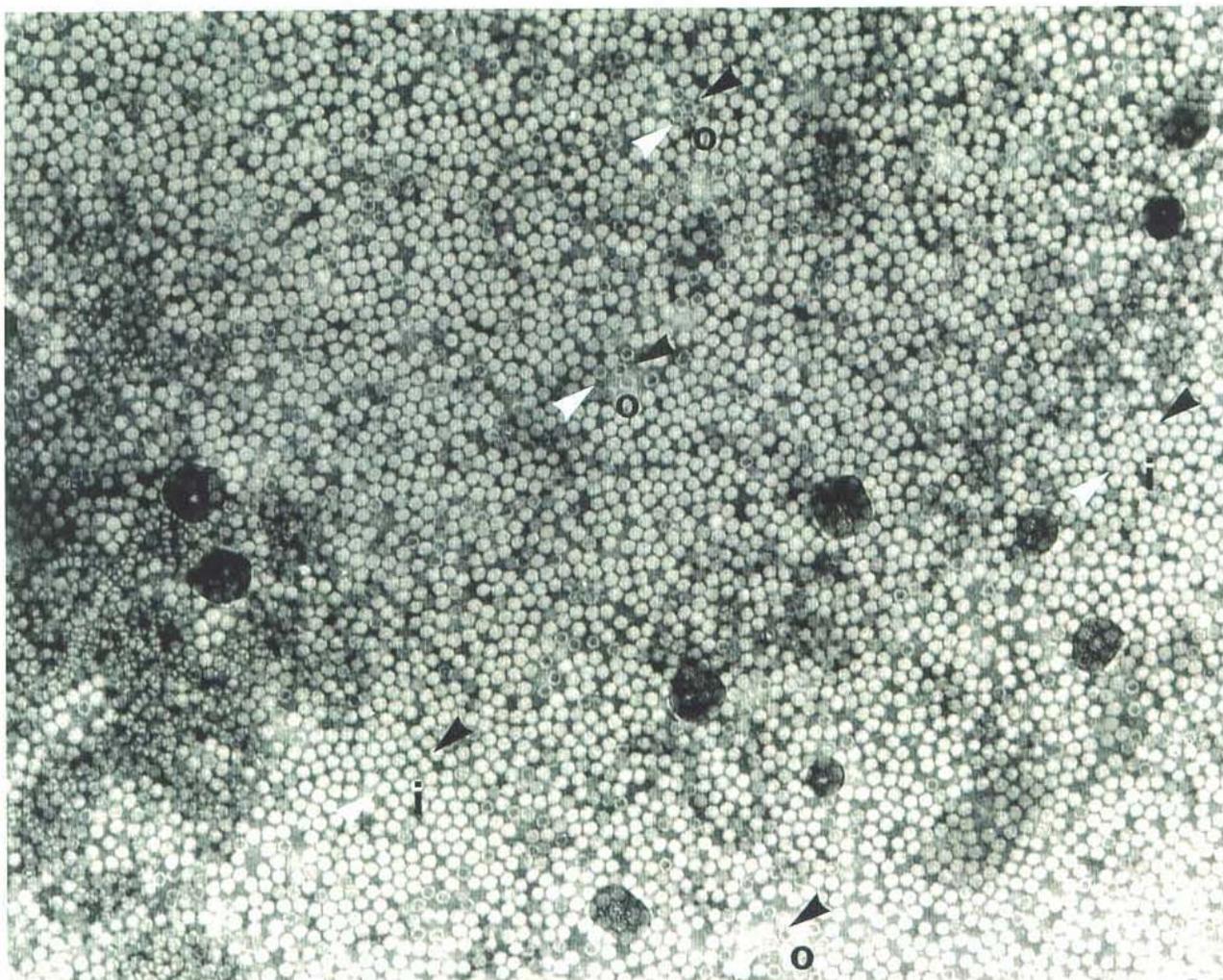


FIGURA 6 - Micrografia eletrônica de uma suspensão viral purificada do DsDNV. Coloração negativa, aumento 31500 X. Pode-se observar capsídeos inteiros (i) e vazios (ôcos - o).

4.2 Características gerais do DsDNV

4.2.1 Densidade do DsDNV

A centrifugação em gradiente de cloreto de cézio revelou a existência de 4 bandas localizadas à 4,5, 2,5, 2,0 e 1,5 cm do fundo do tubo que foram denominadas B-1, B-2, B-3 e B-4 respectivamente. A leitura destas bandas em espectrofotômetro à 254 nm apresentou como pico de maior densidade as alíquotas coletadas na banda B-2, demonstrando a presença de partículas virais inteiras do DsDNV. A banda B-1 quando observada em ME mostrou apenas partículas virais vazias, sem seu DNA. As outras bandas apresentaram partículas defeituosas e restos da purificação. A densidade calculada do DsDNV resultou em 1,39 g/ml nas condições descritas no item Material e Métodos.

Este dado concorda com os descritos na literatura onde os virions inteiros dos DNVs apresentam uma densidade na pequena faixa entre 1,39 e 1,42 g/ml (MATHEWS, 1982 e SIEGL et al., 1985).

4.2.2 Avaliação sobre a especificidade de hospedeiro

A especificidade de hospedeiro foi avaliada primeiramente através de bioensaios onde o DsDNV foi inoculado em lagartas das espécies descritas anteriormente. Os resultados foram então analisados através da taxa de mortalidade, da análise individual das lagartas e insetos infectados por testes ELISA e da análise da hemolinfa dos insetos em contraste negativo em Microscopia Eletrônica. Posteriormente estudou-se a especificidade *in vitro*, através da infecção de linhagens celulares. A presença dos vírus nas células foi analisada pela técnica de imunofluorescência.

4.2.2.1 Multiplicação do DsDNV em lepidópteros

A tentativa de multiplicação do DsDNV foi realizada em uma etapa inicial do trabalho, infectando-se lagartas de *E. khuniella* e *S. littoralis*. Estas espécies foram utilizadas visando-se a obtenção de um hospedeiro alternativo para a multiplicação do vírus devido a inexistência de criações artificiais de *D. saccharalis*, o hospedeiro natural no laboratório de Saint-Christol-les-Alès. Apesar das taxas de mortalidade: 76,2% e 48,7% relativamente altas, o exame da hemolinfa e de macerado de lagartas mortas, quando observados em contraste negativo em ME, não revelaram a presença do vírus.

Estes resultados poderiam ser interpretados sob dois aspectos. A purificação para constatação do vírus, não teria sido eficaz ou a multiplicação dos vírus não teria ocorrido.

Numa segunda etapa visando determinar a especificidade de hospedeiro do DsDNV, as espécies utilizadas inicialmente foram novamente testadas, assim como lagartas de *G. mellonella* e adultos de *A. domestica*.

A verificação da presença do vírus nestas espécies foram realizadas utilizando-se exames através de ME e das técnicas de ELISA e dot blot. O teste ELISA para lagartas de todos os lepidópteros (*E. khuniella*, *S. littoralis*, *Sesamia* sp e *G. mellonella*) assim como para adultos de *A. domestica* apresentaram resultados negativos. As membranas de dot blot quando tratadas com o anticorpo anti-DsDNV também apresentaram resultados negativo, para todos os insetos. Não se detectou, portanto, a presença do vírus por nenhuma das técnicas em nenhuma das espécies testadas.

Estes resultados experimentais indicam que o DsDNV seria espécie-específico como o GmDNV que apesar da grande homologia que apresenta com o JcDNV, não infecta outros hospedeiros. Este por sua vez apresenta uma larga gama de hospedeiros mas não infecta lagartas de *G. mellonella* (GIRAN, 1966; RIVERS & LONGWORTH, 1972; JOUSSET et al., 1986; BELLONCIK, 1990; KAWASE & KURSTAK, 1991).

Os experimentos de inoculação de JcDNV em lagartas de *D. saccharalis*, que tinham por objetivo testar a especificidade de hospedeiro, não puderam ser levadas a termo uma vez que as lagartas utilizadas apresentavam-se contaminadas com partículas de densovirus, provavelmente o DsDNV.

4.2.2.2 Infecção de linhagens celulares

A tentativa de identificação de linhagens permissivas ao DsDNV, foi realizada através de testes de várias linhagens regularmente utilizadas na estação INRA-Saint Christol-les-Alès e que são permissíveis ao JcDNV. A linhagem BCIRL-PX2-HNU3 sem soro foi a única que apresentou resultados positivos para a replicação do DsDNV (Figura 7). As linhagens SPC-PL 65, SPC-SL 52, SPC-GM 17 e Sf-9 mostraram-se ineficientes para multiplicação do DsDNV. As duas primeiras linhagens (SPC-PL 65 e SPC-SL 52) foram utilizadas por LI et al., (1990) com sucesso para infecção e transfecção com o JcDNV.

A linhagem BCIRL-PX2-HNU3 (CHEN et al., 1983) sem soro, infectada com a suspensão viral pura (estoque) e diluída até 10^{-3} submetidas a imunofluorescência apresentaram-se coradas. Pontos fluorescentes demarcando a presença do vírus puderam ser observadas no citoplasma das células.

A observação dos frascos de cultura de células de 25 cm² infectados com DsDNV, mostrou uma diminuição gradual no número de células coradas a cada repicagem. Seis dias após a inoculação foi feito o primeiro teste IF, correspondente a 1^o passagem. Pode-se então observar 100% de células coradas (Figura 7). No final da 3^o passagem, 18 dias após a inoculação, o resultado foi negativo, ou seja, nenhuma célula apresentava-se infectada pelo vírus. É provável que, as células apresentaram-se positivas inicialmente devido à alta concentração do vírus inoculado e posteriormente devido ao vírus residual e não a multiplicação deste. Sabe-se, que o local de replicação destes é no núcleo e, a presença destes vírus apenas no citoplasma parece indicar uma capacidade limitada de infecção. O vírus conseguiria penetrar na célula, mas não atingiria o núcleo e portanto não se multiplicaria.

Esta linhagem, no entanto, mostrou-se permissiva à transfecção do DNA do DsDNV e do plasmídeo pDst50 (KOUASSI, 1993). A taxa de infecção em condições ótimas foi entretanto de 20 %, bem abaixo daquela observada para o plasmídeo contendo o genoma de JcDNV, onde a taxa de infecção é da ordem de 50% das células (LI, 1993).

4.3 Caracterização e analogia a nível protéico

A determinação da massa molecular das proteínas estruturais foi realizada através da eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS. Desta forma, foram estimados as massas moleculares (MM) de todas as proteínas que compõem o capsídeo dos diferentes DNVs estudados até o momento (Tabela 4). O MM das proteínas estruturais do DsDNV, assim como do AdDNV foram aqui pela primeira vez determinadas e comparadas à MM do GmDNV e JcDNV. A comparação entre as proteínas dos DNVs também estendeu-se a nível serológico, observando a atuação dos diferentes anticorpos frente aos diferentes antígenos. Para isso utilizou-se o Dot e Western Blot.

4.3.1 Determinação da massa molecular das proteínas estruturais

A princípio foram estabelecidas as condições ideais para a preparação e resolução dos géis. Das duas concentrações de acrilamida utilizadas nos géis a que mostrou melhor resolução foi a de 8,5 %. Quanto ao tamanho do gel, não houve diferença significativa, por isso utilizou-se o minigel na determinação do peso molecular das proteínas.

A MM das quatro proteínas estruturais dos DNVs analisados foram estimados através de uma média de todos os géis obtidos. Para os quatro vírus a proteína presente em maior quantidade foi VP4, a de menor MM. A proteína encontrada em menor concentração foi VP1, que apresenta a maior MM. A MM de cada uma das proteínas dos diferentes DNVs, pode ser observada na Tabela 5 e Figura 8.

A massa molecular das proteínas estruturais do DsDNV e do AdDNV foram pela primeira vez determinadas. Para o DsDNV obteve-se os valores a seguir referentes às MMs de VP1, VP2, VP3 e VP4 107600, 72500, 55200 e 45200 Da para . Para o AdDNV obteve-se os valores de 120200, 8800, 50500 e 41500 Da. Para o JcDNV obteve-se 102600, 67600, 54800 e 45000 Da e para o GmDNV os resultados foram 104600, 72600, 59200 e 47500 Da. As proteínas do JcDNV e GmDNV foram amplamente estudadas e caracterizadas anteriormente (TIJSSEN et al., 1976, 1982; KELLY et al., 1980 e FÉDIÈRE 1983).

A exemplo da maioria dos DNVs estudados, o DsDNV apresenta 4 proteínas estruturais, dentro da faixa de variação descrita na literatura de 42 a 110 kDa (ver Tabela 2). A concentração relativa das proteínas virais também encontra-se dentro do padrão descrito para estes vírus. Ou seja, a VP1 é a encontrada em menor concentração enquanto que VP4 em maior. A utilização de partículas virais vazias do DsDNV (sem o DNA) neste experimento mostrou uma variação no perfil protéico. Segundo TIJSSEN et al., (1982) as proporções

relativas de uma mesma proteína podem se alterar segundo o estágio de desenvolvimento larval, sugerindo uma variação na síntese e no mecanismo de maturação.

Para o AdDNV obteve-se para VP1 uma MM de 120 kDa, um pouco acima do observado na literatura. Em todos os géis notou-se uma banda muito fraca logo abaixo de VP4, esta foi considerada como um artefato, já que até então, todos os DNVs apresentavam 4 proteínas relacionadas ao capsídeo. Posteriormente a estes experimentos foi caracterizado o AaDNV que é totalmente diferente, pois possui somente dois polipeptídeos estruturais de 40 e 38 kDa (AFANASIEV et al., 1991). O AaPV descoberto e caracterizado neste laboratório possui 3 polipeptídeos estruturais de 53, 41 e 40 kDa (JOUSSET et al., 1993). Estes vírus, apresentam um genoma menor que os DNVs típicos, enquadrando-se num novo grupo de parvovírus de inseto. O perfil protéico do AdDNV deve ser reestudado, assim como outras de suas características.

Para as MMs obtidas para o JcDNV, assim com para o GmDNV, encontramos uma pequena diferença em relação às MMs anteriormente verificados por outros pesquisadores. Estas discrepâncias podem ser atribuídas às técnicas empregadas, assim como à manipulação. Para a obtenção da MM destas proteínas vários autores utilizaram diferentes concentrações de acrilamida e a média destes resultados (NAKAGAKI & KAWASE, 1980 e KELLY et al., 1982).

TABELA 5 - Pesos moleculares (Da) das 4 proteínas estruturais dos Densovírus de *J. coenia*, *D. saccharalis*, *A. domestica* e *G. mellonella*.

Proteínas	JcDNV	DsDNV	AdDNV	GmDNV
VP1	102600	107600	120200	104600
VP2	67600	72500	88000	72600
VP3	54800	55200	50500	59200
VP4	45000	45200	41500	47500

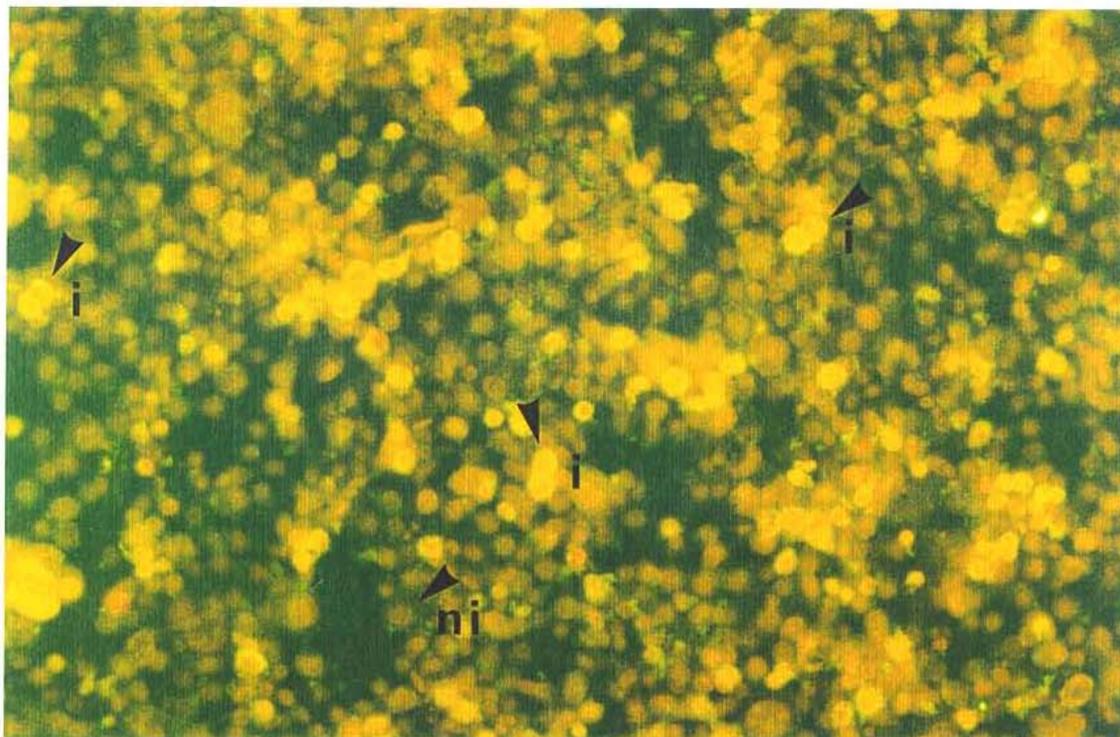


FIGURA 7 - Linhagem celular PX2 ss, observada através de imunofluorescência, mostrando células fluorescentes indicando a presença do DsDNV. As células mostradas nesta fotomicrografia correspondem a 6 dias após o inóculo. As flechas mostram células infectadas (i) e não infectadas (ni).

4.3.2 Relações antigênicas

4.3.2.1 Dot blot

Em experimentos preliminares, determinou-se a diluição ideal para os anticorpos, obtidos de estoques do laboratório, com titulação desconhecida. A partir da solução estoque escolheu-se a diluição de 1/1000 pois esta foi suficiente para detectar a menor concentração para todos os DNVs estudados, ou seja, o anti-JcDNV foi capaz de detectar 10 pg do JcDNV, assim como o anti-DsDNV revelou 1 ng do DsDNV, o anti-AdDNV revelou 10 ng do AdDNV e o anti-GmDNV revelou 1 ng GmDNV. Ou seja, utilizamos a concentração do anticorpo que foi capaz de revelar a menor concentração de seu antígeno homólogo.

A princípio, os resultados obtidos serviriam para orientar na escolha das concentrações dos vírus a serem utilizados em experimentos posteriores, como eletroforese de proteína seguido de Western Blot.

O vírus com menor reatividade com seu próprio anticorpo foi o AdDNV, que detectou 10 ng de seu antígeno (Tabela 6), assim como a mesma concentração do JcDNV e GmDNV, foi ainda capaz de detectar uma concentração do DsDNV, de 100 ng. O anti-GmDNV detectou 1 ng do GmDNV e do JcDNV e 10 ng do DsDNV, reconhecendo tão bem seu próprio antígeno, quanto o JcDNV. O mesmo resultado em termos de afinidade pode ser observado para o anti-JcDNV que detecta em concentrações iguais seu próprio antígeno, quanto o GmDNV em 10 pg, o DsDNV foi detectado na concentração de 1 ng. O anti-DsDNV detectou 1 ng de seu antígeno DsDNV assim como do JcDNV e do GmDNV. Dos três últimos anticorpos citados nenhum foi capaz de detectar a presença do AdDNV (Tabela 6).

Estes resultados parecem indicar que a semelhança à nível serológico observada entre o JcDNV e GmDNV pode incluir também no mesmo grupo o DsDNV, já que os três foram detectados entre si pelos diferentes anticorpos. É interessante salientar que os três pertencem à classe lepidoptera.

TABELA 6 - Concentrações virais mínimas (ng) reveladas pelos diferentes anticorpos.

Vírus	Anti-JcDNV	Anti-DsDNV	Anti-AdDNV	Anti-GmDNV
JcDNV	0,01	1	10	1
DsDNV	1	1	100	10
AdDNV	-	-	10	-
GmDNV	0,01	1	10	1

4.3.2.2 Western Blot

O anti-JcDNV foi capaz de detectar (Tabela 7A) suas 4 proteínas estruturais na seguinte intensidade, VP2 forte, VP1 média, VP3 e VP4 fracas. Este resultado foi semelhante na detecção das proteínas estruturais do DsDNV, na mesma ordem e intensidades. Quanto ao GmDNV e AdDNV o anti-JcDNV revelou fracamente VP1 e VP2 respectivamente, não sendo capaz de reconhecer as outras proteínas destes dois vírus.

O anti-DsDNV (Tabela 7B) detectou suas 4 proteínas na seguinte intensidade VP1 forte, VP2 media, VP3 e VP4 fracas. Quanto as proteínas do JcDNV detectou VP1 e VP2 nas intensidades forte e média respectivamente, mas VP3 e VP4 deste vírus não foram reveladas pelo anti-DsDNV. Das proteínas que compõem o virion do GmDNV VP1 foi detectada numa intensidade fraca e as outras três não reagiram com este anticorpo. As proteínas do AdDNV não foram reveladas por este anticorpo.

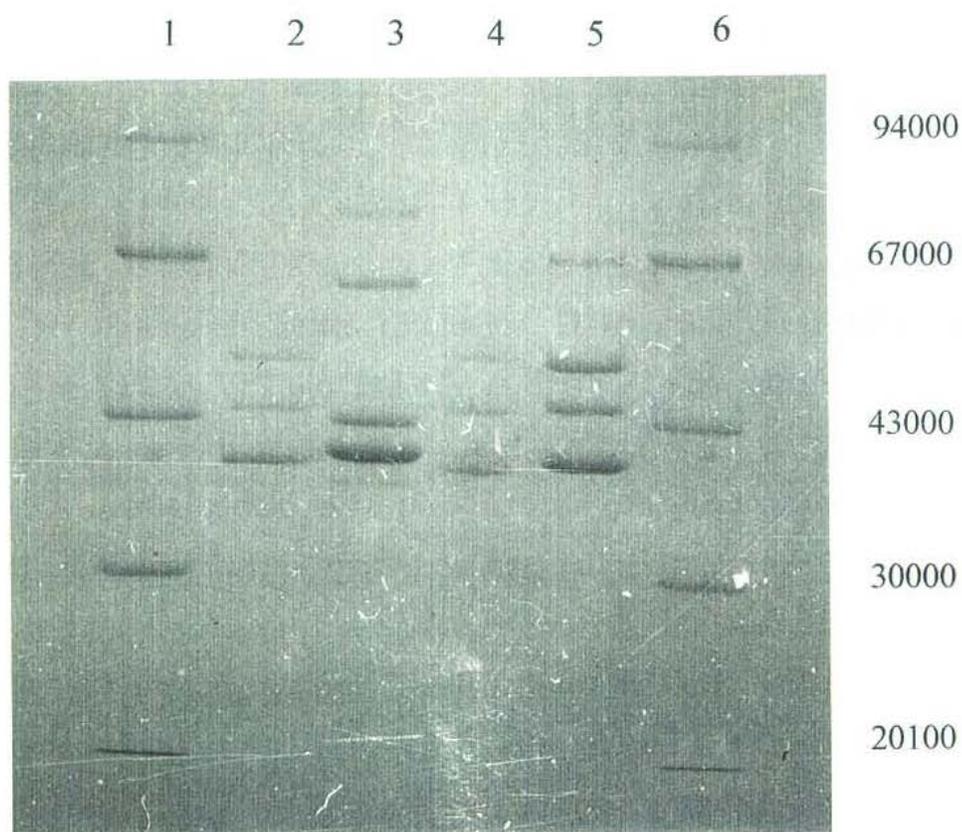


FIGURA 8 - SDS-PAGE das proteínas estruturais dos 4 DNVs analisados. As colunas 1 e 6 correspondem ao padrão de PM, a 2-JcDNV, 3-AdDNV, 4-DsDNV e 5-GmDNV. Pode-se notar a maior concentração de VP4, assim como a menor de VP1.

O anti-AdDNV (Tabela 7C) detectou VP1 e VP2 de sua partícula na intensidade média, e na mesma intensidade as VP1 e VP2 do DsDNV e JcDNV. Nenhuma das proteínas do GmDNV foi detectada por este anticorpo.

O anti-GmDNV (Tabela 7D) detectou sua VP2 na intensidade forte e VP1, VP3 e VP4 na intensidade fraca. Este anticorpo detectou fracamente as proteínas VP1 de JcDNV e VP2 de DsDNV e AdDNV.

A semelhança das relações serológicas entre as proteínas estruturais do DsDNV e JcDNV podem ser observadas nestes resultados. O resultado inesperado quanto ao reconhecimento de VP1 e VP2 do DsDNV e JcDNV pelo anti-AdDNV pode ser explicada pela pouca especificidade de seu anti-soro, já que suas proteínas não são reconhecidas pelos outros anticorpos e pelo fato de seu anticorpo reconhecer numa intensidade média apenas duas de suas proteínas, coincidentemente as mesmas. Este resultado pode ser comparado ao dot blot onde este mesmo anti-soro detectou as mesmas concentrações de seu próprio antígeno, assim como do JcDNV e GmDNV e uma concentração menor ainda de DsDNV. A literatura mostra o alto grau de homologia existente entre o JcDNV e o GmDNV, porém aqui os resultados mostram que o anti-GmDNV quase não reage com as proteínas do JcDNV. Este resultado pode ter sido causado pela idade do anti-soro empregado neste experimento. Todos os anti-soros faziam parte da coleção do laboratório, tendo sido preparados há alguns meses e até anos. O anti-soro mais recente foi preparado para o DsDNV.

TABELA 7 - Nesta tabela pode-se observar as proteínas detectadas pelos diferentes anti-soros. A) Anti-JcDENV, B) Anti-DsDENV, C) Anti-AdDENV e D) Anti-GmDENV. Os sinais +++, ++, + e - mostram a intensidade de reação, forte, média, fraca e sem reação.

A (Anti-JcDENV)

Vírus	VP1	VP2	VP3	VP4
JcDENV	++	+++	+	+
DsDENV	++	+++	+	+
AdDENV	-	+	-	-
GmDENV	+	-	-	-

B (Anti-DsDENV)

Vírus	VP1	VP2	VP3	VP4
JcDENV	+++	++	-	-
DsDENV	+++	++	+	+
AdDENV	-	-	-	-
GmDENV	+	-	-	-

C (Anti-AdDENV)

Vírus	VP1	VP2	VP3	VP4
JcDENV	++	++	-	-
DsDENV	++	++	-	-
AdDENV	++	++	-	-
GmDENV	-	-	-	-

D (Anti-GmDENV)

Vírus	VP1	VP2	VP3	VP4
JcDENV	+	-	-	
DsDENV	-	+	-	-
AdDENV	-	+	-	-
GmDENV	+	+++	+	+

4.3.3 Considerações gerais sobre a comparação dos AddNV, DsDNV, GmDNV e JcDNV a nível protéico

Os resultados obtidos nestes experimentos colocam num mesmo grupo o DsDNV, o JcDNV e o GmDNV. Estes três vírus apresentaram massas moleculares entre 41500 e 107600 Da o que os coloca na mesma faixa de variação descrita para os vírus de lepidópteros que tiveram estimados as massas moleculares de suas respectivas proteínas estruturais. A faixa de variação destas proteínas encontra-se entre 29000 e 110000 Da determinadas por vários autores (TIJSSEN et al., 1976, 1982; KELLY et al., 1980; NAKAGAKI & KAWASE, 1980; FÉDIÈRE et al., 1980; GRIGNON, 1982 e CHAO et al., 1985). Portanto, o DsDNV que teve pela primeira vez estimado a massa molecular de suas proteínas estruturais apresenta esta semelhança com estes dois vírus. O AddNV que também teve pela primeira vez estimada esta massa molecular apresentou a massa de VP1 ligeiramente acima das descritas na literatura para outros DNVs, assim como a presença de uma quinta banda protéica, diferindo assim dos três outros vírus estudados neste trabalho.

Outra característica que poderia agrupar o DsDNV e o GmDNV está relacionada à especificidade de hospedeiro. O DsDNV parece ser restrito ao inseto no qual ele foi isolado, assim como o GmDNV. Neste ponto eles diferem do JcDNV que é capaz de infectar outras espécies de lepidópteros como *Mamestra brassicae*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera littoralis*, *Bombyx mori*, *Limantria dispar* e *Aglais urticae*, mas não infecta lagartas de *G. mellonella*. Apesar da homologia constatada entre JcDNV e GmDNV (KELLY et al., 1977 e JOUSSET et al.1990), eles não se comportam de forma semelhante em relação a especificidade de hospedeiro. Como foi observado nestes experimentos o DsDNV não é capaz de infectar lagartas de *S. littoralis*, na qual os JcDNVs são multiplicados, nem lagartas de *G. mellonella*, comportando-se, portanto, como GmDNV que é altamente específico. Não

se pode constatar se o JcDNV poderia se multiplicar em lagartas de *D. saccharalis*, devido à contaminação das mesmas.

Outro fator que indica a semelhança entre estes três vírus pode ser observado no experimento de dot blot. Os anticorpos anti-virions de DsDNV, JcDNV e GmDNV foram incapazes de reconhecer o virion do AdDNV. O fato do anti-JcDNV reconhecer tão bem o seu antígeno, assim como o de GmDNV, e o anti-GmDNV agir de maneira semelhante confirma os dados encontrados na literatura. O DsDNV comporta-se de da mesma forma reconhecendo seu próprio antígeno, assim como os outros dois na mesma concentração.

A comparação entre os DsDNV, GmDNV e JcDNV através de Western Blot veio confirmar a relação entre eles. Os diferentes anti-soros se reconhecem entre si, mas não reconhecem as proteínas do AdDNV, sem fornecer dados mais conclusivos à respeito destas semelhanças. Foi observado que o anticorpo anti-virion do JcDNV e DsDNV reconhecem seus quatro componentes estruturais variando em intensidade. A intensidade de reconhecimento de VP4 sempre foi fraca, o que seria explicado pelos resultados de MOORE & KELLY, 1980 que sugerem que VP4 seja a mais interna das proteínas que compõem o capsídeo.

Um grande aumento na sensibilidade de reconhecimento das proteínas pelos anticorpos poderia ser realizado através da preparação de anticorpos para cada uma das proteínas estruturais de cada vírus estudado. Assim como, a preparação de anticorpos monoclonais para os diferentes vírus e proteínas. Testes preliminares foram realizados com anticorpos anti-VP1 e anti-VP2 do JcDNV, sem que tivéssemos resultados conclusivos devido ao tempo e condições de estocagem destes anticorpos.

4.4 Caracterização e analogia a nível de DNA

A comparação entre o AdDNV, DsDNV, GmDNV e JcDNV foi feita através da utilização de uma sonda fria, partindo-se do DNA total de cada um dos diferentes vírus, inicialmente através de Dot Blot e em seguida por Southern Blot. Foi feito o sequenciamento de parte do genoma do DsDNV, permitindo compara-lo com os de GmDNV e JcDNV que já tinham seu genoma sequenciado.

4.4.1 Determinação das concentrações de DNA detectadas pelas diferentes sondas

Foram definidas experimentalmente através da hibridização de DNA por dot blot as concentrações mínimas de DNA detectadas por suas próprias sondas de DNA total e das outras três sondas. Na tabela 8 podemos observar que a sonda constituída pelo DNA total do AdDNV não reconhece nenhum outro DNA a não ser o seu próprio na quantidade mínima de 0,078 ng. Pode-se observar também que as sondas DNA total dos outros três vírus estudados não foram capazes de reconhecer o DNA do AdDNV, mesmo numa concentração mais elevada. As outras três sondas reconheceram seus respectivos DNAs, assim como dos outros dois vírus relacionados. Ou seja, a concentração mínima de DNA de DsDNV reconhecida por sua própria sonda total foi 0,078 ng, a mesma quantidade de DNA para o GmDNV e 0,625 ng de DNA do JcDNV. A sonda DNA total de GmDNV detecta 0,156 ng de DNA, 50 ng do DNA de DsDNV e 500 ng do DNA de JcDNV. A sonda DNA total de JcDNV reconhece tão bem seu DNA quanto o DsDNV na concentração de 1,25 ng e 2,5 ng do DNA de GmDNV.

Estes resultados mostram que este método pode ser empregado para uma detecção rápida da presença do vírus, mesmo em pequenas concentrações. Estes dados também serviram para calcular as concentrações de DNA que deveriam ser utilizadas nos experimentos de Southern Blot.

TABELA 8 - Concentrações mínimas (em ng) de DNA detectadas por sondas DNA totais do AdDNV, JcDNV, DsDNV e GmDNV.

Sonda/ADN	AdDNV	DsDNV	GmDNV	JcDNV
AdDNV	0,078	-	-	-
DsDNV	-	0,078	50	1,25
GmDNV	-	0,078	0,156	2,5
JcDNV	-	0,625	500	1,25

4.4.2 Eletroforese de DNA

Aproximadamente 1 µg de DNA de fita simples de AdDNV, DsDNV, GmDNV e JcDNV foram analisados em gel de agarose à 1%. Os resultados obtidos revelaram estes DNAs com aproximadamente os mesmos tamanhos descritos na literatura. Ou seja, 5,2, 5,9, 5,85 e 5,85 kb para de AdDNV, DsDNV, GmDNV e JcDNV respectivamente (Figura 9).

A faixa de variação dos DNAs dos DNVs está entre 4,8 kb para o *Aedes* DNV (AFANASIEV et al., 1991) e 6 kb para o JcDNV, GmDNV e PiDNV (BARWISE & WALKER, 1970; JOURDAN et al., 1990 e CHAO et al., 1985) (Tabela 9).

Utilizando a análise em ME, eletroforese do DNA inteiro e da soma dos produtos de digestão, KOUASSI, 1993 estimou que o DNA do DsDNV possui 5950 bases.

TABELA 9 - Peso molecular do genoma de diferentes Densovirus.

DENSOVIRUS	PM (kb)	REFERÊNCIAS
GmDNV	6	BARWISE & WALKER, 1970
JcDNV	6	JOURDAN, 1990
AdDNV	5,2	JOUSSET et al., 1986
CeDNV	4,9	FÉDIÈRE et al., 1991
PiDNV	6	CHAO et al., 1985
BmDNV1	5	BANDO et al., 1987a
<i>Agraulis</i> DNV	5,5	KELLY et al., 1980a
<i>Aedes</i> DNV	4,8	AFANASIEV et al., 1991

4.4.3 Southern blot

Cada um dos DNAs virais empregados foram cortados com enzimas de restrição de forma a serem obtidos de 3 a 4 fragmentos sendo, a escolha das enzimas feita baseada em mapas de restrição e experimentos realizados no laboratório (JOUSSET, comunicação pessoal). Na figura 11 A pode-se observar os diferentes padrões obtidos. Para o DNA de AdDNV obteve-se fragmentos de aproximadamente 2840, 1590, 430 e 340 pb, para a enzima Cla I e 2540, 1580 e 1080 pb, para Hind III (pista 2 e 3, respectivamente). Para o DNA de DsDNV observa-se fragmentos de 3080, 2150 e 620 pb para Hind II e de 3150, 1900 e 800 pb para Nco I (pistas 4 e 5). A digestão do DsDNV (pista 4) apresenta uma quarta banda no topo do gel que corresponde ao DNA total, não tendo, portanto sido totalmente digerido. Para

GmDNV 3580, 1370 e 900 pb para Bgl II e de 4000, 1000, 700 e 150 pb para Hind III. Para o DNA de JcDNV cortado com Eco RI e Hind II obteve-se respectivamente 3500, 1500, 550 e 300 pb e 3450, 1350 e 1050 pb.

Os resultados obtidos após a transferência das bandas para as membranas e hibridização com sondas de DNA total podem ser vistos na Figura 10B, C, D e E. Nota-se nesta figura que a sonda do AdDNV só se hibridiza com seu próprio DNA digerido, não apresentando reação com quaisquer outros, fato que pode confirmar os resultados preliminares obtidos através de dot. Observando-se as pistas 2 e 3 das figuras 11A e 11B pode-se ver uma banda no topo do gel que corresponde ao DNA não digerido de AdDNV.

A sonda de DNA total do DsDNV (C) hibridiza-se com todos os fragmentos de digestão, mostrando também uma banda correspondente ao DNA não digerido. Hibridiza-se também com os produtos de digestão das enzimas empregadas para o GmDNV e para o JcDNV. Além destas bandas observa-se a hibridização com fragmentos entre as bandas principais mostrada na Figura 10 A. Estas bandas correspondem provavelmente a digestões incompletas das enzimas empregadas. A sonda de DNA total de DsDNV não reconhece nenhum fragmento de DNA do AdDNV.

A sonda DNA total de GmDNV (D) reconhece a banda correspondente ao DNA não digerido de DsDNV, assim como os produtos de digestão de Hind III, na pista 5 correspondente à Nco I não pode-se observar a hibridização com a banda correspondente à 800 pb. Quanto ao seu próprio DNA digerido todas as bandas são observadas, assim como bandas intermediárias correspondentes à digestão parcial ou incompleta. O mesmo pode ser observado nas pistas 8 e 9 correspondentes aos produtos de digestão do JcDNV.

A sonda DNA total de JcDNV (E) reconhece no DNA de DsDNV duas das bandas digeridas por Hind III e Nco I, mas as duas bandas de menor PM produtos de digestão por estas enzimas não foram detectadas, além disto observa-se o DNA não digerido. Aqui pode-se supor que a baixa concentração não permitiu que estes fragmentos fossem detectados, ou que aí reside uma diferença entre os dois vírus. As bandas obtidas pela digestão do DNA de GmDNV pelas duas enzimas empregadas foram hibridizadas, assim como produto de digestão parcial eo DNA total não digerido. O mesmo pode ser observado para o seu próprio DNA. Nenhuma destas três outras sondas hibridiza com os fragmentos do AdDNV.

A utilização desta técnica visava o reconhecimento parcial dos diferentes DNAs pelas diferentes sondas, ou seja, se a banda referente a um determinado produto de digestão teria seu correspondente na sonda DNA total de outro vírus. Mas, além da ausência de reconhecimento das bandas de menor PM do DsDNV pelas sondas DNA total de GmDNV e JcDNV, não pode-se detectar onde o DNA hibridizava onde seria diferente.

Os resultados aqui obtidos mostram que as sondas DNA totais correspondentes aos vírus isolados de lepidópteros se reconhecem mutuamente, mas não apresenta nenhuma semelhança com aquele isolado de um ortóptero, ou seja, o AdDNV, empregado neste trabalho. Um aperfeiçoamento desta técnica poderia ser obtido através do corte do ADN total de cada um dos vírus em fragmentos menores e também do preparo de sondas parciais, correspondentes a regiões específicas de cada um deles. Como o prosseguimento do trabalho seria a utilização de uma técnica mais detalhada, o sequenciamento do DsDNV, a análise comparativa destas seqüências foi preferida em relação ao prosseguimento das análises por Southern.

4.4.4 Sequenciamento do DsDNV

Através desta técnica foram sequenciadas 2220 bases que compõem o genoma do DsDNV. Os 557 pb iniciais sequenciados foram posicionados no sentido de leitura 5'→3' são mostrados na Figura 12 e correspondem aos insertos presentes nos plasmídeos denominados pA e pB, que contêm os fragmentos denominados A e B (entre o primeiro nucleotídeo e o sítio Hinc II) como mostrado na Figura 11. As fitas foram sequenciadas nos dois sentidos mostrando sua complementariedade. A seguir obteve-se a sequência de 1663 pb, que correspondem ao início do fragmento D até o final do fragmento I (entre o sítio Pst I e o Eco R I), correspondentes aos insertos contidos nos plasmídeos pD até pI. Para obtenção deste fragmento contínuo foi preciso o sequenciamento dos fragmentos E, F, H, I e J (Figura 11). Os nucleotídeos correspondentes a esta sequência podem ser observados na Figura 13. Estas sequências foram denominadas pAB e pDI. O fragmento correspondente ao inserto G não pode ser sequenciado. Com estas sequências analisadas através do programa DNA Strider pode-se obter uma mapa de restrição mais detalhado destes dois fragmentos (Figura 15 A e B) assim como as enzimas que estão ou não presentes e quantos sítios possuem. Esta mapa bem mais detalhado pode ser comparado ao mostrado na Figura 5, obtido por KOUASSI, 1993. Este programa também mostra as seis traduções possíveis destas sequências. Na Figura 15, linha 3 pode ser observado um quadro de leitura aberto (ORF), provavelmente correspondente ao ORF 1.

A sequência pAB (inicial) e pDI (final) quando comparadas ao banco de dados revelou grande identidade com as sequências do GmDNV e JcDNV, entre outros (Figura 16 e 17). Pode-se notar nesta lista que a sequência pDI apresentou pequena identidade com BmDNV. O alinhamento destas sequências com os diferentes vírus podem ser observados nas Figuras 18 à 23.

Observando-se a Figura 12 pode-se observar na posição 232-237, o sítio BamH I (GGATCC) que é encontrado fazendo parte das extremidades tanto do JcDENV quanto do GmDENV (JOUSSET et al., 1990). Estando os dois sítios posicionados nas respectivas ITRs de cada um deles. Esta região como sabe-se é uma região não codificadora envolvida na replicação (BANDO et al., 1990; JOURDAN et al., 1990; JOUSSET et al., 1990 e TIJSSEN et al., 1990).

Na Figura 18 pode-se observar o alinhamento da sequência pAB no sentido 5'→3' alinhada com a sequência do GmDENV no mesmo sentido. Este alinhamento mostra um total de 451 bases sobrepostas com 82 % de identidade. O grau de identidade é dado pelo programa (Fasta) empregado nestas análises, em função do número de bases comparadas com o número de bases superpostas.

A Figura 19 mostra os mesmos genomas alinhados. O do DsDENV no sentido 3'→5' e o GmDENV no sentido 5'→3'. Nota-se que o alinhamento aqui se faz com a sequência final do GmDENV. O total de bases superpostas é de 484 com identidade de 82 %. Pode-se notar nas duas figuras o sítio BamH I, presente nos dois genomas.

Nas figuras 21 e 22 o alinhamento de pAB do DsDENV é feito com sequências do genoma do JcDENV. Os alinhamentos do genoma do JcDENV foram realizados sempre no sentido 5'→3'. Os traços horizontais observados mostram bases ausentes em um ou outro genoma. Na Figura 20 o alinhamento do DsDENV é feito no sentido 5'→3', nota-se o sítio BamH I, assim como o início do quadro de leitura das proteínas estruturais (ORF 1) do JcDENV. O alinhamento se fez com as bases iniciais do JcDENV. Na Figura 21 é mostrado o alinhamento do DsDENV feito no sentido 3'→5' com as bases finais do genoma do JcDENV e também o sítio BamH I.

Pode-se inferir a partir dos dados obtidos através dos alinhamentos mostrado nestas quatro figuras que, estes 557 pb iniciais do DsDNV fazem parte de suas ITRs, visto que o JcDNV apresenta 517 pb (DUMAS et al., 1992) e o GmDNV 350 pb (TIJSEN, 1990) e os dois apresentam o sítio BamH I em suas ITRs. Nota-se que o DsDNV apresenta como o JcDNV uma sequência semelhante à TATATATAAA, considerada uma sequência "enhancer" e posicionada logo antes do início do OFR 1. Pode-se, portanto, inferir que o início do OFR 1 do DsDNV também seja similar em termos de posicionamento ao do JcDNV e, que este ORF 1 se inicie à 510 pb do início do genoma.

As seis primeiras bases da sequência pDI correspondem ao sítio de restrição de Pst I. Este sítio é único no genoma do DsDNV e foi posicionado à 1650 b do início do genoma na mapa de restrição obtido anteriormente, por KOUASSI, 1993. Considerando este dado, a base número um desta sequência corresponde à aproximadamente à base 1650 do genoma do DsDNV, assim teríamos a base 1663 na posição 3313 do genoma do DsDNV. A Figura 13 mostra a sequência pDI no sentido 5'→3'. Esta sequência quando traduzida pelo programa DNA Strider foi comparada com a sequência traduzida do JcDNV. Essa comparação mostra que após os dois nucleotídeos CC marcados na figura e posicionados pouco antes do sítio Spe I (ACTAGT) existe uma diferença entre as duas sequências. Existe uma ausência de 69 nucleotídeos no genoma do DsDNV resultando na presença 23 aa a mais para o JcDNV quando comparado ao DsDNV. Nesta sequência de 69 nucleotídeos está localizado final do ORF 1 do JcDNV e o início do ORF 2. Mesmo com estes nucleotídeos ausentes a comparação da sequência de aa entre os dois genomas mostra o final de ORF 1 e o o início do ORF 2 do DsDNV (dados não mostrados).

Na Figura 22 a sequência pDI do DsDNV foi alinhada em seu sentido reverso (3'→5') com sequência do GmDNV no sentido 5'→3'. O total de bases homólogas foi de 1264 bases (a sequência pDI apresenta 1663 bases) sendo o grau de identidade estimado em 79,8%.

Na Figura 23 esta sequência do DsDNV foi alinhada em seu sentido 5'→3' com a sequência do JcDNV também no sentido 5'→3'. A identidade é de 79,6 % com 1266 bases superpostas.

4.4.4 Considerações gerais sobre a comparação entre o AdDNV, DsDNV, GmDNV e JcDNV a nível genômico

Primeiramente o reconhecimento pela sondas DNA total dos três diferentes DNVs (DsDNV, GmDNV e JcDNV) veio confirmar a relação entre eles observada desde os primeiros resultados como eletrofoerese de proteínas em que apresentam MMs próximos para suas proteínas estruturais.

Vários dos resultados obtidos colocam os três vírus no mesmo grupo e, embora os resultados obtidos através de Southern Blot não tenham permitido dados conclusivos em relação às suas diferenças, estes permitiram excluir o AdDNV deste grupo. Outros resultados como, MM das proteínas, relação serológica e tamanho do genoma também permitiram sua exclusão do grupo.

Os DsDNV, GmDNV e o JcDNV apresentam características em comum em seu mapa de restrição, como por exemplo a presença dos sítios BamH I e Hha I nas duas extremidades do genoma (JOUSSET et al., 1990 e KOUASSI, 1993). A presença de dois sítios Hind II nos genomas também é característica comum aos três. Existem porém, em relação ao mapa de restrição características únicas para cada um deles. Uma delas é a ausência no DsDNV do

sítio Hind III, comum aos outros dois vírus. A presença do sítio Cla I é comum somente ao DsDNV e ao GmDNV e esta presente uma única vez no genoma. O sítio Pvu II está ausente no genoma do DsDNV, mas presente num único ponto dos genomas de GmDNV e JcDNV.

Em relação ao sequenciamento o grau de identidade da sequência pAB do DsDNV quando alinhada e comparada com o genoma de GmDNV e do JcDNV foi sempre acima de 82 % tanto em seu sentido de leitura quanto no sentido reverso. Este grau de identidade também foi da ordem de 80 % na sequência pDI na comparação com os mesmos vírus. Considerando-se que existem 2220 bases sequenciadas do genoma total de DsDNV e que o genoma total possui 5950 bases, mais de um terço deste genoma é altamente homólogo aos dois DNVs comparados.

A sequência pAB pode ser considerada a ITR do DsDNV, devido à sua identidade tanto com as bases iniciais como as finais do genoma do GmDNV e do JcDNV. Pode-se inferir também que esta sequência considerada inicial no genoma seja também, a sequência final, já que no genoma do JcDNV existe homologia entre a base 89-518 e 5884-5313 do genoma.

O posicionamento da sequência pDI em sentido reverso com o genoma do GmDNV no sentido 5'→3' e, este alinhamento estar posicionado na metade direita do genoma do GmDNV e desta mesma sequência pDI se posicionar no sentido de leitura e na metade esquerda do genoma de JcDNV parece mais uma vez indicar que o DsDNV se comporta em relação à sua organização genômica como o JcDNV. Este, tem do seu lado esquerdo no sentido 5'→3' seu ORF 1 (DUMAS et al., 1992). Já TIJSEN, 1986 e TAL & ATTATHOM, 1993 sugerem uma organização diferente para o GmDNV, onde o ORF relacionado à suas proteínas estruturais estaria posicionado do lado direito, no sentido 3'→5' da fita complementar. Isto confirmaria a hipótese de que o DsDNV se comporta como o JcDNV. Além disso junta-se a

estas evidências o fato do DsDNV apresentar uma sequência semelhante ao "enhancer" TATATATAAAA encontrada antes do início do ORF 1 em JcDNV.

Todos os resultados obtidos indicam a identidade entre estes três vírus. O sequenciamento total do genoma do DsDNV pode mostrar onde residem as pequenas diferenças que podem estar associadas à especificidade de hospedeiro. Como foi mostrado tanto o DsDNV quanto o GmDNV só se multiplicam nos insetos nos quais eles foram isolados, enquanto o JcDNV, se multiplica em várias outras espécies de lepidópteros. Uma comparação mais detalhada destes genomas poderia nos dar uma importante ferramenta para conhecer e estudar este tipo de interação, que poderia ser extrapolada para outros parvovírus de vertebrados.



FIGURA 9 - Padrão eletroforético do DNA total de AdDNV, DsDNV, GmDNV e JcDNV nas pistas 2, 3, 4 e 5 respectivamente. Nas pistas 1 e 6 estão os padrões de pesos moleculares I e VII.

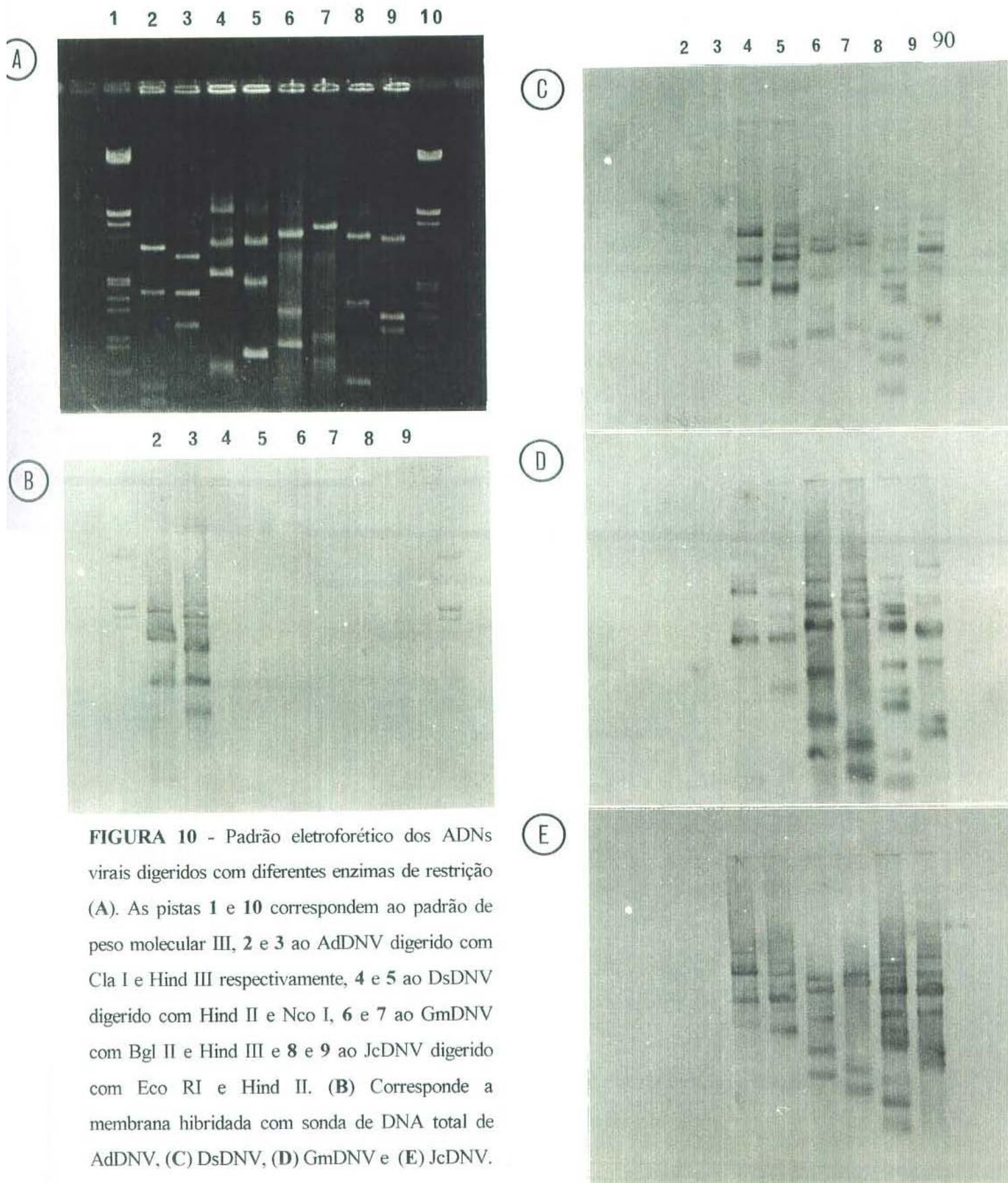


FIGURA 10 - Padrão eletroforético dos ADNs virais digeridos com diferentes enzimas de restrição (A). As pistas 1 e 10 correspondem ao padrão de peso molecular III, 2 e 3 ao AdDNV digerido com Cla I e Hind III respectivamente, 4 e 5 ao DsDNV digerido com Hind II e Nco I, 6 e 7 ao GmDNV digerido com Bgl II e Hind III e 8 e 9 ao JcDNV digerido com Eco RI e Hind II. (B) Corresponde a membrana hibridada com sonda de DNA total de AdDNV, (C) DsDNV, (D) GmDNV e (E) JcDNV.

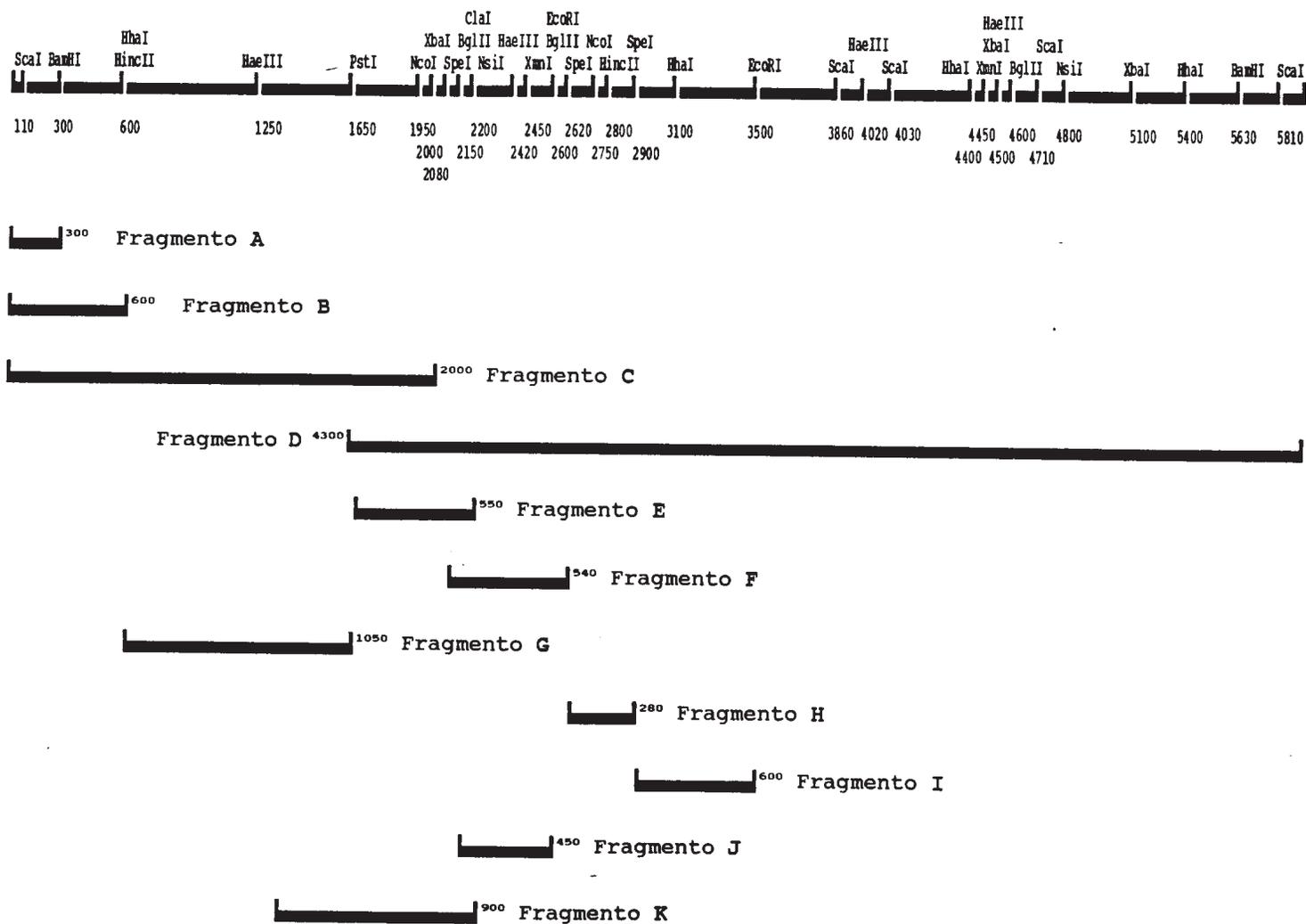


FIGURA 11- Esquema dos fragmentos inseridos nos plasmídeos, que foram denominados de pA a pK. Pode-se observar seus respectivos tamanhos em pb.

```

1
CGCTCGACTG CCGTCGTCGT CGTCGGTGGC GATACTCTAA GAGTATAAGC AAGTACTCAG
61
CATGTATAGA ATAATTGATG ACGTCACAAC TATGACGTCA CGGGATGACC TTTGACCTCT
121
GACCTTTGAC CTTCTATTTG ACCTTGACCT ACTTCTGTGA CCTTCTGGTC TACTGACCTT
181
TGACCTTCTA TGACCTTCTG AGCTGATGGT CTA CTGACCT GATGATGGAG AGGATCCGAA
241
GACCTTGGAG CTGATGGTGG AACACCAGTA CCTGATGTTA GTAAAGGATA GCAATAGTGT
301
GTAAGTGTGA CAGCAACATA GCAACTGTTA GAAAGAGACA GCAACATGAG TGAAAGAGAT
361
AGCATGAAAA CAAACCTTGA AATAATTTAT GCGTAATTTT ATTATCTTGT TATTGTGACC
421
TCGCTTGACC GCAAACCTCC GTCGAAGCTG GAGCCGTGTG CAAAACAGGA TG TAGCTAGG
481
CAGCGGACCG TTGGGTATAA ATAAGCATA C GTGTTCTATT TTTAGTCATT ATGTCTTTCT
541
ACGCGAGAGC GTTGGGT

```

FIGURA 12 - Sequência correspondente aos 557 pb iniciais de pAB no sentido 5'→3' do DsDNV. Os nucleotídeos foram divididos em grupos de 10, para facilitar a visualização. Observa-se o sítio BamH I, comum ao GmDNV e JcDNV em suas extremidades.

1650

CTGCAGACCC TCAGAATCCT AGTTCATCAG GTGCTACTAC TGATTTAGAC GTTACAATGG

1711

CTATGTCATT ACCTGGTACT GGTTCCGGTA CTTTCGTCTGG TGGTGGTAAT ACAACTGGAC

1771

AAGAAATTTA TGAAATTCCA CGTCCTTCTA CAATCTTTGG TAAGAAGTCA AGTACATATA

1831

CTAAATCTCA TAAATTTATG ATTTCCGGTC TTGCTAACAA TGTAATTGCA GAAACAGGTA

1891

CAACTGGTAA TTTACATCGC TTATTAATA CATGTTTAGC TGAGATACCA TGGCAAAAGA

1951

TACCATTATA TATGAATCAA TCTGAATTTG ACTTATTACC TCCTGGTTCT AGAATTGTTG

2111

AATGTAATGT TAAAGTTATA TTTCGATCTA ATCGTATAGC TTTTGAAACT AGTTCTACAG

2171

CTACTAAGCA GGCTACTTTA AATCAAATAT CTAATTTACA AACTGCTGTT GGATTAAATA

2231

AATTAGGTTG GGAATCGAT AGATCTTTTA CTGCGTTCCA ATCAGATCAA CCTATGATTC

2291

CTACTGCTAG TGCTCCTCCA AAGTATGCAT CAGTATCTGG TGCAAATGGT TATAGAGGTA

2351

TGATAGCTGA TTATTATGGA GCAGACTCTA ATAATGATAT TGCTTTTGGT AATGCTGGTA

2411

ATTATCCTCA CCATCAAGTT GGTTCAATTA CTTTTCTACA AAATTATTAC TGTATGTATA

2471

TACAAACAGA AAGAGGTACA GGTGGTTGGC CATGTTTAGC TGAACATTTT CAACAATATG

2531

ATTCTAAAAC TGTTAATAAT CAATGTTTAC TTGATGTATC ATATAAACCT CAAATGGGGA

2591

TGATTAAACC ACCATTAAAT TATAATATAA TTGGATTTCC AACTAATAAA GGTGCTATAT

2651

CTATCGGAGA AAATTTAACA GCAATGAGAT CTGCCAATGT TTCTGGTCCA GAAATTGCTA

2741

CTCAACAAGT TTCTGAAACT AGTAATAATA GAATTCATAA TTTTCCTGCA ACATTTTTTG

2801

ACATATATGC TGATAGTGAG AAATCTCAA GATTAAATAA AGGACCATGG GGATTTGAAC

2861

ATCCTCAAAT TCAACCTAGT ATTCACATTG GSTATGCAAGC TGTTCCAGCG TTAACACTG

2921 GTGCTTTATT AGTTAATTCA AGTCCGTAA ATTCTTGGAC AGATTCTAT GGGTTATGTAG
 2981 ATGTTATTCC TAGTTGTACT GTAATGGAAT CACAACCAACT CACTTTCC CTATGCT**ACTA**
 3041 **GT**GCA**TTTAA** TGGATTATAC GGAAACGCTG CAACACTAGG TAGTTTATAA TGTGACAACA
 3101 TTGTACCCAT ACCCATTAT TAAAATGTAA TGTTATATTT ACTTAATAAA AGAAAAAATG
 3161 TCATTGGATG TGGTTTCAAT TCATAATCCT TTAAGAATGG CGCAGCATT CATTATATT
 3221 GAATTATTCT ATCACTAAAA GCAAGTTCAT ACATAAAAGG TACAGTATTA TTAGTAAGTA
 3281 TAATAACAGG AGTACGCTTT ACATGTGCAT CCATACGATT TTTAACTCTA ACAGTATAAG
 3341 GCTCTCCTCC AAACATCATT TTTATAGTAT CAGTAAGGGA ACTTTCATAA TTGGGTTTCA
 3401 TCCATAATAG TACACGTTTA TTTGGGGCTT CTTGAAAAGC AAT

FIGURA 13 - Sequência correspondente aos plasmídeos pDI, contendo 1663 b. Os nucleotídeos estão divididos em grupos de 10. Pode-se remarcar a sequência correspondente ao final dos ORFs 1 e 2.

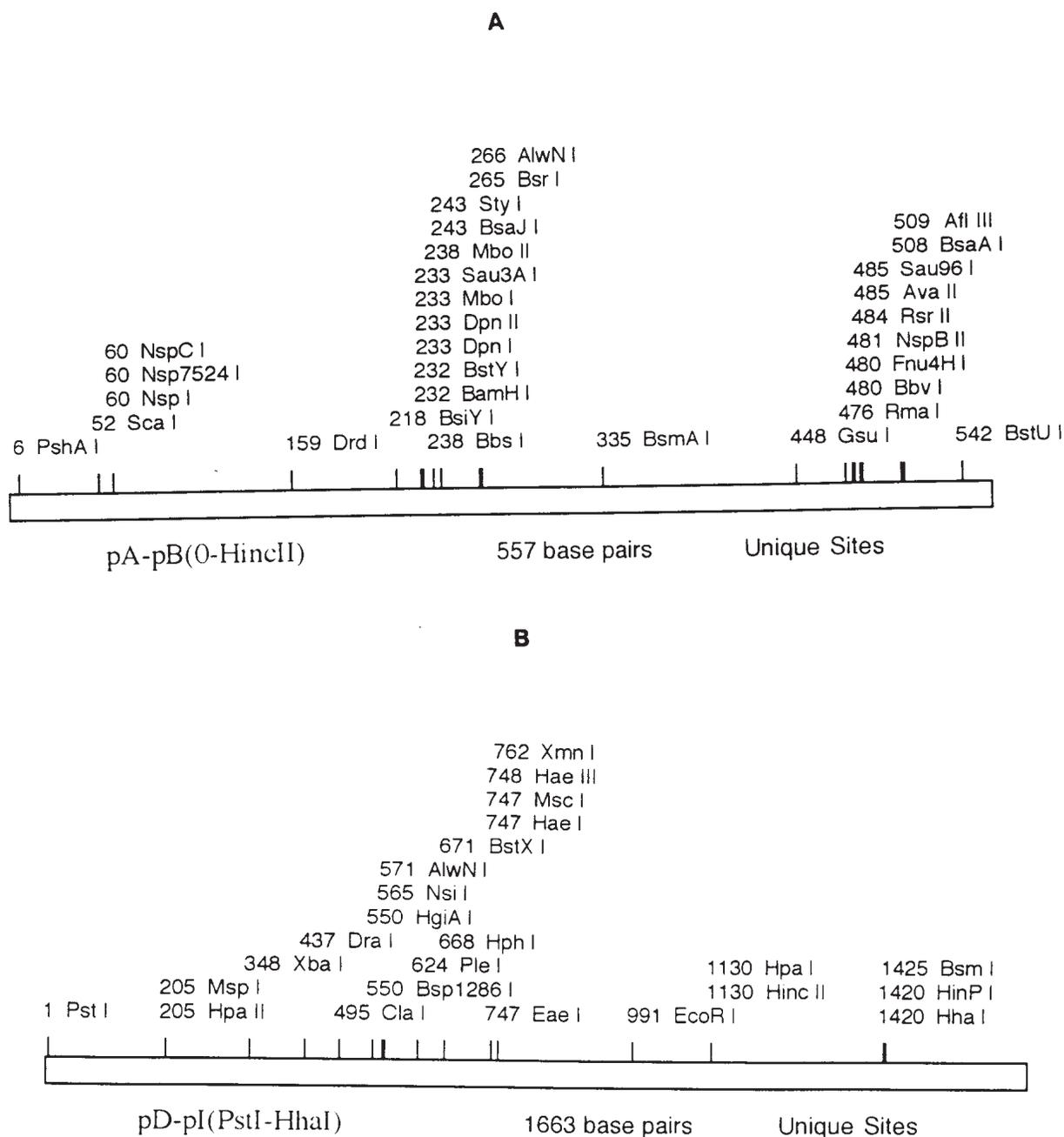


FIGURA 14 - Mapa de restrição dos dois fragmentos sequenciados. (A) 557 b iniciais correspondentes a pAB e (B) 1663 b correspondentes a pDI. Esta mapa foi obtido a partir do programa DNA Strider.

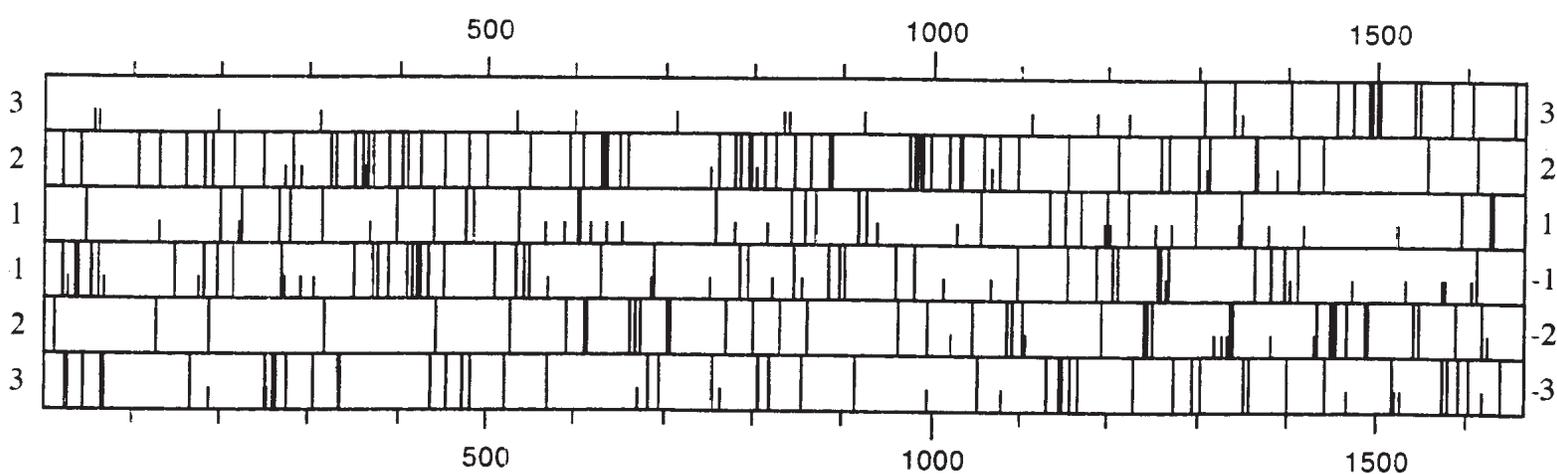


FIGURA 15 - Esta figura mostra possíveis quadros de leitura para a sequência pDI do DsDNV. Na linha 3 nota-se um quadro de leitura aberto, provavelmente correspondente ao ORF1 do DsDNV.

Emvrl:Pardnvcap /rev L32896 Galleria mellonella densovirus...	705	1143	1242
Emvrl:Pardnvcap L32896 Galleria mellonella densovirus no...	700	1138	1142
Emvrl:A12984 A12984 Densovirus (Junonia) DNA genome. 1/94	410	1137	1327
Emvrl:A12984 /rev A12984 Densovirus (Junonia) DNA genome...	406	860	1226
Emvrl:Banphcg /rev L22858 Autographa californica nuclear...	68	178	73
Emvrl:Pxvaccg /rev M35027 Vaccinia virus, complete genom...	69	173	74
Emvrl:Vvcgaa /rev X69198 Variola virus DNA complete geno...	69	142	75
Emvrl:Asvli57 /rev M58155 African swine fever virus mul...	62	136	68
Emvrl:Hpacg /rev M20273 Human hepatitis virus type A RNA...	63	129	93
Emvrl:Hevzvxx X04370 Varicella-Zoster virus complete gen...	62	128	62
Emvrl:Pacrpax K02708 Cottontail rabbit (Shope) papilloma...	59	126	66
Emvrl:Vvcgaa X69198 Variola virus DNA complete genome. 7/95	57	125	62
Emvrl:Pxvarcg L22579 Variola major virus (strain Banglad...	57	125	62
Emvrl:Hevzvxx /rev X04370 Varicella-Zoster virus complet...	57	125	66
Emvrl:Hehsecmg M86664 Equine herpesvirus 1 complete gen...	56	123	61
Emvrl:Hehsv3prg M86409 Herpesvirus saimiri the most thre...	67	122	75
Emvrl:Vvxhoig X67116 Variola virus (XhoI-G genome fragme...	56	121	56
Emvrl:Vv18340 /rev U18340 Variola virus Somalia-1977 lef...	76	113	82
Emvrl:Hhv6agnm X83413 Human herpesvirus-6 (HHV-6) U1102,...	76	112	77
Emvrl:Pxvarcg /rev L22579 Variola major virus (strain Ba...	76	112	81
Emvrl:Vv18338 /rev U18338 Variola virus Garcia-1966 left...	76	109	82
Emvrl:Vv18337 /rev U18337 Variola virus Congo-1965 left...	76	109	82
Emvrl:Cv20341 /rev U20341 Cassava vein mosaic virus, com...	66	108	68
Emvrl:Sivagmaa /rev M66437 Simian immunodeficiency virus...	67	107	73
Emvrl:Hehcmvu /rev X04650 Human cytomegalovirus (HCMV) s...	64	107	71
Emvrl:Siv677a /rev M58410 Simian (African green monkey) ...	67	107	73
Emvrl:Hsgend X64346 Herpesvirus saimiri complete genome ...	67	106	75
Emvrl:Hivjrscf M38429 Human immunodeficiency virus type ...	74	106	97
Emvrl:Hpbvsag2 /rev M54898 Hepatitis B virus surface pro...	72	104	72
Emvrl:Hhvccha /rev X75656 Human hepatitis virus (genotyp...	72	104	74
Emvrl:S65868 /rev S65868 Pre-S/S...C [duck hepatitis B v...	72	104	72
Emvrl:Sivstm M83293 Simian (stump-tailed macaque) immuno...	70	104	70
Emvrl:Lil15441 /rev U15441 Lettuce infectious yellows vir...	65	104	65
Emvrl:Hbvgen2 /rev Z35717 Human hepatitis B virus (adw4)...	72	104	72
Emvrl:Hbvadw2 /rev X02763 Hepatitis b virus genome (sero...	72	104	72
Emvrl:Hhvbe4 /rev X75664 Human hepatitis virus (genotype...	72	104	86
Emvrl:Hhvbc /rev X75665 Human hepatitis virus (genotype ...	72	104	81
Emvrl:Hhvbbas /rev X75657 Human hepatitis virus (genotyp...	72	104	72
Emvrl:Hpbhbcagb /rev D23678 Hepatitis B virus gene for D...	72	104	74
Emvrl:Hbvadw /rev V00866 Hepatitis B virus complete DNA ...	72	104	72
Emvrl:Av3hexo3 /rev X76549 Adenovirus type 3 hexon gene....	62	102	63
Emvrl:As18466 /rev U18466 African swine fever virus, com...	62	102	87
Emvrl:Ehu20824 U20824 Equine herpesvirus 2, complete gen...	68	100	83
Emvrl:Hcvcg3pe /rev M31768 Hog cholera virus polyprotein...	62	100	62
Emvrl:Hzul1242 /rev U11242 Helicoverpa zea nuclear polyh...	68	100	70
Emvrl:Hilu23487 U23487 Human immunodeficiency virus type...	66	100	83
Emvrl:Pxvaclen /rev M22812 Vaccinia virus genome, left e...	65	98	70
Emvrl:Hbvxcps /rev X70185 Hepatitis B Virus X, C, P and ...	65	97	65
Emvrl:Hpbhbcagc /rev D23679 Hepatitis B virus gene for D...	65	97	67
Emvrl:Hbvaywci /rev X65258 Hepatitis B virus (ayw,patien...	65	97	76

FIGURA 16- Lista das identidades da sequência pAB dada pela comparação através de Fasta. Foram analisados as quatro primeiras sequências relacionados por apresentarem o maior grau de identidade.

Emvrl:Pardnvcap /rev L32896 Galleria mellonella densovirus...2620	4372	3246
Emvrl:A12984 A12984 Densovirus (Junonia) DNA genome. 1/94	2581	4319 3250
Emvrl:Pxvaccg M35027 Vaccinia virus, complete genome. 11/92	69	205 93
Emvrl:Vvcgaa X69198 Variola virus DNA complete genome. 7/95	91	145 140
Emvrl:Pxvarcg L22579 Variola major virus (strain Banglad...	91	145 133
Emvrl:Hpvvt13dna /rev X62843 Human papilloma virus type 1...	71	120 93
Emvrl:Pb17055 /rev U17055 Paramecium bursaria Chlorella ...	71	119 113
Emvrl:Hpv56 /rev X74483 Human papillomavirus type 56 gen...	72	118 74
Emvrl:Hhv6agnm X83413 Human herpesvirus-6 (HHV-6) U1102,...	73	118 106
Emvrl:Hoboc43s /rev L14643 Human coronavirus spike (S) p...	69	116 69
Emvrl:S62886 /rev S62886 surface glycoprotein S=hemaglut...	69	116 69
Emvrl:Cosurpro /rev Z21849 Human coronavirus gene for su...	69	116 69
Emvrl:Pappvvt3 /rev M62849 Human papillomavirus ORFs. 4/94	70	116 79
Emvrl:Ibapols M29496 Avian infectious bronchitis virus F...	68	115 74
Emvrl:Ibaorfab M94356 Avian infectious bronchitis virus ...	68	115 74
Emvrl:Ibacgb M95169 Avian infectious bronchitis virus po...	68	115 74
Emvrl:Whvb3 M60764 Woodchuck hepatitis virus core antige...	69	115 72
Emvrl:Gprvp1 /rev M32805 Gottfried porcine rotavirus seg...	66	112 79
Emvrl:Pxvaccg /rev M35027 Vaccinia virus, complete genom...	66	112 76
Emvrl:As03762 U03762 African swine fever virus Malawi Li...	67	112 84
Emvrl:Mtwcp /rev D00592 Watermelon mosaic virus 2 49kda ...	65	110 81
Emvrl:Wmvcp /rev D13913 Watermelon mosaic virus 2 49kda...	65	110 81
Emvrl:Rolvp45 /rev D13401 Canine rotavirus VP4 gene. 9/94	95	95 117
Emvrl:Rolgen4c /rev L20876 Rotavirus outer capsid protei...	95	95 112
Emvrl:Rvns28a /rev X69485 Rotavirus NS28 mRNA. 11/93	92	92 116
Emvrl:Pxvacrna M13209 Vaccinia virus (strain WR) HindIII...	91	91 134
Emvrl:Vvhindqkh X67119 Variola virus (HindIII-Q,K,H,M,L,...	91	91 140
Emvrl:S55844 S55844 G9R...H7R [variola major virus, Indi...	91	91 140
Emvrl:Fclcapsid L09718 Feline calicivirus capsid protein...	89	89 100
Emvrl:Pardnvor /rev M15123 Bombyx densovirus ORF1, parti...	87	87 241
Emvrl:Hanglg2a L08753 Hantaan virus glycoproteins G1/G2 ...	85	85 136
Emvrl:Iv08903 U08903 Influenza virus A/NWS/33 (H1N1) hae...	84	84 136
Emvrl:Tobvpepl /rev X52506 Berne virus mRNA for peplomer...	82	82 98
Emvrl:Xxcarmv /rev X02986 Carnation mottle virus (CarMV)...	82	82 88
Emvrl:Brrvp7a X57852 Bovine rotavirus (strain B223) VP7 ...	81	81 99
Emvrl:Rebrvp7 X52650 Bovine rotavirus RNA segment 8 for ...	81	81 105
Emvrl:Vsvglypf M35212 Vesicular stomatitis virus (strain...	81	81 118
Emvrl:Hrseg7a X57944 Human rotavirus segment 7 gp33 gene...	81	81 105
Emvrl:Asu02468 U02468 African swine fever virus BA71V (A...	79	79 98
Emvrl:Gvmppcp X75433 Grapevine virus A genomic RNA, MP an...	79	79 104
Emvrl:Robd12710 /rev D12710 Bovine rotavirus mRNA for OR...	79	79 106
Emvrl:Nor76us /rev L23831 Norwalk virus (SRSV-SMA/76/US)...	78	78 86
Emvrl:Flaha575r L20409 Influenza A/RI/5-/57 (H2N2) haema...	78	78 83
Emvrl:Pamsndhp /rev M22347 Parainfluenza virus type 1 (h...	78	78 88
Emvrl:Flahari55 L20408 Influenza A/RI/5+/57 (H2N2) haema...	78	78 91
Emvrl:Iripvuii /rev M23625 Iridescent virus type 6 PvuII...	78	78 100
Emvrl:Vsvglyph M35214 Vesicular stomatitis virus (strain...	77	77 115
Emvrl:Orws33ha J02176 Influenza A/wsn/33 (h1n1), hemaggl...	77	77 131
Emvrl:Rhvsvgr X03633 Vesicular stomatitis virus (Indiana...	77	77 109
Emvrl:Hilu29697 /rev U29697 Human immunodeficiency virus...	77	77 98

FIGURA 17- Lista das identidades da sequência pDI do DsDNV dada por Fasta. Foram analisados as duas primeiras sequências relacionadas. Pode-se também notar que esta sequência do DsDNV apresenta sequências similares com BmDNV.


```

      20      30      40      50      60      70
DsDNV GAAAGACATAATGACTAAAAATAGAACACGTATGCTTATTTATACCCAACGGTCCGCTGC
      ||| ||||||| ||||| |||||||
JcDNV GCTCGTAGACTGATGATGGCGCTCTGCTGTTATCTCTATTTATAGCCAATGGTCCGCTGG
      5440      5450      5460      5470      5480      5490

      80      90      100      110      120      130
DsDNV CTAGCTACATCCTGTTTTGCACACGGCTCCAGCTTCGACGGGAGTTTG-CGGTCAAGCGA
      | ||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||
JcDNV CCAGCCACATCCTGTTTTGCACACGGC-CCAGCCTCGACGCGAGTTTGCCGGTCAAACGA
      5500      5510      5520      5530      5540      5550

      140      150      160      170      180      190
DsDNV GGTACAATAACAAGATAATAAAATTACGCATAAATTATTTCAAGGTTTGTTCATGCT
      ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||
JcDNV GGTACAATAACAAGATAATAAAA-TGCGCATAAATTATCTCAAGGTTTGTTCATGCT
      5560      5570      5580      5590      5600      5610

      200      210      220      230      240      250
DsDNV ATCTCTTTCACTCATGTTGCTGTCTCTTTCTAACAGTTGCTATGTTGCTGTCACACTTAC
      ||||||| : ||||||| ||||| ||||| ||||||| ||||||| ||||| || ||||| |
JcDNV ATCTCTTNTACTCATATTGCTATCTCGCTCTAACAGTTGCTATAGTGCTATCTCACTCGC
      5620      5630      5640      5650      5660      5670

      260      270      280      290      300      310
DsDNV ACACTATTGCTATCCTTTACTAACATCAGGTAAGTGGTCCACCATCAGCTCCAAGGTC
      ||||||| ||||| ||||||| ||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||
JcDNV ACACTATTGCTGTCTTCACTAACATCAGGTCCT-GTGTTCCACCTTCAGCTCCAAGGTC
      5680      5690      5700      5710      5720

      320      330      340      350      360      370
DsDNV TTCGGATCCTCTCCATCATCAGGTCAGTAGACCATCAGCTCAGAAGGTCATAGAAGGTC
      ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||
JcDNV TTCGGATCCTCTCCATCATCAGGTCAGTAGACCATCAGCTC-----AGAAGGTC
      5730      5740      5750      5760      5770

      380      390      400      410      420      430
DsDNV AAGGTCAGTAGACCAGAAGGTCACAGAAGTAGGTC AAGGTC AATAGAAGGTC AAGGTC
      ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||
JcDNV AAGGTCAGTAGACCAGAAGGTCACAGAAGTAGGTC AAGGTC ATATAGAAGGTC AAGGTC
      5780      5790      5800      5810      5820      5830

      440      450      460      470      480      490
DsDNV AGAGGTCA----AAGGTCATCCCGTGACGTCATAGTTGTGACGTCATCAATTATCTATA
      | ||||||| ||||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||
JcDNV A-AGGTCACCGTGACGTCATCAAGT-ACTCTATACATGCTGAGTACTTGCTTATACTCTA
      5840      5850      5860      5870      5880      5890

      500      510      520      530      540      550
DsDNV CATGCTGAGTACTTGCTTATACTCTTAGAGTATCGCCACCGACGACGACGCGCAGTCCG
      |
JcDNV CGAGTATTGCC
      5900

```

FIGURA 21 - Alinhamento da sequência pAB (3'→5') do DsDNV com a sequência do JcDNV no sentido 5'→3'. Obteve-se um total de 451 bases sobrepostas, revelando 84,3% de identidade.. Nota-se o sítio BamH I.

```

      380      390      400      410      420      430
DsDNV AGCGTTTCCGTATAATCCATTAATGCAGTACTAGTAGCATAGGGAAAGTGAGTTGGTTGTGA
      ||||| | | ||||| | | ||||| |
GmDNV AATTGTATTACCAGGATTAGTATTAGCTTCAGTAGAAAATGGAAAGTGTGTAGGTTGAGC
      3120      3130      3140      3150      3160      3170

      440      450      460      470      480      490
DsDNV TTCCATTACAGTACAACCTAGGAATAACATCTACATAACCCATAGAATCTGTCCAAGAATT
      ||||| | | ||||| | | ||||| | | ||||| | | ||||| | | ||||| |
GmDNV TTCCATTACAGTACAACCTAGGACATTACATCTATATATCCCATAGAATCTGTCCAAGAATT
      3180      3190      3200      3210      3220      3230

      500      510      520      530      540      550
DsDNV TAACGGACTTGAATTAACATAAAGCACCAGTAGTTAACGCTGGAACAGCTTGCCATACC
      ||||| | | ||||| | | ||||| | | ||||| | | ||||| | | ||||| |
GmDNV TAACGGACTAGATAAATAAGCAGTGTCCAGTAGTTAATGCTGGTACAGCTTGAATACC
      3240      3250      3260      3270      3280      3290

      560      570      580      590      600      610
DsDNV AATGTGAATACTAGGTTGAATTTGAGGATGTTCAAATCCCCATGGTCCTTTATTTAATCT
      || | || | || | || | || | || | || | || | || | || | || | || | || |
GmDNV AATATGAACACTCGGTTGAATTTGTGGATTTTCATGTCCCAAGGTCCTTTATGTAATAC
      3300      3310      3320      3330      3340      3350

      620      630      640      650      660      670
DsDNV TTGAGATTTTCTCACTATCAGCATATATGTCAAAAAATGTTGCAGGAAAATTATGAATTCT
      ||||| | | ||||| | | ||||| | | ||||| | | ||||| | | ||||| |
GmDNV TTGAGATTTTCAATATCAGAATAAATGTTAAACAAATCAGCAGGAAAATTACGAGTTAA
      3360      3370      3380      3390      3400      3410

      680      690      700      710      720      730
DsDNV ATTATTACTAGTTTCAGAACTTGTTGAGTAGCAATTTCTGGACCAGAAACATTGGCAGA
      || | || | || | || | || | || | || | || | || | || | || | || |
GmDNV ATTATGTGTACTTTTCAGCTACATTTTGTGTTGCTTCTGGAGGATTAGTTACAACCTGCTCC
      3420      3430      3440      3450      3460      3470

      740      750      760      770      780      790
DsDNV TCTCATTGCTGTTAAATTTTCTCCGATAGATATAGCACCTTTATTAGTTGGAAATCCAAT
      || | || | || | || | || | || | || | || | || | || | || | || |
GmDNV TCTCATATTCACCAAGTTATCACCTACAGATATCGTGCCTTTAACAGTTGGTTGTCCAAT
      3480      3490      3500      3510      3520      3530

      800      810      820      830      840      850
DsDNV TATATTATAATTTAATGGTGGTTTAAATCATCCCCATTTGAGGTTTATATGATACATCAAG
      || | || | || | || | || | || | || | || | || | || | || | || |
GmDNV AATTTTATAATTTAAAGGAGATTTAATTAACCCATTTTAGGTTTATAAGTAACATCAAT
      3540      3550      3560      3570      3580      3590

      860      870      880      890      900      910
DsDNV TAAACATTGATTATTAACAGTTTTAGAAATCATATGTTGAAAATGTTTCAGCTAAACATGG
      || | || | || | || | || | || | || | || | || | || | || | || |
GmDNV CAAGCATTGATTATTAACAGTTTTAGAAATCAAATGTTGAAAGATGTTTCAGCCAAACATGG
      3600      3610      3620      3630      3640      3650

      920      930      940      950      960      970
DsDNV CCAACCACCTGTACCTCTTTCTGTTTGTATATACATACAGTAATAATTTTGTAGAAAAGT
      || | || | || | || | || | || | || | || | || | || | || | || |
GmDNV CCAACCACCTGTTCTTTGATTAGTTTGTGATACATACAATAATAATTTTGAAGAAATGT
      3660      3670      3680      3690      3700      3710

```

FIGURA 22 - Alinhamento da sequência correspondente ao pDI do DsDNV, alinhada em seu sentido reverso com sequência do GmDNV, pode-se observar 1264 bases sobrepostas, dando uma homologia de 79,8%.


```
      1570      1580      1590      1600      1610      1620
DsDNV CGAAGTACCCGAACCAGTACCAGGTAATGACATAGCCATTGTAACGTCTAAATCAGTAGT
      || || || || || || || || || || || || || || || || || || || || || ||
GmDNV TGATGTTCCAGAGCCAGTTCCTGGTAATGACATAGCCATTGTAACGTCAAGATCAGTTGT
      4310      4320      4330      4340      4350      4360

      1630      1640      1650      1660
DsDNV AGCACCTGATGAACTAGGATTCTGAGGGTCTGCAG
      || || || || || || || || || || || || || || || || || || || || ||
GmDNV AGCACCAGATGAACTAGGATTTTGAGGATCGGTACTTTGTGAATTAACGTTAACGCCAGT
      4370      4380      4390      4400      4410      4420
```

```

                                10      20      30
DsDNV                          CTGCAGACCCTCAGAATCCTAGTTCATCAGG
                                | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
JcDNV TGCTCATAACGCTCCACATAACTCGCAAGGTACAGATCCTCAAATCCTAGTTCCTCCGG
      1590      1600      1610      1620      1630      1640

      40      50      60      70      80      90
DsDNV TGCTACTACTGATTTAGACGTTACAATGGCTATGTCATTACCTGGTACTGGTTCGGGTAC
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
JcDNV AGCAACTACTTCTNNTGACGTTGAAATGGCTATGTCATTACCTGGAAGTGGTTCGGAAC
      1650      1660      1670      1680      1690      1700

      100     110     120     130     140     150
DsDNV TTCGCTCTGGTGGTGGTAATAACAAGTGGACAAGAAATTTATGAAATTCACGTCCTTCTAC
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
JcDNV ATCATCTGGAGGAGGCAACACTTCAGGTCAAGAGGTTTATGTAATTCCTCGTCCATTTTC
      1710     1720     1730     1740     1750     1760

      160     170     180     190     200     210
DsDNV AATCTTTGGTAAAGAAGTCAAGTACATATACTAAATCTCATAAATTTATGATTTCCGGTCT
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
JcDNV GAACTTTGGTAAAAAATTAAGTACTTATACAAAGTCTCATAAATTTATGATATTTGGTCT
      1770     1780     1790     1800     1810     1820

      220     230     240     250     260
DsDNV TGCTAACAATGTAATTGCAGAAACAGGTAC---AACTGGTAATTTACATCGCTTATTAAC
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
JcDNV TGCCAATAATGTTATTGGACCTACAGGTACTGGTACAACAGCTGTAATCGTTTAATTAC
      1830     1840     1850     1860     1870     1880

      270     280     290     300     310     320
DsDNV TACATGTTTAGCTGAGATACCATGGCAAAAGATACCATTATATATGAATCAATCTGAATT
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
JcDNV AACTTGTTTGGCTGAAATTCATGGCAGAAATTCCTTTGTATATGAACCAATCTGAATT
      1890     1900     1910     1920     1930     1940

      330     340     350     360     370     380
DsDNV TGACTTATTACCTCCTGGTCTAGAAATGTTGAATGTAATGTTAAAGTTATATTTTCGATC
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
JcDNV TGATTTATTACCTCCTGGTAGTAGAGTGAATGTAATGTTAAAGTAATATTCAGAAC
      1950     1960     1970     1980     1990     2000

      390     400     410     420     430     440
DsDNV TAATCGTATAGCTTTTGAAGTACTGTTCTACAGCTACTAAGCAGGCTACTTTAAATCAAAT
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
JcDNV TAATCGTATTGCATTTGAGACTAGTTCAACTGCTACTAAACAAGCTACATTGAATCAAAT
      2010     2020     2030     2040     2050     2060

      450     460     470     480     490     500
DsDNV ATCTAATTTACAACTGCTGTTGGATTAAATAAATAGGTTGGGGAATCGATAGATCTTT
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
JcDNV ATCTAATTTACAACTGCTGTTGGATTAAATAAATAGGTTGGGGAATCGATAGATCATT
      2070     2080     2090     2100     2110     2120

```

FIGURA 23- Alinhamento da sequência pDI do DsDNV no sentido 5' 3', com o JcDNV também no mesmo sentido, mostrando 1266 bases sobrepostas, numa identidade de 79,6%.


```
1110      1120      1130      1140      1150      1160
DsDNV TGGTATGCAAGCTGTTCCAGCGTTAACTACTGGTGCTTTATTAGTTAATTCAAGTCCGTT
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
JcDNV TGGTATTCAAGCTGTACCAGCATTAACTACAGGAGCTTTACTTGTAATTCAAGTCCTTT
      2730      2740      2750      2760      2770      2780

1170      1180      1190      1200      1210      1220
DsDNV AAATTCTTGGACAGATTCTATGGGTTATGTAGATGTTATTCCTAGTTGTACTGTAATGGA
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
JcDNV AAATTCATGGACTGATTCTATGGGTTATATTGATGTTATGTCTAGTTGTACTGTTATGGA
      2790      2800      2810      2820      2830      2840

1230      1240      1250      1260      1270      1280
DsDNV ATCACAACCAACTCACTTCCCTATGCTACTAGTGCATTTAATGGATTATACGGAAACGC
      ||| ||| ||| ||| ||||| ||| ||| |||
JcDNV ATCTCAGCCTACACACTTCCATTTTCGACTGATGCTAATACTAACCCTGGTAATACCAT
      2850      2860      2870      2880      2890      2900
```

5. CONCLUSÕES

Através deste estudo foi possível:

- 1) A determinação da densidade do Densovirus de *Diatraea saccharalis* (DsDNV), em gradiente de cloreto de cézio em 1,39 g/ml.
- 2) A caracterização do peso molecular das quatro proteínas estruturais do DsDNV, estimadas em 107600, 72500, 55200 e 45000 Da para VP1, VP2, VP3 e VP4 respectivamente.
- 3) A caracterização do peso molecular das quatro proteínas estruturais do Densovirus de *Acheta domestica* (AdDNV), estimadas em 120200, 88000, 50500 e 41500 Da
- 4) A avaliação da gama de hospedeiro do DsDNV, testada em várias espécies como *Spodoptera littoralis*, *Ephestia khuniella*, *Galleria mellonella*, *Sesamia sp* todos lepidópteros e em um Ortóptero *Acheta domestica* mostrou que o DsDNV não foi capaz de infectar estas espécies.
- 5) A avaliação da capacidade do DsDNV de infectar diferentes tipos cultura de células como SPC-PL 65, Sf9IPBL-Sf-21, SPC-SI 52, SPC-GM 17 e BCIRL-PX2-HNU3 mostrou que o DsDNV se mantém por até 7 repicagens em células BCIRL-PX2-HNU3 sem soro.
- 6) A comparação do DsDNV com o AdDNV, Densovirus *Galleria mellonella* (GmDNV) e *Junonia coenia* (JcDNV) em relação à suas características serológicas, mostrou que o DsDNV se assemelha com os Densovirus isolados de lepidópteros.

7) A comparação do DsDNV com o AdDNV, GmDNV e o JcDNV em relação à suas características genômicas, mostrou que o DsDNV se assemelha ao GmDNV e JcDNV.

8) O sequenciamento de 2200 pb do genoma do DsDNV e a comparação com o Gene Bank, que mostrou o alto grau de identidade com as sequências do GmDNV e JcDNV.

A partir destas análises, pode se concluir que o DsDNV apresenta densidade e PM de suas proteínas estruturais dentro da faixa de variação descrita na literatura. Que é altamente específico em relação aos insetos testados, que pode se manter numa das culturas de células testadas, mas com uma baixa taxa de infecção. Conclui-se também que não se assemelha a nível serológico e genômico com o AdDNV. Que a homologia entre o DsDNV, o GmDNV e o JcDNV é grande nos parâmetros analisados e que através do sequenciamento este vírus aparentemente se comporta como o JcDNV em relação à sua organização genômica.

6. RESUMO

O Densovírus de *Diatraea saccharalis* (DsDNV) foi inicialmente descrito por MEYNADIER et al., 1977 e depois relatado em criações artificiais deste inseto no Laboratório de Virologia de Insetos - IB - UNICAMP por CAVALLARO et al., 1988. Amostras destes vírus foram enviadas para o Laboratoire de Pathologie Comparée onde foram então estudados.

Neste trabalho foi posto em evidência características o DsDNV até então desconhecidas. A massa molecular de suas quatro proteínas estruturais (VP1, VP2, VP3 e VP4) foram estimadas (107600, 72500, 55200 e 45000 Da respectivamente), assim como a densidade da partícula viral (1,39 g/ml). Também analisou-se a capacidade de multiplicação em hospedeiros alternativos e em cultura de células, indicando sua especificidade. Também foram pela primeira vez estimados os PM das proteínas estruturais do Densovírus de *Acheta domestica* (AdDNV) (120200, 88000, 50500 e 41500 Da). Essas características do DsDNV foram comparadas a outros DNVs como o AdDNV, o de *Galleria mellonella* (GmDNV) e o de *Junonia coenia* (JcDNV) que já tinham essas características descritas.

Um estudo comparativo mostrou a semelhança do DsDNV tanto a nível protéico quanto genômico com o GmDNV e o JcDNV. A grande homologia entre estes dois já tinha sido estudada através de cinética de reassociação e comparação de mapas de restrição.

O sequenciamento de parte do genoma do DsDNV veio confirmar o alto grau de identidade entre eles, da ordem de 80 %, em relação a sequência de nucleotídeos. Os resultados indicam que o DsDNV apesar de apresentar identidade de sequência com o GmDNV e o JcDNV, sua organização genômica é semelhante à encontrada em JcDNV. O GmDNV apresenta uma inversão na posição dos quadros de leituras em relação aos dois.

Os DNVs são vírus pouco estudados, diferentemente de outros Parvovírus de mamíferos, grupo do qual fazem parte. Eles se apresentam como candidatos a vetores de expressão, ideais devido ao pequeno tamanho de seu genoma, da sua capacidade de integração no genoma do hospedeiro e de sua provada capacidade de expressar proteínas exógenas. Por estas características e também pela possibilidade de sua utilização como agente de controle biológico, o estudo de suas propriedades básicas deve ser considerado importante.

7. SUMMARY

The *Diatraea saccharalis* Densonucleosis Virus (DsDNV) was initially isolated in 1974. In 1988 we reported laboratory-reared colonies of *D. saccharalis* infected with the virus in the Insect Virology Laboratory at the Department of Genetics in the University of Campinas - UNICAMP. This virus was isolated and samples were sent to the Laboratory of Comparative Pathology at the University of Montpellier, France where this study consisting of biological and molecular characterization of the virus.

It was shown that the virus particle contains four structural proteins (VP1-4) and their molecular weight was estimated (107.6, 72.5, 55.2 and 45.0 KDa, respectively). The particle density was shown to be 1.39 g/ml.

Host range studies in several alternate host insect species have shown the virus to be species-specific. Several heterologous insect cell culture lines showed very poor or no replication of its particles.

These characterizations were compared to those of three other DNVs and showed to be very similar, therefore, showing it to be a typical representative of the group. Two of these, *Junonia coenia* and *Galleria mellonella* DNVs (JcDNV and GmDNV), both from lepidopteran hosts, were already well studied and the comparison was based on published data. The other was the DNV from *Acheta domestica* (AdDNV), a diptera. For this virus we also identified the same four structural proteins with molecular weights (120.2, 88.0, 50.5 and 41.5 KDa).

Comparative studies at the protein and genomic levels indicated a high degree of identity between the DsDNV and both the GmDNV and JcDNV. Previous studies had already shown the same type of homology between GmDNV and JcDNV.

Sequencing of 40 % of the DsDNV genome showed 80 % nucleotide sequence identity to this part of the virus genome with both the GmDNV and JcDNV. Despite this similarity among the three viruses, when the genome organization is compared, DsDNV and JcDNV present the same layout, while GmDNV has an inversion in the position of the open reading frames (ORFs).

Until recently very few detailed studies had been carried out in DNVs. However, characteristics such as their minute genome size, the ability to integrate in the host cell genome and their ability to express exogenous proteins as a vector has clearly reversed this trend. The DNVs are today the object of a series of studies, including as a biological control agent with great potential for genetic modifications. These perspectives fully justify and endorse this type of work, that is, defining its basic characteristics.

8. ANEXOS

1. MEIO LB

Bacto-tryptone 10g/l
 Bacto-Yeast extract 5g/l
 NaCl 5g/l pH 7,5 com NaOH 1 N

para meio sólido adicionar 15g/l de ágar

2. MEIO DE CULTURA CELULAR TG3 (para 1 l)

Ácido α ceto glutárico	0,370
β D Frutos	0,400
Ácido Fumárico	0,550
Ácido Málico	0,670
Ácido Succínico	0,060
Sacarose	26,680
Cloreto de Colina	0,200
β Alanina	0,200

Adicionar o Meio TC100 (para 1l)

Dissolver e Adicionar

NaHCO ₃	0,350
α Lactoalbumina	3,330
Estreptomicina	0,050
Penicilina	0,125

Soro Fetal Bovino 100 ml pH 6,2

3.TAMPÃO PBS pH 7,0

NaCl 13,7 mM
KCl 2,5 mM
Na₂HPO₄ 3,2 mM
NaH₂PO₄ 3,2 mM
KH₂PO₄ 1,5 mM

4.PBS-Tween 20

PBS 10 X 10 ml
Tween 20 0,005 ml
qsp água destilada 100 ml

5.TAMPÃO TRIS-ÁCIDO ASCÓRBICO

2 g de ácido ascórbico
75 ml de água destilada
Tris 1 M até pH 7,5
Completar com 100 ml de água destilada

6.TAMPÃO DA AMOSTRA

1 ml Tris-HCl 1 M pH 6,8
0,5 g SDS
1 ml β mercaptoetanol
2 ml glicerol
0,0001 g bromofenol azul
qsp água destilada 5 ml

7.SOLUÇÃO ESTOQUE PARA GEL DE SDS-PAGE

Acrilamida 30 %
Bis-acrilamida 0,8 %

8.TAMPÃO A1

Tris 36,6 g
ajustar pH 8,9 com HCl puro
qsp água destilada 100 ml

9.SDS 10 %

1 g de SDS
10 ml de água destilada

10.Persulfato de amônia 10 %

0,1 g de persulfato
1 ml de água destilada
TEMED

11.COMPOSIÇÃO DOS GÉIS

REAGENTES	GEL DE RESOLUÇÃO 10%/8,5% (ml)	GEL DE EMPACOTAMENTO
Acrilamida	2,5/1,7	0,66
Água Destilada	2,2/3,0	2,54
Tampão A1	1,2/1,2	0,8
SDS 10 %	0,06/0,06	0,04
Persulfato 10 %	0,03/0,03	0,02
TEMED	0,005/0,005	0,006

12.TAMPÃO DA CUBA

Tris 50 mM
Ácido Bórico 0,5 M ajustar pH 8,6
SDS concentração final de 0,1 %

13.SOLUÇÃO CORANTE

0,46 g de Comassie Blue
240 ml água destilada
120 ml de metanol
40 ml ácido acético

14.SOLUÇÃO DESCORANTE

450 ml água destilada
450 ml metanol
100 ml ácido acético

15.TAMPÃO DA CUBA (WESTERN)

50 ml Tris 1M
200 ml metanol
Ácido Borico 0,5 M pH 8,6
Água destilada até 1000 ml

16.PBS-Leite

PBS 10 X 10 ml
Leite Glória desnatado 1 g
qsp água destilada 100 ml

17.4 Cloro Naphtol

4 cloro naphtol 3 mg
Alcool Absoluto 0,2 ml
PBS 9,8 ml
No momento do emprego adicionar 12 µl de H₂O₂ à 30% ou 110V

18.DAB (Di amino benzidina)

DAB 5 mg

Cloreto de Cobalto 0,2 ml de uma solução à 1 % em água

PBS 9,8 ml

No momento do emprego adicionar 10 µl de H₂O₂ à 30 % ou 110V

19.TEP 1X

89 mM Tris-HCl

2 mM EDTA pH 8,0 com ácido fosfórico

20.SOLUÇÃO CORANTE ADN

Glicerol 4 g

TE 100 ml

Bromofenol azul 50 mg

21.NEW WASH

280 ml água destilada

310 ml etanol 100 %

14 ml New concetrate (NaCl, Tris, EDTA) pH 7,0 e 8,5

22.SOLUÇÃO DESNATURANTE

NaCl 1,5 M

NaOH 0,5 M

23.SSC 20X

NaCl 3 M

Citrato de Sódio 0,3 M pH 7,0

24.SOLUÇÃO DE HIBRIDAÇÃO

SSC 5X
Blocking Reagent 0,5 %
Sarcosil 0,1 %
SDS 0,02 %

25.SOLUÇÃO DE LAVAGEM 1

SSC 2X
SDS 0,1 %

26.SOLUÇÃO DE LAVAGEM 2

SSC 0,1 X
SDS 0,1 X

27.TAMPÃO 1

Tris-HCl 100mM
NaCl 150 mM pH 7,5

28.TAMPÃO 2

Blocking Reagent 0,5 %
Dissolvido no tampão 1

29.TAMPÃO 3

Tris-HCl 100 mM
NaCl 100 mM
MgCl₂ 50 mM pH 9,5

30. SOLUÇÃO CORANTE (MEMBRANA)

45 µl NBT (1,25 ml nitroblue tetrazolium salt + 75 mg/ml dimetilformamida)

35 µl X-fosfatase (0,9 ml 5 bromo 4 cloro 3indolyl fosfate toluidinum salt 50 mg em DMF)

31. SOLUÇÃO DE CaCl₂

CaCl ₂	60 mM
Glicerol	15%
PIPES	10 mM pH 7,0 autoclavar

32. BD1

Glucose	50 mM
EDTA	10 mM
Tris	25 mM pH 8,0

33. BD2

NaOH 1 M	600 µl
SDS 20%	150 µl
H ₂ O q.s.p.	3000 µl

34. BD3

K ⁺ CH ₃ COO ⁻	58,88 g
H ₂ O	177,7 ml
CH ₃ COOH	

35. SOLUÇÃO DESNATURANTE

NaOH	0,5 N
NaCl	1,5 M

36. SOLUÇÃO NEUTRALIZANTE

NaCl 1,5 M
Tris-HCl 0,5 M pH 7,4

37. SOLUÇÃO DE LAVAGEM

SSC 20 X

NaCl 3 M
Citrato de Sódio 0,3 M diluir a 2 X

38. TAMPÃO P1

Tris-HCl 50 mM
EDTA 10 mM

39. TAMPÃO P2

NaOH 0,2 M
SDS 1 %

40. TAMPÃO P3

KAc 3 M pH 5,5

41. TAMPÃO QBT

NaCl 750 mM
MOPS 50 mM
Etanol 15 %
Triton 0,15 % pH 7,0

42. TAMPÃO QC

NaCl	1000	mM
MOPS	50	mM
Etanol	15	% pH 7,0

43. TAMPÃO QF

NaCl	1250	mM
Tris-HCl	50	ml
Etanol	15	% pH 8,5

9. BIBLIOGRAFIA

- AFANASIEV, B.N.; GAYLOV, E.E.; BUCHATSKY, L.P. & KOSLOV, Y.V. Nucleotide sequence and genomic organization of *Aedes* densovirus. **Virology**. 185: 323-36. 1991.
- AFANASIEV, B.N.; KOSLOV, Y.V.; CARLSON, J.O.; BEATY, B.J. Densovirus of *Aedes aegypti* as an Expression Vector in Mosquito Cells. **Experimental Parasitology**. 79: 322-39. 1994.
- AMARGIER, A.; VAGO, C. & MEYNADIER, G. Etude histopathologique d'un nouveau type de virose mis en évidence chez *Galleria mellonella*. **Arch. Gesamte Virusforsch.** 15: 659-67. 1965.
- AMARGIER, A.; VAGO, C.; DUTHOIT, J.L. & MEYNADIER, G. Formation tumorale d'origine parvovirale chez *Sibine fusca* (Lép.: Limacodidae). **Entomophaga**. 24: 259-71. 1979.
- ANDERSON, J.C.; LAW, A.T.; SHARIF, M. & NASH, G. A parvo-like virus in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **J. Inverth. Pathol.** 55:447-9. 1990.
- BANDO, H.; CHOI, H.; ITO, Y. & KAWASE, S. Terminal structure of a densovirus implies a hairpin transfer replication which is similar to the model for AAV. **Virology**. 179: 57-63. 1990.
- BANDO, H.; KONDO, N. & KAWASE, S. Molecular homology among the structural proteins of densovirus from silkworm, *Bombyx mori*. **Archives of Virology**. 80: 209-18. 1984.
- BANDO, H.; KUSUDA, J. & KAWASE, S. Molecular cloning and characterization of *Bombyx* densovirus genome DNA. **Archives of Virology**. 93/ 139-46. 1987 (a).
- BANDO, H.; KUSUDA, J.; GOJOBORI, T.; MARUYAMA, T. & KAWASE, S. organization and nucleotide sequence of a densovirus genome imply a host dependent evolution of Parvoviruses. **J. Virology**. 61(2): 553-60. 1987 (b).
- BANDO, H.; NAKAGAKI, M. & KAWASE, S. Polyamines in densovirus from the silkworm, *Bombyx mori*. **J. Inverth. Pathol.** 42: 264-. 1983.
- BARWISE, A.H. & WALKER, J.O. Studies on the DNA of a virus from *Galleria mellonella*. **FEBS Letters**. 6(1): 13-6. 1970.
- BELLONCIK, S. Potencial use of densovirus as biological control agents of insect pests. In: "CRC Handbook of Parvoviruses". v II, ed TIJSEN, P.. CRC Academic Press, Boca Raton, Florida. 285-9. 1990.
- BERGOIN, M. & BRES, N. Lésions tissulaires chez la larve du Lépidoptère *Galleria mellonella* L. atteinte du virus de la densovirus. **Bull. Apicole**, 11:5-12. 1968.
- BERGOIN, M.; JOURDAN, M.; GERVAIS, M.; JOUSSET, F.X.; SKORY, S. & DUMAS, B. Molecular cloning, nucleotide sequence and organization of an infectious genome of the *Junonia coenia* densovirus (JcDNV). **Program and Abst. EMBO Workshop**. Israel. p. 58. 1989.

- BERNS, K.J. & ROSE, J.A. Evidence for a single-stranded adenovirus-associated virus genome: isolation and separation of complementary single strands. **J. Virol.** 5:693-9. 1970.
- BERNS, K.J. & ADLER, S. Separation of two types of adeno-associated virus particles containing complementary polynucleotide chains. **J. Virol.** 9: 394-6. 1972.
- BOEMARE, N.; CROIZIER, G. & VEYRUNES, J.C. Contribution de la connaissance des propriétés du virus de la densonucleose. **Entomophaga.** 15(3):327-32. 1970.
- BOSSIN, H. Expression constitutive d'érythropoïétine humaine dans une lignée cellulaire d'insecte transformée par un vecteur dérivée du densovirus de *Junonia coenia* (JcDNV). Tese de DEA. Université de Montpellier II. 21 p. 1993.
- BOUBLIK, Y. Conage, séquençage et construction des plasmides infectieux d'un nouveau parvovirus d'insecte, le parvovirus d'*Aedes albopictus* (AaPV), pathogène pour les larves du moustique *Aedes aegypti*. Tese de Doutorado. 161 p. Université d'Aix-marseille II. 1993.
- BUCHATSKY, L.P.; BOGDANOVA, E.V.; KUZNETSOVA, M.A.; LEBEDINETS, N.N.; KONONKO, A.G.; CHABANENKO, A.A. & PODREZOVA, L.M. Field trial of viral preparation viroden on preimago stages of blood sucking mosquitos. **Med. Parasitol. S.U.** 4: 69-71. 1987.
- CARTER, B.J. Parvoviruses as vector. In: "**CRC Handbook of Parvoviruses**". v II, ed TIJSSSEN, P.. CRC Academic Press, Boca Raton, Florida. 247-83. 1990.
- CAVALLARO, A.C.; PAVAN, O.H. & OLIVEIRA, A. R. Isolamento de um vírus de Densonucleose (DNV) em lagartas de *Diatraea saccharalis*. In: **Reunião Anual de Genética de Microorganismos**, 15, Piracicaba. p. 101. 1988.
- CHAO, Y.C.; YOUNG III, S.Y.; KIM, K.S. & SCOTT, A. A newly isolates densonucleosis virus from *Pseudoplusia includens* (Lep.:Noctuidae). **J. Inverth. Pathol.** 46: 70-82. 1985.
- CHARPENTIER, R. A non occluded virus in nymphs of the dragonfly *Leucorrhinia dubia* (Odonata-Anisoptera) (Libellulidae). **J. Inverth. Pathol.** 34: 95-8. 1979.
- CHEJANOVSKY, N. & TAL, J. Genetic Engineering of Insect Viruses for Insect Biological Control. **Phytoparasitica.** 20: 25-31. 1992.
- CHEN, Q.; McINTOSH, A. & IGNOFFO, C.M. Establishment of a new cell line from the pupae of *Plutella xylostella*. **J. of Central China Teachers College.** 3: 99-101. 1983.
- DIALLO, B. Etude de l'infection à densovirus chez le lépidoptère *Spodoptera littoralis* Boisduval. Tese de doutorado. Université de Montpellier II. 141 p. 1978.
- DUMAS, B.; JOURDAN, M.; PASCAUD, A.M. & BERGOIN, M. Complete nucleotide sequence of the cloned infectious genome of *Junonia coenia* densovirus reveals an organization unique among parvoviruses. **Virology.** 191: 202-222. 1992.

- FEDERICI, B. Pathology and histochemistry of a densovirus in larvae of blackfly *Simulium vittatum*. **Proc. 1th Int. Coll. Invert. Pathol.** Kingston-Canada. p. 341-2. 1976.
- FÉDIÈRE, G.; DESMIER de CHENON, R.; MARIAU, D. & MONSARRAT, P.M. Mise en évidence de maladies à épizootie de type densovirus chez deux chenilles de Limacodidae lépidoptères phytophages du palmier à huile et du cocotier en Côte d'Ivoire. **Colloq. Int. Prot. Cult. Trop.**, Lyon-France. p.62. 1981.
- FÉDIÈRE, G. Recherches sur des viroses épizootiques de lépidoptères Limacodidae ravageur de Palmacées. Tese de Doutorado. Université de Montpellier II. 103 p. 1983
- FÉDIÈRE, G.; MONSARRAT, P.M.; MARIAU, D. & BERGOIN, M. A densovirus of *Casphalia extranea* (Lepidoptera:Limacodidae): characterization and use for biological control. **4th International Colloquium of Invertebrate Pathology**. 1986.
- FÉDIÈRE, G.; LERY, X.; QUIOT, J.M. & MONSARRAT, P. Replication of densovirus of *Casphalia extranea* (Lep.:Limacodidae) on an established cell line. **J. Inv. Pathol.** 56: 132-34. 1990.
- GARZON, S. & KURSTAK, E. Ultrastructural studies on the morphogenesis of the DNV (Parvovirus). **Virology**. 70: 517-31. 1976.
- GIRAN, F.A. Action de la "densovirus" des lépidoptères sur les mammifères. **Entomophaga**. 2: 405-7. 1966.
- GIRAUD, C. Etude de l'expression d'un parvovirus d'invertébré, le densovirus de *Junonia coenia* (JcDNV): contribution à l'établissement d'un couple hôte-vecteur JcDNV-celules d'insectes. Tese de Doutorado. Université D'Aix-Marseille II. Faculté de Sciences de Luminy. 146 p. 1991.
- GORZIGLIA, M.; BOTERO, L. & ESPARZA, J. Preliminary characterization of virus like particles in a mosquito (*Aedes pseudocutellaris*) cell line (mos 61). **Intervirology**. 13: 232-40. 1980.
- GRIGNON, N. Recherches sur une infection virale chronique dans une lignée cellulaire de lépidoptère. Tese de Doutorado. Université de Montpellier II. 109. 1982.
- GROSS, O.; TIJSSEN, P.; WEINBERG, D. & TAL, J. Expression of densovirus GmDNV in *Galleria mellonella* larvae: Size analysis and in vitro translation of viral transcription products. **J. Invert. Pathol.** 56: 175-80. 1990.
- HO, Z.G.; LU, Z.Y. & ZHANG, F.L. Infection of VERO cells with *Pieris rapae* densovirus (DNV). Abst. Paper 3th Int. Cell Culture Congress. Sendai-Japão. p. 74. 1985.
- JOURDAN, M.; JOUSSET, F.X.; GERVAIS, M.; SKORY, S.; BERGOIN, M. & DUMAS, B. Cloning of the genome of a densovirus and rescue of infectious virions from recombinant plasmid in the insect host *Spodoptera littoralis*. **Virology**. 179: 403-9. 1990.
- JOUSSET, F.X.; BARREAU, C., BOUBLIK, Y., CORNET, M. A parvo-like persistently infecting a C6/36 clone of *Aedes albopictus* mosquito cell line and pathogenic for *Aedes aegypti* larvae. **Virus Res.** 29: 99-114. 1993.

- JOUSSET, F.X.; COMPAGNON, B. & BERGOIN, M. Comparison of the restriction map and infectivity of the genomes of three densovirus. In: **"Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology"** p. 121. Ed. SAMSOM, R.A.; VLAK, J.M. & PETERS, D. Wageningen. Fondation of the 4th International Colloquium of Invertebrate Pathology. 1986.
- JOUSSET, F.X.; JOURDAN, M.; COMPAGNON, B.; MIALHE, E.; VEYRUNES, J-C. & BERGOIN, M. Restriction maps and sequence homologies of two densovirus genomes. **J. Gen. Virol.** 71: 2463-6. 1990.
- KAWASE, S. Pathology associated with densovirus. In: **"Viral Insecticides for Biological Control"**. Eds. MARAMOROSCH, K. & SHERMAN, K.E. Academic Press, NY. 197-231. 1985.
- KAWASE, S.; GARZON, S.; SU, D.M. & TIJSSEN, P. Insect Parvovirus diseases. In: **"CRC Handbook of Parvoviruses"**. v II, ed. TIJSSEN, P.. CRC Academic Press, Boca Raton, Florida. 213-28. 1990.
- KAWASE, S. & KURSTAK, E. Parvoviridae of Invertebrates: Densonucleosis Viruses. In: **"Viruses of Invertebrates"**. Ed. KURSTAK, E. Marcel Dekker, Inc. 315-43. 1991.
- KELLY, D.C.; BARWISE, A.H. & WALKER, J.O. DNA contained by two densonucleosis viruses. **J. Virol.** 21(1): 396-407. 1977.
- KELLY, D.C. & BUD, H. Densonucleosis virus DNA: Analysis of fine structure by electron microscopy and agarose gel electrophoresis. **J. Gen. Virol.** 40:33-43. 1978.
- KELLY, D.C. & ELLIOT, R.M. Polyamines contained by two densonucleosis virus. **J. Virol.** 21: 408-10. 1977.
- KELLY, D.C.; MOORE, N.F.; SPILLING, C.R.; BARWISE, A.H. & WALKER, J.O. Densonucleosis virus structural proteins. **J. Virol.** 36(1): 224-35. 1980.
- KOBAYASHI, M.; HASHIMOTO, Y.; SEK, H. & WATANABE, H. *In vitro* translation of RNA from midgut of the silkworm *Bombyx mori*, infected with a densonucleosis viruses. **J. Inv. Pathol.** 52: 259-67. 1988.
- KOUASSI, K.N. Etude du genome des densovirus de lépidoptères ravageurs de cultures: *Casphalia extranea* en Cote d'Ivoire et *Diatraea saccharalis* au Brésil, application au diagnostic par sonde nucleique. Tese de Doutorado. Université de Montpellier II. 161 p. 1993.
- KURSTAK, E. Small DNA densonucleosis virus (DNV). **Advances in Virus Research.** 17: 207-41. 1972a.
- KURSTAK, E. & COTE, J.R. Présence de particules virales associés avec le virus à ADN de la densonucleose (VDN) chez un invertébré. **Rev. Can. Biol.** 27: 357-9. 1968.
- KURSTAK, E.; BELLONCIK, S. & BRAILOVSKY, C. Transformation de cellules L de souris par un virus d'invertébrés: le virus de la densonucleose (VDN). **C.R.Acad. Sci. Paris.** t.269:1716-19. 1969 (a).
- KURSTAK, E.; COTE, J.R.; BELLONCIK, S.; GARZON, S.; TRUDEL, M. & CHAGNON, A. Infection de cellules L de la souris par le virus de la densonucleose. **Rev. Can. Biol.** 28(2): 139-41. 1969 (b).

- KURSTAK, E.; GORING, I.; GARZON, S. & COTE, J.R. Etude de la denonucleose de *Galleria melonella* L. (Lepidoptera) par les techniques de fluorescence. **Naturaliste Can.** 95: 773-83. 1968.
- KURSTAK, E.; TIJSSEN, P. & GARZON, S. Densonucleosis viruses (Parvoviridae). In: "**The Atlas of Insect and Plant Viruses**". Ed. MARAMOROSCH, K. Academic Press. NY. 67-91. 1977.
- KURSTAK, E.; VERNOUX, J.P., NIVELEAU, A. & ONJI, P.A. Visalisation du DNA du virus de la denonucleose (VDN) à chaines monocaténares complémentaires de polarités inverses plus et moins. **C. R. Acad. Sci., D**, 272: 762-5. 1971.
- KURSTAK, E. & ONJI, P.A. **Proc. Can. Fed. Biol. Soc.** 15:686. 1972 (b) (citado em KURSTAK, 1972).
- KURSTAK, E. & VAGO, C. Transmission du virus de la denonucleose par le parasitisme d'un hymenoptère. **Rev. Can. Biol.** 26(4): 311-16. 1967.
- KURSTAK, E. & GARZON, S. Multiple infections of invertebrate cell by virus. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 266:232-40. 1975.
- LEBEDEVA, O.P.; KUZNETZOVA, M.A.; ZELENKO, A.P.; GUDZ-GORBAN, A.P. Investigation of a virus disease of denonucleosis type in a laboratory culture of *Aedes aegypti*. **Acta Virol.** 17: 253-6. 1973.
- LI, Y.; JOUSSET, F.X.; GIRAUD, C.; ROLLING, F.; QUIOT, J.M. & BERGOIN, M. Comparative efficiency of infection and transfection of three cell lines with the *Junonia coenia* densovirus and its cloned genomic DNA. Proc. Abst. 5th International Colloquium Invertebrate Pathology and Microbial Control, Adelaide-Australia, p. 468. 1990.
- LI, Y. Recherches sur un parvovirus d'insect, le densovirus du lépidoptère *Junonia coenia* (JcDENV): études de l'infection et la transfection des lignées cellulaires de lépidoptères, étude de la transcription et la traduction du genome viral. Tese de Doutorado. Université de Montpellier II. 123 p. 1993.
- LIGHTNER, D.V. & REDMAN, R.M. A parvo-like virus disease of *Penaeid* shrimp. **J. Inv. Pathol.** 45: 47-52. 1985.
- LI-REN, Z.; DI-HUA, C.; HUAI-YU, C. & SHENG-LIANG, C. Isolation, purification and structure of flacherie virus of the silkworm *Bombyx mori*. **Acta Virol. Sinica.** 1: 55-61. 1982.
- LONGWORTH, J.F. Small isometric viruses of invertebrates. **Advances in Virus Research.** 23: 103-157. 1978.
- LONGWORTH, J.F.; TINSLEY, T.W.; BARWISE, A.H. & WALKER, I.O. Purification of a non-occluded virus of *Galleria mellonella*. **J. Gen. Virol.** 3: 167-74. 1968.
- MAEDA, S.; KAWAI, T. & WATANABE, H. Protein characteristics of a densovirus of the silkworm *Bombyx mori*. Abst.3rd Int. Colloq. Invert. Pathol. Brighton-Reino Unido. p. 222. 1982.
- MAEDA, S. & WATANABE, H. Immunofluorescence observation of the infection of denonucleosis virus in the silkworm, *Bombyx mori*. **Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.** 22: 98-. 1970.

- MARI, J. & BONAMI, J.R. PC84, a parvo-like virus from crab *Carcinus mediterraneus*: pathological aspects, ultrastructure of the agent, and first biochemical characterization. **J. Inv. Pathol.** 51: 145-56. 1988.
- MATHEWS, R.E.F. Classification and nomenclature of viruses. **Intervirol.** 17: 72-5. 1982.
- MEYNADIER, G.; AMARGIER, A. & GENTY, P.H. Une virose de type Densonucléose chez le lépidoptère *Sibine fusca* Stoll. **Oléagineux.** 32: 357-61. 1977 (a).
- MEYNADIER, G.; GALICHET, P.F.; VEYRUNES, J.C. & AMARGIER, A. Mise en évidence d'une densonucléose chez *Diatraea saccharalis* (Lep.:Pyralidae). **Entomophaga.** 22(1): 115-20. 1977 (b).
- MEYNADIER, G.; MATZ, G.; VEYRUNES, J.C. & BRES, N. Virose de type densonucléose chez les Orthoptères. **Ann. Soc. Entomol. Fr.** 13: 487-93. 1977 (c).
- MEYNADIER, G.; VAGO, C.; PLANTAVINE, G. & ATGER, P. Virose d'un type habituel chez le lépidoptère *Galleria mellonella* L. **Rev. Zool. Agr. Appl.** 63: 207. 1964.
- MIALHE, E.; QUIOT, J.M. & PARADIS, S. Etablissement de deux lignées cellulaires de *Spodoptera littoralis* (Lep.:Noctuidae) permissives pour des virus susceptibles d'être utilisés en lutte microbiologique. **Entomophaga.** 29(3): 347-50. 1984.
- MOORE, N. & KELLY, D.C. Interrelationships of the proteins of two insect parvovirus (Densonucleosis virus types 1 and 2). **Intervirol.** 14: 160-66. 1980.
- MORRIS, O.N. Metabolic changes in diseases insects. IV Radioautographic studies on protein changes in nuclear polyhedrosis, densonucleosis and TIV infections. **J. Inv. Pathol.** 18: 191-206. 1971.
- NAKAGAKI, M. & KAWASE, S. Structural proteins of Densovirus isolated the silkworm, *Bombyx mori*, infected with the flacherie virus. **J. Inv. Pathol.** 36:166-71. 1980.
- NAKAGAKI, M. & KAWASE, S. Capside structure of the densonucleosis virus of the silkworm, *Bombyx mori*. **J. seric. Sci. Jpn.** 51: 420-4. 1982.
- ODIER, F. Les complexes de viroses: entités pathologiques transmissibles chez les invertébrés. **C.R.Acad. Sci. Paris.** 280(D)2270-80. 1975.
- QUIOT, J.M.; VAGO, C.; LUCIANI, J. & AMARGIER, A. Développement du virus de la densonucléose en culture organotypiques de lépidoptères. **Bull. Soc. Zool. Fr.** 95:341-8. 1970.
- QUIOT, J.M. Etablissement d'une lignée cellulaire (SCLd 135) à partir d'ovaries du lépidoptère *Lymantria dispar* L. **C.R.Acad. Sci. B.** 282: 465-7. 1976.
- RIVERS, C.F. & LONGWORTH, J.F. A nonoccluded virus of *Junonia coenia* (Lep.:Nymphalidae). **J. Inv. Pathol.** 20:369-70. 1972.
- ROLLING, F. Vecteurs dérivés du densovirus de *Junonia coenia* (JcDNV) exprimant sous forme épisomale ou intégrée des gènes étrangers dans des cellules d'insectes. Tese de Doutorado. Université d'Aix-Marseille II. 153 p. 1992

- SATO, F. & INOUE, H. Double infection of viruses in the midgut of silkworm *Bombyx mori*. **Bull. Sericult. Exp. Sta.** 27: 247. 1978.
- SAMULSKY, R.J.; SRIVASTAVA, A.; BERNS, K.I. & MUZYCKA, N. Rescue of adeno-associated virus from recombinant plasmids: gene correction within the terminal repeats of AAV. **Cell.** 33: 135-43. 1983.
- SHADE, R.O.; BLUNDELL, M.C.; COTMORE, S.F.; TATTERSALL, P. & ASTELL, C.R. Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from serum of a child during aplastic crisis. **J. Virol.** 58: 921-36. 1986.
- SHIMIZU, S. Pathogenicity of an infectious flacherie viruses of the silkworm *Bombyx mori*, obtained from sericultural farms in the suburbs of Ina city. **J. Sericult. Sci. Jpn.** 44: 45-8. 1975.
- SHIMIZU, S.; TAUCHI, S. & ARAKAWA, A. Protein A-coated latex-linked antisera test for detection of densovirus of the silkworm *Bombyx mori*. **J. Inv. Pathol.** 57: 124-5. 1991.
- SIEGL, G.; BATES, R.C.; BERNS, K.I.; CARTER, B.J.; KELLY, D.C.; KURSTAK, E. & TATTERSALL, P. Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. **Intervirology.** 23: 61-73. 1985.
- STITZ, L.; HENGARTNER, H.; ALTHAGE, A. & ZINKERNAGEL. An easy and rapid method to screen large numbers of antibodies against internal cellular determinants. **J. Immunological Methods.** 106: 211-6. 1988.
- SUN, F.L.; MA, G.H. & CHENS, M.S.A. A new insect virus of *Pieris rapae* L. I. Isolation and characterization of the virus. **Acta Microbiol. Sinica** 21:41-4. 1981.
- SUTO, C.; KAWAMOTO, F. & KUMADA, N. A new virus isolated from cockroach *Periplaneta fuliginosa* (Serville). **Microbiol. Immunol.** 23(3): 207-11. 1979.
- SUTTER, G.R. A nonoccluded virus of the army cutworm. **J. Inv. Pathol.** 21: 62-70. 1973.
- TAL, J. & ATTATHOM, T. Insecticidal Potential of the Insect Parvovirus GmDENV. **Arch. Insect Biochemistry and Physiology.** 22:345-56.1993.
- TIJSSEN, P. Structure, sequence and strategy of replication of DNA of densovirus of *Galleria mellonella*. In: Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology. Ed. Samson, R.A.; Vlak, J.M.; Peters, D. p.120. 1986.
- TIJSSEN, P.; ARELLA, M. & KAWASE, S. Molecular biology of densovirus. In: "CRC Handbook of Parvoviruses". v I. Ed. TIJSSEN, P. CRC Press, Boca Raton, Florida. 283-91. 1990.
- TIJSSEN, P. & BERGERON, J. *Pseudoplusia includens* densovirus (PiDENV) has an ambisense genomic organization. 5th Parvovirus Workshop, Cristal-Rivers. p. 10-4. 1993.
- TIJSSEN, P. & KURSTAK, E. Studies on the structure of two infectious types of densovirus. **Intervirology.** 11:261-7. 1979 (a).

- TIJSSEN, P. & KURSTAK, E. A simple and sensitive method for purification and peptide mapping of protein solubilized from DNV with SDS. **Anal. Biochem.** 99: 97-104. 1979 (b).
- TIJSSEN, P.; KURSTAK, E.; SU, T.M. & GARZON, S. Densonucleosis virus: unique pathogens of insects. **Abst. 3rd Int. Colloq. Invertbr. Pathol. Brington-Reino Unido.** p. 148-53. 1982.
- TIJSSEN, P.; TIJSSEN-VAN DER SLIKKE, T. & KURSTAK, E. Biochemical, biophysical and biological properties of densonucleosis virus. II. Two types of infectious virions. **J. Virol.** 21(1): 255-61. 1977.
- TIJSSEN, P. & KURSTAK, E. Biochemical, biophysical and biological properties of densonucleosis virus. III. Common sequences of structural proteins. **J. Virol.** 37: 17-23. 1981.
- TIJSSEN, P.; HURK, J. & KURSTAK, E. Biochemical, biophysical and biological properties of densonucleosis virus. I. Structural proteins. **J. Virol.** 17(3): 686-91. 1976.
- TIJSSEN, P. Complete sequence and organization of genome of *Galleria mellonella* densonucleosis virus (GmDNV). 8th International Congress Virology. Berlim. Alemanha. p. 140. 1990.
- TRUFFAT, N.; BERGER, G.; NIVELEAU, A.; MAY, P.; BERGOIN, M. & VAGO, C. Recherches sur l'acide nucléique du virus de la densonucléose du lépidoptère *Galleria mellonella* L. **Arch. Ges. Virusfor.** 469-74. 1967.
- VAGO, C.; DUTHOIT, J.L. & DELAHAYE, F. Les lésions nucléaires de la "virose à noyaux denses" du lépidoptère *Galleria mellonella*. **Arch. Ges. Virusforch.** 18: 344-9. 1966 (a).
- VAGO, C. QUIOT, J.M. & LUCIANI, J. Infection des cultures de tissus de lépidoptères avec le virus purifié de la densonucléose. **C.R. Acad. Sci. B.** 263: 799-80. 1966 (b).
- WATANABE, H. & SHIMIZU, T. Epizootical studies on the occurrence of densonucleosis virus in the silkworm *Bombyx mori*, reared at sericultural farms. **J. Sericult. Sci. Jpn.** 49: 485. 1980.
- WATANABE, H. & MAEDA, S.G. Genetically determined nonsusceptibility of the silkworm *Bombyx mori*, to infection with a densonucleosis virus (Densovirus). **J. Inv. Pathol.** 38: 370-3. 1981.
- ZASLOFF, M.; GINDER, G.D. & FELSENFELD, G. **Nucelic Acids Res.** 5: 1139. 1978. Citado no catalogo Promega.