

BC/11367
IB/80743



80 743

HELENA CAMARÃO TELLES RIBEIRO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

"Estudo comparativo de cinco isolados de Baculovirus
em Diatraea saccharalis".

T/UNICAMP
R354e

CAMPINAS SP



HELENA CAMARÃO TELLES RIBEIRO

ESTUDO COMPARATIVO DE CINCO ISOLADOS DE BACULOVIRUS EM
Diatraea saccharalis.

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: OCTAVIO HENRIQUE DE OLIVEIRA FAVAN

Campinas - São Paulo

1989

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Este exemplar
corresponde à versão final
de tese de fundição pela candidata
Helena Camarão Telle Ribeiro e
é aprovado pela comissão julgadora

OFF

25.09.89

CLASSIF. T
AUTOR. R354e
V. - EX. -
TCMBO BC/ 11367
10919

À

JOÃO CAMARÃO TELLES RIBEIRO

e

MARIE-SOPHIE GUIEU CAMARÃO TELLES RIBEIRO

meus pais,
com muito amor,
por terem me ensinado a viver

À

RODOLFO L. MÓNACO

meu marido,
pela força que sempre me deu

À

NATÁLIA, IVAN, MALILA, ANDRÉ, EVANGELINA, JÂNIO,
PIERRE, MARIA, ANTONIO GUILHERME, SANDRA e
TAMARA.

meus irmãos,
pelo apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Octavio Henrique de Oliveira Favan, a quem devo a orientação desta tese, e, particularmente pela confiança, pelo estímulo e pela atenção amigável que me ofereceu.

À todo pessoal da Seção de Entomologia do IAA-PLANALSUCAR, pelo constante apoio e pelas facilidades concedidas.

À Profa. Dra. Ana Maria Lima Azevedo-Spin, pela utilização de equipamentos do seu laboratório.

Ao Prof. Dr. William José da Silva, pelas concessões de materiais e equipamentos do seu laboratório.

Ao Prof. Dr. José Antônio Cordeiro, do Instituto de Matemática, Estatística e Ciência da Computação desta universidade, pelo auxílio na análise dos dados.

À Profa. Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner, Prof. Dr. Claudio Luiz Messias, Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, Profa. Dra. Mary A. Heidi Dolder, Prof. Dr. Mohamed Ezz El-Din Moustafa Habib, Prof. Dr. Renato Bonatelli Junior, Prof. Dr. Tomomasa Yano e a Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato pela leitura da tese e sugestões dadas.

À Antônio Batista Filho, pesquisador do Instituto Biológico de Campinas, São Paulo, por ter cedido gentilmente lagartas de

A. gemmatalis.

À Sra. Anna Gagliardi, pela organização bibliográfica.

Aos colegas Ana, Tereza, Cristina, Nancy, Laura, Marcia, Newton, Andréia, Susi, Luciane, Ale, Jaqueline, Gerson e Gilberto pela amizade e companheirismo.

À Angela Cristina Cavallaro, pelo auxílio prestado na datilografia desta tese.

À Esmeralda Zanchetta Borghi, pelo auxílio na preparação das figuras.

À Carlos.A.Corona , pelos valiosos serviços técnicos.

À Luis Tadeu Cruz Pereira pelo auxílio técnico e disposição com que sempre me atendeu.

À Aguinaldo Rodrigues Dias, pela impressão desta tese e disposição com que sempre me atendeu.

À CAPES, CNPq e UNICAMP pelo apoio financeiro.

À todas as pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
2.1	Baculovirus.....	8
2.1.1	Virus de Poliedrose Nuclear(VPN).....	11
2.1.1.1	Virus de Poliedrose Nuclear de Anticarsia gemmatalis (VPNAg).....	13
2.1.1.2	Virus de Poliedrose Nuclear de Trichoplusia ni (VPNTn).....	15
2.1.2	Virus de Granulose(VG).....	16
2.1.2.1	Virus de Granulose de Diatraea saccharalis (VGDs)....	18
2.2	Estabilidade Térmica de Baculovirus.....	19
2.3	Efeitos de Diferentes Temperaturas no Desenvolvimento da Infecção Viral.....	24
2.4	Mecanismos de Defesa dos Insetos Envolvidos na Inibição da Infecção Viral.....	30
2.5	Seleção Genética de Virus de Poliedrose Nuclear (VPN).....	38
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.1	MATERIAL.....	46
3.1.1	Insetos.....	46
3.1.2	Isolados.....	47
3.2	MÉTODOS.....	49
3.2.1	Procedimento de Bioensaio.....	49
3.2.2	Purificação e Quantificação dos Cristais Virais.....	51
3.2.3	Mortalidade Corrigida.....	54

3.2.4	Determinação da Dose Letal 50% (DL ₅₀) e Tempo Letal 50% (TL ₅₀).....	55
3.2.5	Estabilidade Térmica Viral.....	56
3.2.6	Efeitos de Temperatura no Desenvolvimento da Infecção Viral.....	58
3.2.7	Efeitos da Inoculação de Virus Inativado como Indutor de Mecanismos de Defesa de D. saccharalis	59
3.2.8	Passagem Seriada de Dois Isolados Seleccionados num Hospedeiro Alternativo.....	60
3.2.9	Análise Comparativa das Proteínas dos Isolados VPNAgF ₁₀ e VPNTnF ₁₁ Seleccionados em D. saccharalis	61
3.2.9.1	Preparação dos Cristais Virais.....	61
3.2.9.2	Eletroforese de Proteínas Virais em Géis de Poliacrilamida e SDS.....	62
4	RESULTADOS.....	64
4.1	Estabilidade Térmica Viral.....	64
4.2	Efeitos de Diferentes Temperaturas no Desenvolvimento da Infecção Viral.....	76
4.3	Efeitos da Inoculação Prévia de Virus Inativado como Indutor de Mecanismos de Defesa em Larvas de D. saccharalis ..	85
4.4	Seleção Genética.....	93
4.4.1	Seleção Genética do VPNAg em Larvas de D. saccharalis	93
4.4.2	Seleção Genética do VPNTn em Larvas de D. saccharalis	106
4.4.3	Análise Comparativa das Proteínas dos Isolados do VPNAg e VPNTn.....	119
5	DISCUSSÃO.....	125

5.1 Estabilidade Térmica Viral.....	125
5.2 Efeitos de Diferentes Temperaturas no Desenvolvimento da Infeção Viral.....	130
5.3 Efeitos da Inoculação de Virus Inativado como Indutor de Mecanismos de Defesa em Larvas de <i>D. saccharalis</i>	136
5.4 Seleção Genética de Virus de Poliedrose Nuclear (VPN).....	142
6 SUMÁRIO E CONCLUSÕES.....	149
7 SUMMARY.....	153
8 BIBLIOGRAFIA.....	156
9 ANEXOS.....	188

1. INTRODUÇÃO

Dentre os diversos grupos que povoam a biosfera, os insetos constituem o grupo mais amplo, representando cerca de 75% das espécies animais conhecidas no mundo (WEISS & VAUGHN, 1986). Estudos revelaram que estes artrópodos são infectados por uma grande diversidade de virus. De aproximadamente 1300 viroses, 83% foram isolados de insetos da ordem lepidóptera, 14% de himenóptera e 3% de ortóptera, coleóptera e diptera (TWEETEN e cols, 1981; WEISS & VAUGHN, 1986). Esses virus de insetos através de estudos bioquímicos e biofísicos foram classificados em oito famílias (PAYNE, 1982; GRANADOS & WILLIAMS, 1986). Em contraste com as outras sete famílias de virus de insetos, os membros da família Baculoviridae, são os únicos restritos aos hospedeiros invertebrados (GRANADOS & WILLIAMS, 1986). Desse modo, os baculovirus membros desta família, por serem altamente específicos para os invertebrados, são sem dúvida alguma os candidatos mais interessantes como agentes potenciais no controle biológico contra pragas de interesse econômico (GRONER, 1986). Dentre os virus de insetos, apenas os baculovirus são recomendados para aplicação no campo (PAYNE, 1982; BETZ, 1986). Muito embora, não se utilize no campo, o potencial dos baculovirus na produção de epizootia natural; tira-se proveito de sua alta patogenicidade e especificidade (WEISS & VAUGHN, 1986). Uma gama de hospedeiros limitada é uma consideração muito importante na implementação de virus como inseticida (JAQUES, 1985). Alguns baculovirus já tem sido empregados como inseticidas biológicos e são registrados na Agência de Proteção Ambiental (E.P.A.)

nos Estados Unidos (BETZ, 1986). Muitos estudos têm mostrado a eficiência desses patógenos no controle biológico de pragas de cultura (HUBER, 1986). O primeiro baculovirus a ser produzido comercialmente, foi o Virus de Poliedrose Nuclear de *Heliothis zea* (VPNH_z), em 1973. E, apenas por volta de 1979, as indústrias começaram a demonstrar considerável interesse no registro de inseticidas virais (PAYNE, 1982; BETZ, 1986).

No Brasil, em 1982, o Departamento de Genética da Unicamp, Campinas, São Paulo, em associação com a Secção de Entomologia da Coordenadoria Regional - Sul do IAA/PLANALSUCAR, Araras, São Paulo, iniciou a produção de Virus de Granulose de *D. saccharalis*, visando a sua produção em larga escala, a fim de controlar a principal praga da cana-de-açúcar, *D. saccharalis* (PAVAN e cols, 1983; ALVES, 1986b). Mais recentemente, uma empresa brasileira, a AGROGEN - SP, em convênio com a Unicamp, vem produzindo em escala industrial dois baculovirus, gerando assim a necessidade de estudos de biologia básica e de genética desses virus. Apesar do grande avanço no desenvolvimento tecnológico da produção viral nesses últimos anos, ainda se carece de maiores conhecimentos para melhor eficiência na utilização de baculovirus como inseticidas biológicos e na sua produção industrial. A principal meta na produção viral é a obtenção de grande quantidade de virus biologicamente ativos à baixo custo, isto é, tornar o mais eficiente possível a replicação viral, produzindo a máxima atividade biológica destes patógenos. Para alcançar tal objetivo, no entanto, é necessário determinar e otimizar os fatores que influem na interação virus-hospedeiro, os quais afetam tanto a qualidade como a

quantidade de vírus a ser produzido (SHAPIRO, 1986).

A criação massal de insetos é imprescindível para o êxito de um programa de desenvolvimento em grande escala da produção viral. Para otimizar a produção massal de insetos, que conseqüentemente gera uma maior capacidade na produção massal de vírus, dever-se-iam levar em consideração vários fatores, tais como: a nutrição, idade do inseto, proporção sexual de machos e fêmeas, densidade da população, luz (fotoperíodo), umidade e temperatura (SHERMAN, 1985a, 1985b).

Há diversos trabalhos relatando os requisitos essenciais para a criação de várias espécies de insetos (SHAPIRO, 1986), e, muitos deles demonstram a importância fundamental da temperatura, que pode alterar tanto o desenvolvimento do inseto como o nível de produção viral (SHERMAN, 1985a, 1985b). Para a produção de vírus é necessário manter a temperatura numa faixa favorável ao desenvolvimento do inseto hospedeiro, já que a multiplicação do vírus é feita exclusivamente sobre o inseto vivo. A temperatura é crítica na maximização da produção viral e, assim é importante determinar a temperatura ótima onde ocorre a maior produção viral no inseto hospedeiro, sem prejuízo deste (EVANS, 1986). Cada espécie de vírus tem sua temperatura ótima em um determinado hospedeiro, e esta deve ser cuidadosamente regulada para maximizar a eficiência viral e diminuir os custos econômicos (SHERMAN, 1985a, 1985b).

Os estudos dos efeitos da temperatura também apresentam vital importância sobre a estabilidade viral, no estabelecimento de

condições adequadas de estocagem e de prazos de validade de preparações industriais de baculovirus. O desenvolvimento comercial de inseticidas virais necessita de formulações que sejam fisicamente e biologicamente estáveis na estocagem e na distribuição (YOUNG III & YEARIAN, 1986). Embora haja numerosos trabalhos sobre a estabilidade térmica de virus animais, poucos estudos foram relatados com os baculovirus (JAQUES, 1985), e, estes demonstram de modo geral que o efeito da temperatura depende do tipo de baculovirus envolvido. Os baculovirus não são significativamente afetados pelas temperaturas encontradas frequentemente nos habitats naturais, contudo, apesar da resistência desses virus a temperaturas ambientais por um período razoável de tempo, a estabilidade térmica passa a ter importância quando se trata de estocagem de produtos experimentais ou comerciais durante períodos de mais de um ano (YOUNG III & YEARIAN, 1986). Os efeitos produzidos pela temperatura na estabilidade viral requerem análises mais completas visando aumentar a eficiência dos produtos virais a serem comercializados. Uma maior estabilidade das preparações virais à temperatura, assegura uma maior utilização dos mesmos durante um período mais longo no controle biológico (PAYNE, 1982).

Por outro lado, o outro fator de muita importância na produção industrial viral é o que se refere a virulência destes patógenos, isto é, a eficiência dos baculovirus pode ser otimizada selecionando variantes ou isolados mais virulentos. No entanto, para uma melhor compreensão da virulência é necessário o conhecimento da gama de hospedeiros destes virus. Os baculovirus, em geral, são espécie-específicos em relação aos hospedeiros. Embora haja espécies



de baculovirus que são capazes de infectar e replicar em numerosas espécies de hospedeiros (GRANADOS & WILLIAMS, 1986). Devido então a essa alta especificidade, frequentemente, os baculovirus são produzidos apenas em seu respectivo hospedeiro homólogo (SHAPIRO, 1986). Contudo, para fins práticos, um vírus altamente específico que se multiplica apenas no hospedeiro homólogo apresenta grande desvantagem, uma vez que este só se propaga no seu hospedeiro original e não controla outros insetos hospedeiros, presentes em uma determinada cultura (GRONER, 1986). Estudos revelaram que a infectividade dos baculovirus para seus hospedeiros originais difere consideravelmente daquela apresentada pelos hospedeiros alternativos, pois estes últimos são muito menos susceptíveis à infecção viral (EVANS, 1986). Assim, diversos trabalhos foram realizados no sentido de selecionar isolados ou variantes mais virulentos de baculovirus em sistemas biológicos alternativos, aproveitando a grande variabilidade encontrado na população viral (GRONER, 1986). Todavia, tais seleções resultaram em isolados mais virulentos para o hospedeiro alternativo e menos virulentos para o hospedeiro original (SHAPIRO, 1986; GRONER, 1986). Por conseguinte, procurou-se obter um vírus polivalente que é capaz de ser um patógeno eficiente para várias espécies de pragas (GRONER, 1986). Foram utilizados os mais modernos conhecimentos da engenharia genética visando obter tal vírus polivalente (MILLER, 1986), mas este empreendimento não teve êxito. Contudo, tal ensejo foi conseguido em nosso laboratório, com maior facilidade e de forma menos onerosa, através da genética clássica (MATTA e cols, 1983; RIBEIRO & PAVAN, 1984; RIBEIRO, 1985; RIBEIRO & PAVAN, 1985a; RIBEIRO e cols, 1986; PAVAN e cols, 1988; PAVAN & RIBEIRO, 1988). Em trabalhos

anteriores, quando se efetuaram várias passagens seriadas do Virus de Poliedrose Nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (VPNAg), em larvas de *D. saccharalis*, verificou-se um aumento substancial na virulência deste baculovirus para aquele hospedeiro alternativo. O aumento obtido foi extremamente alto quando comparado aos demais encontrados na literatura. E, o mais importante é que o isolado selecionado do VPNAg manteve a mesma virulência para seu hospedeiro original, passando a ser um patógeno eficiente para as duas espécies de pragas. A caracterização deste isolado permitirá uma análise dos mecanismos moleculares, determinantes da virulência e especificidade (PAVAN, 1988).

Um outro aspecto que deve ser considerado ainda, são os possíveis efeitos da inoculação prévia de virus como indutor dos mecanismos de defesa dos insetos (BRIESE & PODGWAITE, 1985). Apesar da escassa literatura no que se refere a este tema, tais estudos contribuem fornecendo informações básicas sobre os processos envolvidos na inter-relação virus-hospedeiro, os quais são necessários para o desenvolvimento efetivo de procedimentos mais adequados na utilização dos baculovirus. Em vista do vasto interesse de um grande número de pesquisadores para a questão do desenvolvimento da resistência dos insetos aos inseticidas químicos, é curioso a pouca atenção dirigida ao problema da estimulação do sistema de defesa do inseto hospedeiro à inoculação prévia de um virus. Certamente, os insetos, ao longo do tempo desenvolveram um eficiente sistema de defesa no combate ao ataque viral. Há indicações de que estes artrópodos possuem mecanismos comuns de defesa contra uma variedade de

virus diferentes. O conhecimento desses mecanismos e de como os virus comprometem as barreiras de defesa dos insetos, possibilitará torná-los mais potentes como patógenos (KIRSCHBAUM, 1985). Portanto, é evidente a importância das informações que possam ser obtidas a respeito do processo da inoculação prévia de um virus inativo como estímulo da defesa do inseto à uma infecção secundária viral.

Assim, no presente trabalho, um dos aspectos analisados foi os efeitos da inoculação prévia de virus inativado como indutor dos mecanismos de defesa dos insetos. Outrossim, verificaram-se os efeitos da temperatura no desenvolvimento da infecção viral, bem como o seu efeito na estabilidade térmica de cinco baculovirus. Procurou-se ainda neste trabalho, prosseguir no processo de seleção genética do Virus de Poliedrose Nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (VPNAg) e do Virus de Poliedrose Nuclear de *Trichoplusia ni* (VPNTn), já que os mesmos tiveram um aumento de virulência de algumas centenas de vezes à partir da geração parental para o hospedeiro alternativo, *Diatraea saccharalis*, principal praga da cana-de-açúcar, e, demonstraram assim seu potencial e, em conseqüência, a importância de prosseguir no seu estudo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BACULOVIRUS

Os baculovirus são vírus de insetos que apresentam grande importância devido a seu potencial como inseticida biológico e como vetor para introdução e expressão de genes exógenos. Estes vírus são ferramentas importantes na engenharia genética em estudos de regulação de expressão de genes em células eucarióticas (COCHRAN e cols, 1986).

Os baculovirus (nome genérico derivado do latim "baculum" = bastonete) são partículas em forma de bastonete de aproximadamente 40 x 400 nanômetros (nm), que contém uma molécula de DNA circular em fita dupla covalentemente ligado, em forma de super-hélice, cujo peso molecular varia de 60 a 110 milhões de daltons, representando de 90 a 175 mil pares de bases (kbp) (KELLY, 1977; HARRAP e cols, 1977; BUI & KELLY, 1977; KNUDSON & TINSLEY, 1978; SMITH & SUMMERS, 1978; MATTHEWS, 1985; BILIMORIA, 1986). Envolvendo o DNA, existem proteínas compostas de subunidades denominadas de capsômeros, as quais formam uma capa chamada capsídeo. O conjunto capsídeo mais ácido nucléico é conhecido por nucleocapsídeo. O nucleocapsídeo é envolvido por um envelope ou membrana, que é comumente originada a partir do material celular específico do hospedeiro. Esse conjunto composto de envelope mais nucleocapsídeo é denominado de virion (BILIMORIA, 1986).

A família *Baculoviridae* que consiste de apenas um gênero *Baculovirus* pode ser dividida, de acordo com suas propriedades morfológicas em 3 subgêneros: tanto o subgênero A, Virus de Poliedrose Nuclear (VPN) como o subgênero B, Virus de Granulose (VG) se caracterizam por apresentarem seus virions inclusos em um cristal protéico ou corpo de inclusão, ao passo que o subgênero C ou virus não-inclusos (NOV - do inglês non-occluded virus), apresentam suas partículas infectivas não confinadas em um corpo de inclusão (BILIMORIA, 1986).

Os virus inclusos (VPN e VG) são muito resistentes às condições adversas do meio ambiente, e portanto, mais promissores para serem utilizados no controle biológico de pragas de cultura. Os cristais protéicos que os envolvem também os protegem da ação indesejável de RNases, DNases, proteases e outras enzimas, durante o processo de infecção no ciclo das relações patógeno-hospedeiro (JAQUES, 1985). Os virus inclusos, ao contrário dos baculovirus não-occlusos, podem ser facilmente identificados e diagnosticados nos insetos, apresentando assim maior importância do ponto de vista prático (FEDERICI, 1986).

De modo geral, os baculovirus, atacam preferencialmente os estágios larvais dos insetos, que são mais susceptíveis à infecção viral. A contaminação se dá por meio da ingestão de alimento contaminado com cristais virais. Após a ingestão, os cristais protéicos em condições de alta alcalinidade (pH > 9) do tubo digestivo, são dissolvidos liberando os virions (GRANADOS & WILLIAMS,

1986). Os virions em contato com as microvilosidades intestinais liberam os nucleocapsídeos no interior das células epiteliais do intestino. Nessas células, eles se multiplicam sem a produção de cristais e a essa infecção limitada dá-se o nome de infecção primária. A infecção secundária, nos outros tecidos, se caracteriza pela grande produção dos nucleocapsídeos e a formação dos cristais que leva a célula a se romper e liberar os vírus que irão infectar outros insetos (MAZZONE, 1985).

A dispersão da infecção viral de lagarta para lagarta ocorre pela ingestão de alimento contaminado e essa contaminação se dá principalmente pelo exudato de larvas mortas ou infectadas com o patógeno. A distribuição dos vírus pode ocorrer pelas fezes de pássaros ou outro predador de lagartas ou ainda pela via ovopositor de parasitas como os microhimenópteros do gênero *Apanteles* (GRANADOS & WILLIAMS, 1986). A transmissão do vírus de geração para geração do inseto pode se dar tanto pela contaminação interna dos ovos (transovariana), processo que é pouco frequente, como pela contaminação da superfície dos ovos pela fêmea (transovum) do próprio inseto (HOSTETTER & BELL, 1985). O contágio também pode ser feito através de partículas virais presentes no solo que são levadas para as folhas das plantas por meio dos respingos das chuvas, pássaros e outros animais (JAQUES, 1985).

2.1.1 VIRUS DE POLIEDROSE NUCLEAR (VPN)

Os Virus de Poliedrose Nuclear (VPN), que compreendem o subgênero A da família *Baculoviridae*, se caracterizam por exibirem uma estrutura protéica paracristalina chamada poliedro. Estes cristais protéicos medem cerca de 0,5 a 15 micrômetros de diâmetro e podem ser visualizados em microscópio óptico nos tecidos ou na hemolinfa dos insetos infectados. Os poliedros são altamente refráteis e brilhantes sob a luz do microscópio de contraste de fase. Estudos bioquímicos mostraram que o maior componente protéico destes cristais é a poliedrina, um polipeptídeo fosforilado com o peso molecular variando de 26 a 30 kdaltons (BILIMORIA, 1986). Os poliedros têm a função de proteger estes patógenos das condições ambientais adversas e conseqüentemente sua infectividade pode ser preservada durante muitos anos (STEINHAUS, 1960; JAQUES, 1985).

Estudos ao microscópio eletrônico revelaram que esses baculovirus se multiplicam exclusivamente no núcleo das células infectadas e tem como principais locais de replicação, a epiderme, as células sanguíneas, o corpo gorduroso, a traquéia e ocasionalmente as glândulas salivares (SMITH, 1976; GRANADOS & WILLIAMS, 1986). Alguns VPN que atacam himenópteros da família *Tenthredinidae* infectam principalmente as células epiteliais do mesentério do tubo digestivo, mas, em geral, estes baculovirus são poliorganotróficos (GRANADOS & WILLIAMS, 1986).

De modo geral, os sintomas produzidos por estes patógenos nas larvas são: pouca mobilidade, perda de apetite e exibem uma descoloração na porção ventral do corpo que se prolonga em seguida por todo o organismo. Posteriormente, devido a desintegração dos tecidos internos, as larvas tornam-se escuras. No início da infecção, as larvas sobem para o topo das plantas, e, depois se penduram nas folhas ou galhos, onde eventualmente liberam um líquido rico em poliedros que vai contaminar a planta (SMITH, 1976; BILIMORIA, 1986).

Em relação ao número de virions, os VPNs podem se apresentar sob duas formas: 1) com múltiplos virions por envelope ou membrana (Multiple Enveloped Virus - MEV) e 2) com apenas um virion por membrana (Single Enveloped Virus - SEV) incluso no poliedro. Constatou-se que o VPN do tipo MEV, além de ser mais virulento para seus hospedeiros, possui uma maior gama de hospedeiros do que o tipo SEV (GRONER, 1986); não obstante o MEV ser encontrado apenas infectando a ordem Lepidoptera (ROHRMANN, 1986). Estudos recentes, tem demonstrado que alguns desses virus são capazes de infectar e replicar em numerosas espécies de hospedeiros (GRONER, 1986). Mas, de modo geral esses baculovirus não infectam outros invertebrados além dos insetos (GRANADOS & WILLIAMS, 1986). Desse modo, o fato de que os VPN sejam específicos para os insetos oferece sem dúvida alguma uma vantagem incontestável na aplicação destes na luta biológica contra pragas de cultura de importância econômica (MALEKI-MILANI, 1978; GRONER, 1986).

2.1.1.1 VIRUS DE POLIEDROSE NUCLEAR DE *Anticarsia gemmatalis* (VPNAg)

O Virus de Poliedrose Nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (VPNAg) foi detectado em 1962, por STEINHAUS e MARSH, em larvas infectadas de *Anticarsia gemmatalis* (lepidóptero que ataca as leguminosas), coletadas em plantações de alfafa no Peru.

No Brasil, em 1972, transcorridos dez anos da descoberta daquele virus, foi isolado e descrito um VPNAg em lagartas mortas coletadas em culturas de soja na região de Campinas (ALLEN & KNELL, 1977), seguindo-se de constatações posteriores da presença deste virus em outras regiões do país (CARNER & TURNIPSEED, 1977; CORSO e cols, 1977; GATTI e cols, 1977).

Análises demonstraram que o VPNAg apresenta vários virions por membrana (MEV) inclusos no cristal ou poliedro (ALLEN & KNELL, 1977). Quanto a especificidade o VPNAg foi testado em oito espécies de Noctuidae, duas espécies de Pyralidae e uma espécie de Bombycidae e constatou-se que todos esses lepidópteros eram susceptíveis a esse virus (PAVAN e cols, 1981; PAVAN & BOUCIAS, 1981; GRONER, 1986).

Em 1981, PAVAN e colaboradores, mostraram que o VPNAg é infeccioso, quando aplicado em doses elevadas para lagartas de *Diatraea saccharalis* e *D. grandiosella*. Em trabalhos posteriores, realizou-se dez passagens seriadas com o VPNAg em larvas de *D.*

saccharalis (MATTA e cols, 1983; RIBEIRO & PAVAN, 1984; RIBEIRO, 1985; RIBEIRO & PAVAN, 1985a; RIBEIRO e cols, 1986; PAVAN e cols, 1988; PAVAN & RIBEIRO, 1988). Observou-se durante as dez passagens seriadas uma redução gradual dos valores de DL₅₀ (dose letal 50%). Quando comparado com a geração parental, o isolado F₁₀ do VPNAg apresentou-se com uma dose letal 50% (DL₅₀) 100 vezes menor do que o VPNAg Parental (VPNAgP), representando um aumento na virulência do isolado F₁₀ de 100 vezes para as larvas de *D. saccharalis*. Um fato de maior importância é que esse isolado F₁₀ manteve a mesma virulência para seu hospedeiro original, *Anticarsia gemmatalis*, passando a ser um patógeno eficiente para as duas espécies de pragas ou um bioinseticida bivalente (MATTA e cols, 1983; RIBEIRO, 1985; RIBEIRO & PAVAN, 1985a; RIBEIRO e cols, 1986; PAVAN & RIBEIRO, 1988). O isolado F₁₀ do VPNAg foi utilizado em todos os experimentos realizados neste estudo, bem como prosseguiu-se no processo de seleção genética do mesmo.

2.1.1.2 VIRUS DE POLIEDROSE NUCLEAR DE *Trichoplusia ni* (VPNTn)

O Virus de Poliedrose Nuclear de *Trichoplusia ni* (VPNTn) foi descrito em 1966, por HEIMPEL e ADAMS. Este virus foi originalmente obtido de larvas infectadas de *Trichoplusia ni*, coletadas em plantações de algodão em Maryland, nos Estados Unidos.

Estudos demonstraram que este baculovirus apresenta vários virions por membrana (MEV), inclusos no cristal ou poliedro (HEIMPEL & ADAMS, 1966). No que concerne a especificidade o VPNTn foi testado em quatro espécies de *Noctuidae*, e constatou-se que esses lepidópteros foram susceptíveis a esse virus. Em 1984, RIBEIRO e PAVAN, verificaram que o VPNTn é infeccioso, quando aplicado em doses elevadas, para as larvas de *D. saccharalis*. Em trabalhos posteriores, realizaram-se onze passagens seriadas com o VPNTn em larvas de *D. saccharalis*. Observou-se uma redução gradual dos valores de DL₅₀ (dose letal 50%) durante as onze passagens seriadas deste virus em *D. saccharalis*. Quando comparado com a geração parental, o isolado F₁₁ do VPNTn, mostrou uma dose letal 50% (DL₅₀), 800 vezes menor do que a do VPNTn Parental (VPNTnP), representando um aumento na sua virulência de oitocentas vezes para as larvas de *D. saccharalis* (RIBEIRO & PAVAN, 1985a; RIBEIRO e cols, 1986). Neste trabalho, portanto, além de prosseguirmos com a seleção deste virus, empregou-se o isolado F₁₁ do VPNTn em todos os demais experimentos realizados.

2.1.2 VIRUS DE GRANULOSE (VG)

Os Virus de Granulose (VG) constituem o subgênero B, da família **Baculoviridae** e se caracterizam por apresentarem um, ocasionalmente dois, e, raramente até nove virions no interior do cristal protéico (BILIMORIA, 1986). Os corpos de inclusão dos VG, são referidos como grânulos ou cápsulas, devido a sua forma cilíndrica (BERGOLD, 1948; GRANADOS & WILLIAMS, 1986). Estas cápsulas são pequenas, com comprimento que varia de 0,2 a 0,5 micrômetros, e, podem ser observadas em amostras de tecidos infectados, em microscópio de contraste de fase, onde aparecem como partículas escuras e dotadas de intenso movimento (movimento Browniano). Estudos bioquímicos demonstraram que o maior componente protéico da cápsula é a granulina, um polipeptídeo de 25 a 30 kdaltons (BILIMORIA, 1986).

A multiplicação destes baculovirus ocorre no núcleo ou citoplasma das células. De um modo geral, o principal órgão atacado é o corpo gorduroso. Porém, em algumas espécies de lepidópteros, outros tecidos em adição ao corpo gorduroso podem ser infectados (SMITH, 1976; CONSIGLI e cols, 1983; PAVAN e cols, 1983). Os VGs exibem limitado tropismo de tecido (GRANADOS & WILLIAMS, 1986).

Os sintomas produzidos por estes patógenos são inespecíficos, variando de inseto para inseto. Mas em geral, ocorre falta de apetite, perda de coloração e alongamento do ciclo larval. Aparecem manchas esbranquiçadas ou amarelo-leitosas e, em certos

casos, pode ocorrer a liquefação dos tecidos até a desintegração do tegumento do inseto, mas normalmente isto não ocorre (SMITH, 1976; BILIMORIA, 1986).

Um grande número de espécies de lepidópteros são infectados pelo VG, e parece que esses virus são específicos a essa ordem de inseto (DAVID, 1975; SMITH, 1976; CONSIGLI e cols, 1983; GRANADOS & WILLIAMS, 1986; GRONER, 1986). Foram isolados cerca de 100 VGs infectando diversas espécies na ordem Lepidoptera. Estes virus são altamente seletivos e parecem ser infecciosos apenas para os hospedeiros de uma mesma família (GRONER, 1986).

2.1.2.1 VIRUS DE GRANULOSE DE *Diatraea saccharalis* (VGDs)

O Virus de Granulose de *Diatraea saccharalis* (VGDs) foi isolado de lagartas infectadas do lepidóptero, *D. saccharalis*, uma das pragas mais importantes da cana-de-açúcar (BOL.TEC.IAA/PLANALSUCAR, 1981), coletadas no Sul dos Estados Unidos. Exames de laboratório demonstraram que esses virus, testados em uma série de espécies de lepidópteros mostraram-se específicos para aquele gênero. O Virus de Granulose de *D. saccharalis* (VGDs) é dotado de uma cápsula que mede cerca de 0,5 micrômetro de comprimento. Estudos ao microscópio eletrônico revelaram que este virus se replica no núcleo e no citoplasma da célula do hospedeiro e que o principal local atacado é o corpo gorduroso, apesar de que o VGDs poder ser encontrado em praticamente todos os outros tecidos da broca de cana, *D. saccharalis*. Os sintomas externos da broca de cana infectada com o VGDs são similares a esses descritos para outras lagartas de lepidópteros. Esse baculovirus infecta todos os estádios larvais de *D. saccharalis* e a mortalidade desses insetos é proporcional à dose (PAVAN, 1983; PAVAN e cols, 1983). O VGDs é muito virulento para a *D. saccharalis* e representa importante agente microbiológico contra a broca de cana como constatado nos testes de laboratório (PAVAN e cols, 1983) e de campo (ALMEIDA e cols, 1984).

2.2 ESTABILIDADE TÉRMICA DE BACULOVIRUS

Os baculovirus, como os outros virus, são inativados em temperaturas elevadas (YOUNG III & YEARIAN, 1986). Os experimentos de estabilidade térmica encontrados na literatura demonstram uma certa homogeneidade para os baculovirus inclusos. Essa homogeneidade para os baculovirus reflete a similaridade na constituição destes virus (RIBEIRO & PAVAN, 1985b).

De modo geral, observa-se que em temperaturas superiores a 80°C, os baculovirus são totalmente inativados em menos de quinze minutos de exposição (BERGOLD, 1958; JAQUES, 1977; 1985; MARTIGNONI & IWAI, 1977; BEDFORD, 1981). O Virus de Poliedrose Nuclear de *Heliothis virescens* (VPNHv), é um dos baculovirus testados mais estáveis, visto que mantém alguma infectividade após 55 minutos de exposição a 93,3°C (STUERMER & BULLOCK, 1968).

Diversos estudos demonstraram que a maioria dos baculovirus são completamente inativados em menos de 1 hora a temperaturas superiores a 65°C, enquanto que a 60°C chegam a resistir por 24 horas até sua inativação completa (TANADA, 1953; 1959; GUDAUSKAS & CONNERDAY, 1968; LOWE & PASCHKE, 1968; PAWAR & RAMAKRISHNAM, 1971; LATHIKA & JACOB, 1974; MARTIGNONI & IWAI, 1977; HARPAZ & RACCAH, 1978; JAQUES, 1985). Por exemplo, o Virus de Granulose de *Pieris brassicae* (VGPb) é inativado quando exposto a 70°C por 10 minutos, ao passo que quando tratado a 60°C por um dia (24 horas) não é inativado totalmente

(DAVID & GARDINER, 1967). MARTIGNONI e IWAI (1977), distinguiram dois tipos de Virus de Poliedrose Nuclear de *Orgyia pseudotsugata* através das diferenças de termoestabilidade nessa faixa de temperatura (60°C a 65°C). Esses autores verificaram que o tipo SEV é menos estável do que o tipo MEV, sendo inativado a 65°C por 30 minutos e a 60°C por 4 horas; enquanto que o tipo MEV requereu 1 hora de exposição a 65°C e 14 horas de exposição para ser totalmente inativado a 60°C.

Alguns virus são capazes de resistir por até 5 dias, sem perder totalmente sua infectividade em temperaturas de 50°C (TANADA, 1953; DAVID & GARDINER, 1967; GUDAUSKAS & CONNERDAY, 1968; TANADA & CHANG, 1968; JAQUES, 1985; YOUNG III & YEARIAN, 1986).

Certos baculovirus são capazes de suportar temperaturas de 40°C, mantendo a infectividade por períodos bem longos, que vão de 5 a 20 dias de exposição (DAVID & GARDINER, 1967; STUERMER & BULLOCK, 1968; MORRIS, 1971; JAQUES, 1985; YOUNG & YEARIAN, 1986). Desse modo, os baculovirus não parecem ser significativamente afetados pelas temperaturas encontradas frequentemente nos habitats naturais (JAQUES, 1977). Contudo, apesar da resistência dos virus a temperaturas ambientais por um período razoável de tempo, a estabilidade térmica passa a ter importância mesmo em temperaturas mais amenas quando se trata de estocagem de produtos experimentais ou comerciais durante períodos de mais de um ano.

Em 1976, KINSINGER e McGAUGHEY, verificaram que o Virus de Granulose de *Plodia interpunctella* (VGPi) quando estocado em uma

temperatura constante de 42°C por 42 semanas, foi inativado em cerca de 90%. Já o Virus de Poliedrose Nuclear de *Cadra cautella* (VPNCc) estocado a essa mesma temperatura, por um período de apenas 28 dias, foi inativado em cerca de 80% (HUNTER e cols, 1973). Mas esse mesmo virus foi parcialmente inativado quando exposto a 42°C por 14 dias, indicando que é capaz de suportar esta temperatura elevada.

Segundo revisão feita por JAQUES (1985) o Virus de Poliedrose Nuclear de *Cadra cautella* (VPNCc), formulado em farelo, foi bem mais estável do que o Virus de Poliedrose Nuclear de *Heliothis* formulado em pó, quando estocados na temperatura de 45°C.

A atividade do Virus de Granulose de *Plodia interpunctella* não foi reduzida substancialmente quando estocado durante 1 ano na faixa de temperatura de - 19°C a 48°C (KINSINGER & McGAUGHEY, 1976).

Está bem estabelecido que os Virus de Poliedrose Nuclear (VPN) e os Virus de Granulose (VG) retém atividade por longos períodos quando estocados com seus cristais protéicos em suspensão aquosa ou como pó seco, no escuro (JAQUES, 1985). Por exemplo, DAVID e GARDINER (1967), estocaram grânulos de Virus de Granulose de *Pieris brassicae* (VGPb) em pó seco, por 4 anos, no escuro e em temperatura ambiente, sem perda de atividade. Enquanto os baculovirus com seus poliedros retém atividade por longos períodos, os virions livres, liberados dos corpos de inclusão mantém infectividade por períodos curtos, poucas horas ou dias em alguns casos (IGNOFFO & McINTOSH, 1988). SHAPIRO e IGNOFFO (1969), mostraram que a atividade dos virions do Virus de

Foliedrose Nuclear de *Heliothis*, liberados dos poliedros perderam cerca de 50% de sua atividade quando estocados a 40°C, em menos de cinco dias de exposição.

A estabilidade térmica dos baculovirus inclusos (VPN e VG) parece depender da resistência do corpo de inclusão ou cristal protéico à desnaturação (JAQUES, 1977; 1985). O cristal protéico tem a função de proteger os virus das condições adversas do meio ambiente (JAQUES, 1985), devido à suas propriedades peculiares, tais como a de resistir à decomposição proteolítica de microorganismos comumente encontrados no solo, bem como a de proteger estes patógenos de ação indesejável de proteases e outras enzimas, durante o processo de infecção em um dado hospedeiro (STAIRS, 1968; SMITH, 1976; JAQUES, 1985). Esses cristais ou corpos de inclusão consistem apenas de proteína, as quais se encontram em contínuo movimento, mesmo no estado cristalino em temperaturas de 0°C. Os átomos constituintes dessas proteínas, são dotados de vibração, rotação e mesmo pequenas translações da ordem de 0,2 a 0,5 Å e em temperaturas muito elevadas (45°C a 85°C) as proteínas perdem grande parte de sua ordem e são "desnaturadas". A resistência da proteína à desnaturação vai depender da sua natureza, isto é, da sua composição de aminoácidos (KLIBANOV & AHERN, 1987). Contudo, segundo esses mesmos autores, quase todas as proteínas conhecidas são inativadas ou desnaturadas a 100°C. Desse modo, a provável causa da perda de viabilidade dos virus em temperaturas muito altas parece ser a desnaturação de suas proteínas do corpo de inclusão (JAQUES, 1985).

As atividades metabólicas de um organismo são a soma de todas as reações químicas, e sendo estas influenciadas pela temperatura, conclui-se que os processos vitais são por ela afetados. A viabilidade de uma célula ou de um organismo esta associada com a manutenção das suas proteínas em seu estado normal. Temperaturas altas ocasionam desnaturação irreversível desses constituintes vitais ou dessas proteínas (BLOCK, 1976).

2.3 EFEITOS DE DIFERENTES TEMPERATURAS NO DESENVOLVIMENTO DA INFEÇÃO VIRAL

As relações entre o vírus e seu inseto hospedeiro podem ser modificadas por diversos fatores. Estes fatores podem mudar os níveis de susceptibilidade dos insetos aos vírus infectantes. A temperatura é um dos fatores que apresenta maior relevância devido à sua grande influência sobre o complexo sistema vírus versus hospedeiro.

Observações experimentais dos efeitos de diferentes temperaturas no desenvolvimento do processo infeccioso de um dado microorganismo em seu hospedeiro, datam desde 1878 (PASTEUR e cols). A partir desta data, se tem conhecimento de que cada espécie de organismo se multiplica sob temperaturas situadas em faixas características.

No caso dos baculovirus, para se analisar o efeito da temperatura no desenvolvimento da infecção dos mesmos, faz-se necessário levar em consideração o comportamento dos insetos, seus hospedeiros naturais, em função deste fator. Os insetos são poiquilotérmicos e embora existam em condições mais diversas de temperatura, desde o Ártico até o Equador, sua atividade é regulada de forma similar, isto é, para a maioria dos insetos, a faixa favorável para o desenvolvimento e atividade dos mesmos, está ao redor de 15°C a 35°C. Abaixo de 15°C ou acima de 35°C, encontram-se as faixas desfavoráveis onde os insetos entram em processo de diapausa

temporária ou permanente (ALVES, 1986a). Portanto, para a produção de baculovirus é necessário se manter a temperatura numa faixa favorável ao desenvolvimento do inseto hospedeiro, já que sua multiplicação é feita exclusivamente sobre este inseto. As temperaturas favoráveis ao desenvolvimento dos baculovirus em seus respectivos hospedeiros estão na faixa de 25°C a 30°C (HARPER, 1986; ALVES, 1986a). Esta faixa é também a mais indicada para a maioria dos patógenos conhecidos (ALVES, 1986a).

No entanto, apesar dos organismos exibirem uma faixa relativamente ampla de temperaturas favoráveis ao seu desenvolvimento, há apenas uma "temperatura ótima", onde ocorre o processo de multiplicação ou crescimento destes mais rapidamente. Segundo KELLY (1981), cada patógeno deve ter uma temperatura ótima de desenvolvimento no hospedeiro infectado. E, de acordo com JOHNSON e cols (1982), deve-se esperar uma similaridade entre a temperatura ótima do hospedeiro e do vírus infectante, visto que este último é um parasita intracelular e necessita de muitos sistemas enzimáticos do hospedeiro para sua replicação. Contudo, o que se tem constatado na maioria dos casos estudados, é que a temperatura ótima para o desenvolvimento viral não é a mesma de seu hospedeiro natural (SMITH e cols, 1961; DAY & DUDZINSKI, 1966; WITT & STAIRS, 1976; JOHNSON e cols, 1982; ALVES, 1986a; FEEMERS, 1986). Apesar dessa não similaridade, entre a temperatura ótima do hospedeiro e a do vírus infectante, se verifica, entretanto, que a temperatura do desenvolvimento do inseto e da replicação viral são intimamente relacionadas (EVANS, 1986). No caso de infecções mistas, em culturas

de células de insetos, verificou-se que um vírus evita a replicação ou tem vantagem sobre o outro vírus, quando o mesmo foi incubado em sua temperatura ótima; indicando uma complicada interação dependente da temperatura. Assim fica claro que a temperatura pode afetar significativamente a expressão de cada patógeno nas infecções mistas virais (SHVETSOVA & TSAI, 1962; KELLY, 1981).

Segundo STAIRS (1978), a temperatura atua sobre a faixa de desenvolvimento viral tanto na fase larval como na fase pupal do inseto hospedeiro. Considerando, então, a influência da temperatura e tempo de exposição sobre a manifestação da infecção viral, tem sido observado frequentemente que em temperaturas baixas ou elevadas pode ocorrer uma indução de uma maior resistência ou de uma maior susceptibilidade dos insetos hospedeiros às viroses. Observações experimentais dos efeitos de diferentes temperaturas no desenvolvimento da infecção viral em insetos, demonstram que de modo geral, quando os insetos hospedeiros são expostos a temperaturas de 16°C a 18°C, o vírus infectante se desenvolve lentamente e a produção viral é significativamente pequena, indicando que as condições metabólicas dos insetos não são suficientemente alteradas (WITT & STAIRS, 1976; STAIRS, 1978, 1979; BOUCIAS e cols, 1980). Em temperaturas próximas de 20°C a 24°C, comumente a produção viral é muito reduzida e o inseto hospedeiro exibe um acentuado aumento na duração do seu estágio larval (STAIRS, 1978; SHAPIRO, 1986). Já a produção e a atividade viral são muito similares quando os insetos hospedeiros são mantidos em temperaturas de 25°C a 27°C (SHAPIRO, 1986). Em geral, a taxa de mortalidade por infecção viral é maior e

mais rápida em temperaturas na faixa de 28°C a 30°C, onde ocorre também uma maior atividade e produção viral (JOHNSON e cols, 1982; SALAMA e cols, 1986; SHAPIRO, 1986). A produção viral é mais lenta e menor quando os insetos hospedeiros são mantidos em temperaturas próximas de 31°C a 34°C (SHAPIRO, 1986). Temperaturas de 35°C tem efeitos detrimenais sobre os baculovirus e os demais virus de insetos (YADAVA, 1970). O Virus Iridescente de *Sericesthis* foi capaz de manter o estado de infecção viral, mas não foi capaz de se multiplicar em larvas de *G. mellonella* a 35°C (DAY & DUDZINSKY, 1965). O baculovirus de *Yponomeuta evonymellus* foi totalmente suprimido quando larvas de *Y. evonymellus* infectadas com este respectivo virus foram mantidas a 35°C (FEEMERS, 1986). Larvas de *Heliothis virescens* infectadas com o Virus de Poliedrose Nuclear de *Heliothis* e mantidas a 36°C, além de não exibirem sintomas de infecção viral, sofreram leves efeitos teratológicos (SHAPIRO, 1986).

Estudos prévios indicaram que ocorrem pelo menos dois mecanismos diferentes em tratamento com temperaturas próximas a 37°C no desenvolvimento da infecção viral:

- 1) Um é o mecanismo referido como "terapia termal". Este processo se dá pela eliminação dos virus que estão nas células do intestino médio para o lumen, onde saem com as fezes, permitindo assim uma regeneração das células do intestino médio previamente infectadas com virus (TANADA, 1967; WATANABE & TANADA, 1972; INOUE & TANADA, 1977).
- 2) Um segundo mecanismo é que temperaturas próximas a 37°C restringem o desenvolvimento do virus inibindo a produção de constituintes vitais para a replicação do mesmo (STAIRS, 1978; KOBAYASHI e cols, 1981; SAID

& SIKOROWSKI, 1986; SHAPIRO, 1986).

Os baculovirus como os demais virus de insetos são incapazes de infectar seus respectivos hospedeiros em temperaturas na faixa de 38°C a 40°C. Nesta mesma faixa de temperatura, larvas de *H. virescens* infectadas com Virus de Poliedrose Nuclear de *Heliothis*, além de sofrerem de severos efeitos teratológicos, ficaram estéreis (SHAPIRO, 1986). Segundo STAIRS (1978), quando os insetos são expostos a temperaturas na faixa de 38°C a 40°C, aparentemente ocorrem alterações a nível de membranas das células desses hospedeiros como também uma disfunção enzimática dificultando a replicação dos virus. Temperaturas elevadas na faixa de 38°C a 40°C reduzem a atividade das enzimas relacionadas ao DNA viral, bem como podem produzir um defeito no transporte do RNA ao meio circundante e aumentar em duas a três vezes o tamanho do RNA mensageiro transcrito viral (HARPER e cols, 1978). Desse modo, quando os insetos são mantidos nessa faixa de temperatura, ocorre uma significativa inibição tanto ao nível de transcrição como o nível protéico do virus, isto é, na síntese viral (HARPER e cols, 1978; WATANABE & MAEDA, 1979; KOBAYASHI & KAWASE, 1980; KOBAYASHI e cols, 1981; KAWASE, 1985; BENSUAUDE & MORANGE, 1986; BONATO & JULIANI, 1987).

Um aumento na temperatura do hospedeiro pode assim ser um fator muito importante na sua recuperação, uma vez que temperaturas superiores a 31°C reduzem significativamente a multiplicação viral (BENNETT & NICASTRI, 1960; BARON, 1970; BONATO & JULIANI, 1987). É reconhecido que a elevação da temperatura de animais infectados, de

modo geral, inibe dramaticamente uma diversidade de infecções virais, e, evidências complementares a esta demonstraram que o aumento da severidade de várias infecções virais é seguida de uma redução na temperatura do organismo (BARON, 1970; ; BONATO & JULIANI, 1987).

2.4 MECANISMOS DE DEFESA DOS INSETOS ENVOLVIDOS NA INIBIÇÃO VIRAL

A interação de vírus com seu hospedeiro envolve uma relação muito complexa. As implicações desta relação são muitas e variadas e dependem tanto das características virais como da susceptibilidade do hospedeiro. Durante a infecção viral as células do hospedeiro estão intimamente comprometidas nos vários estágios do ciclo de replicação viral (YARCHOAN e cols, 1988).

Quando um vírus infecta um hospedeiro vertebrado, este hospedeiro frequentemente responde pela produção ativa de anticorpos específicos dirigidos contra o invasor. O sistema imune altamente eficiente do vertebrado não apenas elimina o agente infeccioso como comumente pode evitar uma reinfecção viral. E, é graças a vigilância imunológica que os vertebrados mantêm a sua integridade e a constância de sua composição, desembaraçando-se de substâncias heterólogas (HARNDEN, 1988). No entanto, a capacidade de elaborar a resposta imune aparece pela primeira vez na série animal só nos peixes agnatas (ciclóstomos). Nesses animais, verifica-se que a capacidade imunológica coincide com o desenvolvimento, embora rudimentar, do tecido linfóide e com o aparecimento de gamaglobulina no soro. A partir dos elasmobrânquios (arraias, tubarões), através de anfíbios, répteis e aves, a capacidade imunológica aumenta progressivamente em paralelo com o desenvolvimento do tecido linfóide, para atingir o máximo nos mamíferos (BIER, 1976).

Em relação, aos invertebrados, o fato destes possuírem um verdadeiro sistema imunológico, é uma questão muito debatida. Existe uma grande tendência a restringir o termo "sistema imunológico" aos sistemas de defesa encontrados em aves e mamíferos, nos quais as alterações causadas por um agente patogênico ou substância estranha (antígeno) levam à produção das substâncias específicas, os anticorpos e ao estabelecimento de uma memória antigênica (HARNDEN, 1988).

Os insetos, dentre os diversos grupos de animais que povoam a biosfera, constituem o grupo mais amplo, e, evidentemente, durante sua evolução, foram submetidos a diversos ataques de predadores, parasitas e microorganismos, incluindo os vírus, e é claro, portanto, que os mesmos protegem-se contra agentes patogênicos e excluem substâncias estranhas, produzindo moléculas ou reações celulares que possuem o mesmo valor defensivo, porém, possivelmente com estratégias diferentes das observadas em vertebrados (MENEZES, 1984). Estes mecanismos de defesa dos insetos contra agentes estranhos podem ser considerados como constituindo um sistema imune, apenas no **sensu lato**, uma vez que as condições para a aplicação do termo no seu **sensu strictu**, utilizado pelos imunologistas, restringe-se, como mencionado anteriormente, aos mecanismos de defesa possuidores de memória e especificidade, envolvendo imunoglobulinas. Estas condições, pelo menos até o presente momento, não foram comprovadamente estabelecidas entre os insetos (HILDEMANN, 1974; MENEZES, 1984; SHERMAN, 1985a, 1985b).

Apesar de menos complexo que os sistemas de aves e mamíferos, não há dúvida alguma quanto ao fato dos insetos possuírem mecanismos de defesa que atuam de maneira eficiente na eliminação dos vírus. A "imunidade" dos insetos, podem ser subdividida em imunidade celular e imunidade humoral, independentemente da discussão sobre a aplicação ou não desse termo a estes mecanismos de defesa em insetos. A imunidade de defesa celular compreende reações que envolvem diretamente os hemócitos, células fagocíticas primitivas. Já a reação de defesa humoral ou imunidade humoral é evidentemente não celular e corresponde à produção de anticorpos nos mamíferos. Sua existência é muito discutida nos insetos e esta é aceita como um complemento da imunidade celular. Nos mecanismos de defesa humoral há um envolvimento indireto dos hemócitos. Substâncias produzidas por estas células são liberadas na hemolinfa dos insetos. Os hemócitos podem sintetizar muitas substâncias com poder microbicida, incluindo muitos fatores humorais. E, dentre esses fatores, acredita-se que as heteroaglutininas desempenhariam um importante papel no reconhecimento de agentes estranhos (SIDEN, 1983; MENEZES, 1984). Baseado em conhecimentos recentes, no entanto, sabe-se que o "sistema imune" dos insetos (celular e humoral) tem uma função muito pequena em infecções virais. Em geral, a proliferação dos vírus é tão grande que estes mecanismos de defesa são "desarmados" e estes artrópodos são infectados (SHERMAN, 1985a, 1985b).

Os dados indicam que o "sistema imune" não é o único existente capaz de inibir a ação viral mesmo em vertebrados (ASKONAS, 1988; HARNDEN, 1988). A recuperação completa de uma variedade de

infecções virais foi verificada na completa ausência da imunidade em vários animais testados e nos seres humanos. Quantidades fisiológicas de anticorpos não parecem alterar o curso de infecção viral após os vírus estarem estabelecidos em determinados órgãos alvos. Esse processo pode ser explicado pelo fato de que os anticorpos agem no espaço extracelular e não entram na célula, e todos os vírus conhecidos se multiplicam no interior da célula; daí a pouca eficiência dos anticorpos (BARON, 1970; ASKONAS, 1988; HARNDEN, 1988).

A cura ou recuperação de uma infecção viral, em insetos, pode ser dada por mecanismos que não envolvem, a imunidade celular ou humoral e estes incluem: indução de interferon, auto-interferência viral e a resistência natural dos insetos. O interferon foi descoberto por ISAACS e LINDENMANN, em 1957, no decurso de estudos sobre o efeito de vírus da influenza inativado por luz ultra-violeta sobre os fragmentos da membrana corioalantóica de embrião de galinha, mantida num meio artificial. O interferon é uma proteína excepcionalmente estável em pH baixo, que pode ser produzida pelas células do hospedeiro logo no início da infecção viral, e inibe ou bloqueia a transcrição primária do RNA viral. Está estabelecido que existe 3 tipos de interferons: alfa, beta e gama, os quais são produzidos em quantidades variáveis e diferem por suas propriedades estruturais, imunológicas e antivirais. Os interferons apresentam uma gama ampla de atividades (HARNDEN, 1988). Pesquisas demonstram que o interferon é um fator muito potente com seu efeito inibitório nas infecções virais, em diversos vertebrados analisados. Em insetos, há poucos relatos na literatura sobre a produção de interferon. Uma grande maioria de

pesquisadores não notou nenhuma produção de interferon em insetos ou culturas de células de insetos (SHERMANN, 1985a, 1985b). Verificou-se a presença de uma substância com atividade similar ao interferon, quando culturas de células do inseto *Spodoptera frugiperda*, infectados com o Virus de Poliedrose Nuclear de *Spodoptera*, se tornaram super-resistente à infecção deste baculovirus (BURAND e cols, 1986). Da mesma forma, em culturas de células de mosquito *A. aegypti* e *A. albopictus* ocorreu supressão do Virus de Febre Amarela pela indução de interferon. McINTOSH e IGNOFFO (1981), sugerem existir outros inibidores virais com modos de ação diferente (produtos celulares) em insetos.

No que tange a auto-interferência viral, este é um tema de fundamental importância. Embora a auto-interferência, não seja um dos mecanismos de defesa produzido pelas células de insetos, não podemos deixar de mencioná-lo, uma vez que este processo produz também inibição viral nestes artrópodos. Evidências deste mecanismo ocorreram em células de cultura de mosquito, que foram persistentemente infectadas com togavirus, liberando no meio de cultura fatores que interferiram com a replicação do vírus homólogo (TER MEULEN & MARTIN, 1976; REIDEL & BROWN, 1977, 1979; SHERMAN, 1985a, 1985b; BURAND e cols, 1986). Estudos bioquímicos posteriores demonstraram que esta substância inibitória da replicação viral não se tratava de interferon, e sim de uma proteína derivada do próprio cristal viral, denominada de V-1. Um estudo recente, com diversos togavirus em vários tipos de culturas de células exibiram este mecanismo de auto-interferência produzido pela proteína do cristal viral. Segundo BURAND

e cols (1986), é possível que mecanismos similares ocorram com baculovirus infectando persistentemente culturas de células de insetos. Este mesmo autor sugere a continuação destes estudos, para conhecer a função deste fator de origem viral, no processo de auto-interferência. É considerável o interesse da descoberta de outros indutores (de origem viral ou não) da inibição viral. Uma parcela importante do nosso conhecimento atual a respeito da inibição viral desenvolveu-se com vertebrados. Todavia, para compreensão deste complexo problema, são necessários estudos em invertebrados, os quais podem elucidar mecanismos correlatos envolvidos neste processo. Por exemplo, uma consequência inusitada da infecção pelo Virus de Poliedrose Citoplasmática de *Bombyx mori* no lepidóptero *Hyphantria cunea*, foi seu rápido restabelecimento natural, pela regeneração de células infectadas por células novas sadias (YAMAGUCHI, 1979). Em alguns insetos, as células recém regeneradas não são susceptíveis à infecção viral (SHERMANN, 1985a, 1985b). Um fenômeno semelhante ocorre em *Diprion hercyniae*, cujo estágio pré-pupal é resistente à infecção do Virus de Poliedrose Nuclear de *D. hercyniae*. Este virus se multiplica exclusivamente no núcleo das células epiteliais do intestino médio e durante a metamorfose estas são substituídas por células embrionárias não susceptíveis à infecção viral (SMITH, 1976). Os dados indicam que a resistência natural dos insetos tem uma função muito importante na inibição da infecção viral (BURAND e cols, 1986).

Por outro lado, um dos aspectos mais intrigantes na patologia dos insetos é a questão da eficiência da vacina na proteção destes respectivos artrópodos. A vacina é definida uma substância de

origem microbiana capaz de estimular no organismo que a recebe um estado de resistência parcial ou total, contra determinada infecção (MATTEWS & BOLOGNESI, 1988). A vacina é o método mais antigo utilizado para controlar uma infecção viral. Já era conhecido pelos chineses e hindus que a inoculação artificial do vírus contido nas pústulas dos variolosos, produzia doença relativamente benigna, que deixava sólida proteção. JENNER (1798) introduziu a vacinação contra a varíola humana por meio do vírus da varíola bovina. Em homenagem a descoberta fundamental de JENNER, isto é, a proteção contra a varíola humana com o vírus da varíola da vaca, receberam as suspensões de germes usados para a imunização o nome de vacina, da palavra latina "vacca" (PELCZAR e cols, 1981). As vacinas podem ser constituídas de suspensões de germes mortos (pelo calor ou por agentes químicos diversos) ou vivos. As vacinas de suspensões de germes vivos podem ser plenamente virulentas, ou atenuadas (possuindo virulência enfraquecida) natural ou artificialmente. Já as chamadas "auto-vacinas" ou vacinas autógenas, utilizadas geralmente com finalidade terapêutica, são preparadas com germes isolados do próprio paciente (HARNDEN, 1988). O método de vacinação é simples, seguro e a forma mais efetiva de prevenção, e tem um sucesso legendário contra os vírus (MATTEWS & BOLOGNESI, 1988). Porém, devido a uma escassez substancial de dados na literatura, pouco se sabe a cerca do efeito da vacina no controle viral em insetos. Desde o relato de vacinação do bicho-da-seda, *Bombyx mori*, contra o Virus de Poliedrose Nuclear de *B. mori*, apenas duas tentativas foram realizadas no sentido de compreender os mecanismos envolvidos neste processo (CARBONE & FORTUNA, 1965). A vacinação de *B. mori* contra o Virus Jaundice de *B. mori* foi efetiva. Mas já a tentativa

de vacinação das larvas de *Malacossoma disstria* contra doses sub-letais do Virus de Poliedrose Nuclear de *M. disstria* não obteve sucesso. Não ocorreu nenhum sinal de resistência daqueles insetos durante o intervalo de cinco dias entre a dose inicial e a segunda dose (RAHEJA & BROOKS, 1971). É evidente, diante desses poucos dados a necessidade de se estudar os efeitos de vacinação em insetos.

2.5 SELEÇÃO GENÉTICA DE VIRUS DE POLIEDROSE NUCLEAR (VPN)

Os Virus de Poliedrose Nuclear (VPN) são capazes de se replicar em uma gama ampla de hospedeiros. Foram descritos alguns VPN em insetos das ordens Orthoptera, Neuroptera, Trichoptera, Coleoptera, Hymenoptera e Diptera. Mas a maioria desses baculovirus foi isolado de espécies de lepidópteros, que infestam culturas economicamente importantes. De modo geral, os VPN são específicos aos insetos, sendo raramente encontrados em outros invertebrados além destes artrópodos (GRANADOS & WILLIAMS, 1986). Nos primeiros trabalhos sobre especificidade, descrevia-se os VPN como espécie-específicos em relação aos hospedeiros, isto é, cada VPN seria capaz de infectar apenas a espécie de inseto do qual havia sido isolado (BERGOLD, 1958). Contudo, estudos posteriores tem demonstrado que alguns desses virus são capazes de infectar e replicar em numerosas espécies de hospedeiros (GRONER, 1986). O Virus de Poliedrose Nuclear de *Autographa californica* (VPN_{Ac}), por exemplo, infecta pelo menos 34 espécies em 12 famílias diferentes de Lepidoptera, segundo revisão feita por RODRIGUES (1989). Assim também, o Virus de Poliedrose Nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (VPN_{Ag}) se replica em membros de diferentes famílias de lepidópteros (FAVAN e cols, 1981; RIBEIRO, 1985).

Investigações demonstram que a infectividade dos VPN para seus hospedeiros alternativos difere consideravelmente da dos seus hospedeiros originais (EVANS, 1986). Doses significativamente elevadas

destes virus são requeridas para infectar hospedeiros alternativos (PAVAN e cols, 1981; RIBEIRO, 1985; EVANS, 1986; GRONER, 1986; RODRIGUES, 1989). Em 1979, CARNER e cols, por exemplo, relataram que as lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com $2,5 \times 10^6$ cristais/lagarta não eram susceptíveis ao VPNAg. Todavia, mais tarde, PAVAN e colaboradores (1981) demonstraram que essa espécie é susceptível a altas doses do VPNAg como a de $12,5 \times 10^6$ cristais/larva. Portanto, esses dados demonstram claramente a importância do uso de doses elevadas do vírus em estudo, que se justifica pelo fato de aumentar a possibilidade da presença de formas ou isolados genéticos diferentes (PAVAN e cols, 1981; RIBEIRO, 1985). Segundo revisão feita por MARUNIAK e cols (1986) foram detectados mais de 500 isolados de baculovirus.

Um grande número de autores constataram diferenças na virulência entre isolados geográficos obtidos de uma mesma espécie de VPN (SHAPIRO & IGNOFFO, 1970; SMITH & SUMMERS, 1978; VLAK & GRONER, 1980; GETTING & MCCARTHY, 1982; KISLEV & EDELMAN, 1982; ALLAWAY & PAYNE, 1983; CHERRY & SUMMERS, 1985; CROIZIER e cols, 1986). Em estudos mais recentes, demonstrou-se também que variantes genotípicas que ocorrem naturalmente na população viral podem apresentar variação em sua virulência (GRONER, 1986). Dados na literatura indicam uma associação entre a virulência de isolados de VPN e o padrão de restrição do DNA viral (GETTING & MCCARTHY, 1982; HUGHES e cols, 1983; CHERRY & SUMMERS, 1985). Apesar do pequeno número de trabalhos relacionando a atividade biológica às mudanças no DNA nos VPN, é evidente que há um sistema de variabilidade genética na população dos

virus que assegura sua adaptabilidade num processo coevolutivo associado ao seu hospedeiro (PAVAN, 1988). Em virtude desta variabilidade na população viral seria possível selecionar através de metodologia adequada variantes genéticas mais virulentos para um dado hospedeiro. Diversos trabalhos demonstraram a importância de se realizarem passagens seriadas a fim de selecionar isolados mais virulentos de VPN em sistema biológico alternativo (RIBEIRO, 1985; PAVAN, 1988; RODRIGUES, 1989).

A propagação de VPN em culturas de células de insetos apresenta vantagem de ser um sistema mais simples do que "in vivo" (McKINNON e cols, 1974; WEISS e cols, 1981). Todavia, de prévias tentativas descritas na literatura, poucas até a presente data obtiveram sucesso na passagem seriada de VPN *in vitro* (FAULKNER & HENDERSON, 1972; SOHI & CUNNINGHAM, 1972; VAIL e cols, 1973; WEISS e cols, 1981; TOMPKINS e cols, 1988) e esses trabalhos, contudo, não excederam a quinze passagens seriadas. Estudos constataram que os VPN em geral diminuíram sua virulência após a 15ª passagem seriada em culturas de células de inseto (McKINNON e cols, 1974; HIRUMI e cols, 1975; YAMADA e cols, 1982). Segundo BURAND e SUMMERS (1982), a passagem prolongada de VPN *in vitro*, apesar de ser um processo pouco conhecido do ponto de vista molecular, há indicações de que ocorra alterações a nível de genoma da população viral.

Frequentemente, passagens seriadas prolongadas resultam na produção de variantes que exibem alterações morfológicas (VOLKMAN & KNUSON, 1986). Essas alterações se caracterizam em variantes que podem

se apresentar com muitos poliedros (MP - do ingles, many polyhedres) ou com o fenótipo com poucos poliedros (FP - do ingles, few polyhedres). FRASER e HINK (1983), verificaram que os variantes FP são defeituosos em algumas proteínas envolvidas na síntese do envelope viral e na estrutura de seus nucleocapsídeos, falhando ao serem envelopados ou ao reterem o poliedro no núcleo das células hospedeira. Estudos recentes constataram que a maioria dos mutantes FP adquiriam sequências de DNA do genoma do hospedeiro sob a forma de transposon do tipo "copia-like" (BURAND & SUMMERS, 1982, 1983; MILLER & MILLER, 1982; FRASER e cols, 1983; McINTOSH & IGNOFFO, 1986; CARSTENS, 1987; BEAMES & SUMMERS, 1988). Esses elementos transponíveis são de fundamental importância como contribuintes para a produção espontânea desses mutantes FP, em passagens seriadas prolongadas de VPN *in vitro* (FRASER e cols, 1983, 1985). É provável que tais elementos tiveram influência na evolução dos baculovirus e devido a interação estável destes no DNA genômico viral, acredita-se que possivelmente possam afetar até mesmo a especificidade dos hospedeiros invertebrados (MILLER, 1986).

No que concerne ao processo de passagens seriadas de VPN *in vivo*, muitos autores conseguiram obter isolados mais virulentos para o hospedeiro alternativo (VEBER, 1962; SMIRNOFF, 1963; SHAPIRO & IGNOFFO, 1970; ORLOVSKAYA, 1975; STAIRS e cols, 1981; TOMPKINS e cols, 1981; SHAPIRO e cols, 1982; RIBEIRO, 1985; RODRIGUES, 1989). Contudo, excetuando RIBEIRO (1985) e RODRIGUES (1989), os demais autores não conseguiram isolados com aumento de virulência muito superiores ao valor original observado, isto é, dentre os valores descritos na

literatura para aumento de virulência de VPV após sucessivas passagens seriadas em hospedeiros alternativos, o maior foi o encontrado por TOMPKINS e cols (1981), que verificaram um aumento de 10 vezes na capacidade do VPVAc infectar larvas de *T. ni* após passá-lo 13 vezes por *S. exigua* e 2 por *T. ni*. O aumento obtido por RIBEIRO (1985) para o VPVAg e o VPNTN, após 10 e 11 passagens por *D. saccharalis*, foi de 100 e 800 vezes respectivamente, valores extremamente altos quando comparados aos outros encontrados na literatura. Porém, resultados surpreendentes foram obtidos por RODRIGUES (1989), quando obteve um aumento de cerca de 1000 vezes após somente 5 passagens do VPVAc em *D. saccharalis*. Neste trabalho, como no de RIBEIRO (1985), considerou-se como aumento de virulência a redução proporcional da DL₅₀. Não obstante, ambos apresentarem uma grande alteração deste valor, a verificada por RODRIGUES (1989) foi bem mais rápida ao longo das sucessivas passagens do que a constatada por RIBEIRO (1985).

A explicação mais provável para esses aumentos significativos de virulência é que a cada passagem seriada no hospedeiro alternativo, pequenas inserções, deleções ou outras mutações fossem sendo introduzidas gradualmente no genoma viral (FAVAN & RIBEIRO, 1988; RODRIGUES, 1989). Já foram descritos vários casos na literatura de alteração do DNA viral após passagens seriadas em hospedeiros alternativos (VAIL e cols, 1982; CROIZIER e cols, 1985), sendo que em alguns desses casos, ocorre a aquisição de DNA das células do hospedeiro sob a forma de transposon do tipo "copia-like" (BURAND & SUMMERS, 1982; MILLER & MILLER, 1982; FRASER e cols, 1983; 1985; McINTOSH & IGNOFFO, 1986; CARSTENS, 1987; BEAMES & SUMMERS,

1988).

A despeito desses resultados positivos no processo de passagem seriada de VPN *in vivo*, essas seleções frequentemente produzem isolados com aumento de virulência para o hospedeiro alternativo e com redução da virulência para o hospedeiro original. RIBEIRO (1985), no entanto, constatou que o isolado F₁₀ do VPNAg, passado durante 10 gerações em *D. saccharalis*, manteve a mesma virulência para seu hospedeiro original, *A. gemmatalis*. Esse vírus passou a ser um patógeno eficiente para as 2 espécies de pragas de famílias diferentes ou um bioinseticida bivalente.

Por outro lado, durante o processo de passagens seriadas de VPN em insetos alternativos, podem ocorrer modificações na forma do cristal desses vírus como constatado por alguns autores (AIZAWA, 1961; CUNNINGHAM, 1970; HUNTER e cols, 1973; WATANABE e cols, 1975; RODRIGUES, 1989). Esses autores notaram que a mudança na forma do cristal não parecia estar relacionado com a variação na virulência destes vírus. De acordo com RODRIGUES (1989), as formas cúbicas dos cristais virais que surgiram durante as passagens seriadas do VPNAc em *D. saccharalis* devem ser causadas provavelmente por mutações no gene da poliedrina, à semelhança do encontrado por CARSTENS e colaboradores (1986). Estes autores comprovaram que a aparência cúbica de um mutante de VPNAc era devida a uma mutação puntual que causou a substituição de prolina por leucina no aminoácido 58 da poliedrina. Esta única mutação foi a responsável pela aparência cúbica do vírus e pela mobilidade alterada do polipeptídeo em gel de SDS e poliacrilamida

Além da alteração que pode ocorrer na forma do cristal do VPV submetidos a passagens seriadas em hospedeiros alternativos, alguns autores constataram mudanças no tamanho do poliedro (TOMPKINS e cols, 1981; RODRIGUES, 1989). Nesses trabalhos, o aumento no tamanho dos cristais virais foi acompanhado por um aumento no número de virions e nucleocapsídeos, o que explicaria em parte, o aumento de virulência do VPVAc obtido por aqueles autores para os hospedeiros alternativos.

Ainda em relação às eventuais modificações que possam ocorrer durante o processo de passagens seriadas de VPV em hospedeiro alternativo, RODRIGUES (1989) observou uma redução progressiva da quantidade dos cristais virais por larva do VPVAc em *D. saccharalis*. Esta autora sugeriu que provavelmente ocorreu a produção de mutantes morfológicos que não produzem corpo de inclusão. Segundo WOODS (1980), quando as proteínas do envelope viral estão alteradas ou ausentes não há formação de poliedros. Análises em microscopia eletrônica revelaram que vírus submetidos a muitas passagens seriadas exibiam defeitos nos processos de aquisição do envelope viral e no corpo de inclusão (MILLER, 1986).

De modo geral, as modificações que possam ocorrer na virulência de um vírus para um hospedeiro alternativo, devem estar relacionadas com as proteínas do envelope viral, pois estas são importantes na especificidade do vírus, já que interagem com a membrana da célula intestinal do inseto para dar início ao processo de

infecção (MAZZONE, 1985).

No que se refere à poliedrina, como é uma proteína específica do vírus e portanto um produto gênico estável, não se modifica mesmo após contínuas passagens seriadas em um hospedeiro alternativo (MARUNIAK, 1986).

As alterações produzidas a nível de proteínas estruturais codificadas pelo vírus, explicariam parcialmente as mudanças na virulência de um determinado vírus para o hospedeiro alternativo (REINGANUM, 1984).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 INSETOS

As lagartas de *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae) foram obtidas a partir de populações de laboratório da Secção de Entomologia do IAA/FLANALSUCAR, Araras, São Paulo. Essa colaboração faz parte de um convênio entre esta Secção e o Laboratório de Virologia de Insetos do Departamento de Genética, Instituto de Biologia, UNICAMP. Os insetos utilizados foram mantidos em dieta artificial, segundo o método descrito por HENSLEY e HAMMOND (1968) e modificado posteriormente por DEGASPARI e cols (1981)

As lagartas de *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) foram gentilmente fornecidas pelo Dr. Antonio Batista Filho, pesquisador do Instituto Biológico, Campinas, São Paulo.

Nesse trabalho foram utilizadas lagartas do terceiro estágio larval, com aproximadamente onze dias de idade.

3.1.2 ISOLADOS

Os seguintes virus foram empregados neste estudo:

a) **Virus de Poliedrose Nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (VPNAgP)** do tipo (MEV) - coletado em Campinas, São Paulo, de lagartas infectadas de *A. gemmatalis* e replicado em insetos do laboratório (vide item anterior Insetos).

b) **Virus de Poliedrose Nuclear de *Anticarsia gemmatalis*** selecionado através de dez passagens seriadas em larvas de *D. saccharalis* (VPNAgF₁₀) a partir do isolado anterior (a).

c) **Virus de Poliedrose Nuclear de *Trichoplusia ni* (VPNTnP)** do tipo (MEV) - fornecido pelo Dr. Drion G. Boucias, do Departamento de Entomologia da Universidade da Flórida, Estados Unidos.

d) **Virus de Poliedrose Nuclear de *Trichoplusia ni***, selecionado através de onze passagens seriadas nas larvas de *D. saccharalis* (VPNTnF₁₁), a partir do isolado anterior (c).

e) **Virus de Granulose de *Diatraea saccharalis* (VGDs)**, coletado em lagartas de *D. saccharalis*, nos Estados Unidos, e replicado em lagartas do laboratório (vide item anterior Insetos).

Esses virus fazem parte da coleção de virus de insetos do Dr. Octavio Henrique de Oliveira Pavan, no Laboratório de Virologia de Insetos do Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, São Paulo.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 PROCEDIMENTO DE BIOENSAIO

Todos os testes de atividade viral, neste trabalho, foram realizados através de técnica de ensaio biológico ou bioensaio.

O método de bioensaio utilizado foi o descrito por PAVAN e cols (1981) com modificações. Lagartas foram colocadas individualmente em placas de acrílico contendo pequenos discos de dieta artificial (3,0 x 0,5 mm). Cada placa continha 24 cavidades, onde foi adicionado um disco de dieta por cavidade. Com um micro-aplicador semi-automático inoculou-se uma gota de 2,7 microlitros (ul) de uma dose conhecida de vírus, sobre cada disco de dieta artificial. As larvas foram expostas a esses discos de dieta contaminados que estavam no interior das placas. As placas foram colocadas em câmara úmida e mantidas em temperatura constante (28°C ± 1°C). Após 24 horas, as larvas que consumiram todo o disco de dieta foram transferidas para os tubos contendo dieta não contaminada (essa dieta é livre de formalina, devido sua atividade anti-viral). Esses tubos foram levados para uma câmara de temperatura constante (28°C ± 1°C).

A mortalidade foi verificada diariamente e a presença do vírus foi confirmada pela observação de amostras representativas de tecidos de larvas infectadas em microscópio de contraste de fase. As lagartas infectadas foram mantidas à - 20°C para posterior utilização dos vírus.

3.2.2 PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS CRISTAIS VIRAIS

O procedimento utilizado para purificação dos cristais de VPV e VG (esquema 1) é basicamente o mesmo descrito por PAVAN e colaboradores (1981) e PAVAN e colaboradores (1983).

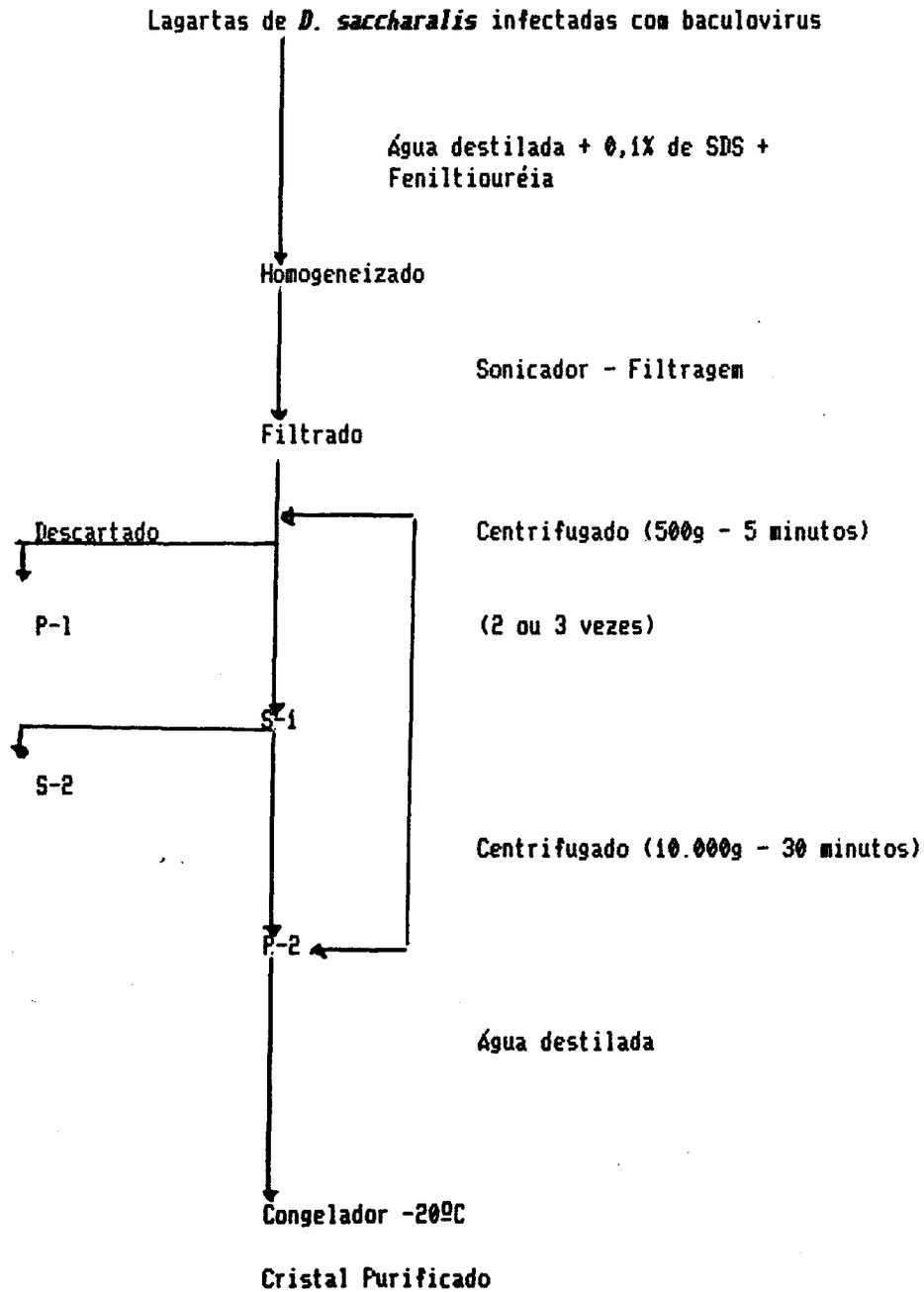
Lagartas infectadas foram maceradas num homogenizador, contendo água destilada (1 ml por lagarta), 0,1 % de SDS (Duodecil Sulfato de Sódio) e 1 g de PTC (Feniltiouréia). O homogeneizado foi filtrado duas vezes em quatro camadas de gaze. Para extração dos cristais virais, utilizou-se o processo de centrifugação diferencial que emprega ciclos alternados de baixa e alta velocidade, em centrífuga Beckman, Modelo J2-21, rotor JA-20. Usando o ciclo de baixa velocidade, o material filtrado foi centrifugado a 500g por 2 minutos. O precipitado (P_1) foi descartado e o sobrenadante (S_1) foi transferido para novo tubo e submetido a centrifugação em alta velocidade (10.000g) por 30 minutos. O precipitado (P_2) final foi ressuspenso em água destilada. Esse processo foi repetido por duas ou três vezes até a limpeza do material. A solução final foi mantida a -20°C para uso posterior.

Devido ao tamanho dos cristais, a quantificação dos poliedros e grânulos virais do material purificado pode ser feita usando o hematímetro de Neubauer, em microscópio de contraste de

fase .

Após o processo de quantificação foram ajustadas as concentrações para 2,7 microlitros (μ l).

ESQUEMA 1. Processo de Purificação de Virus de Poliedrose Nuclear (VPN) e Virus de Granulose (VG) a partir de lagartas infectadas de *D. saccharalis*



3.2.3 MORTALIDADE CORRIGIDA

Neste trabalho, os valores de mortalidade foram corrigidos empregando-se a fórmula de ABBOTT (1925), com modificações.

$$MC = \frac{\text{Número total de larvas mortas por virus}}{\text{Nº total de larvas} - \text{Nº larvas mortas por outras causas}} \times 100$$

3.2.4 DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL 50% (DL₅₀) E TEMPO LETAL 50% (TL₅₀).

A DL₅₀ é uma estimativa da dose capaz de matar 50% dos indivíduos que a recebem e é utilizada frequentemente na determinação da potencialidade de uma substância (TREVAN, 1927). Para o cálculo de DL₅₀ foi empregado o método Probit, de acordo com BLISS (1935a, b) e FINNEY (1947).

O TL₅₀ é uma estimativa do tempo para matar 50% da população sob o efeito de uma determinada dose.

Os valores de DL₅₀ e TL₅₀ foram determinados com auxílio de um micro-computador Tk-82 micro-digital (16k).

3.2.5 ESTABILIDADE TÉRMICA VIRAL

Os testes realizados visaram avaliar a estabilidade térmica do VPNAgP, VPNAgF₁₀, VPNTnP, VPNTnF₁₁ e VGDs para larvas de *D. saccharalis*.

Suspensões de vírus purificado, contendo 10^6 cristais/2,7ul, foram incubados em banho-maria à 100°C, 80°C, 70°C, 60°C, 50°C e 40°C por períodos que variaram de 5 a 7200 minutos.

Após a incubação, os vírus foram inoculados oralmente, através de bioensaios, em larvas do 3º estágio de *D. saccharalis*, e a mortalidade foi avaliada e comparada contra o vírus não incubado. Cada inseto recebeu uma dose de 10^6 cristais e para cada temperatura e tempo de incubação procurou-se analisar 50 insetos. Manteve-se sempre um grupo controle, onde suspensões virais não eram submetidos ao tratamento térmico.

Como parâmetro para medir a estabilidade térmica utilizou-se a redução na mortalidade larval e o aumento no tempo de mortalidade.

Através das equações de regressão de cada vírus, pode-se estimar a dose de poliedros ativos, a partir da redução da mortalidade larval em cada intervalo de tempo em uma dada temperatura.

Para avaliação da ocorrência de possíveis modificações na forma ou tamanho dos cristais virais, foram analisadas amostras representativas de tecidos de larvas infectadas, em microscópio de contraste de fase, nas várias temperaturas testadas.

3.2.6 EFEITOS DE TEMPERATURAS NO DESENVOLVIMENTO DA INFECÇÃO VIRAL

Analisou-se os efeitos de diferentes temperaturas no desenvolvimento da infecção em larvas de *D. saccharalis*, dos seguintes vírus: VPNAgP, VPNAgF₁₀, VPNTnP e VPNTnF₁₁.

Grupo de larvas do 3º estágio de *D. saccharalis* foram inoculadas por via oral, através de bioensaios, em uma dose conhecida de baculovirus (10^5 cristais/2,7ul) e mantidas em 10 temperaturas diferentes (17°C, 22°C, 24°C, 26°C, 28°C, 30°C, 32°C, 35°C, 37°C e 39°C), em câmaras climatizadas BOD, modelo 3476 da FANEM, com fotofase de 14 horas. Procurou-se analisar cerca de 50 insetos para cada experimento. Em cada temperatura testada, foi mantido um grupo controle de cerca de 20 larvas não contaminadas por vírus.

Em todos os experimentos, a mortalidade larval foi analisada diariamente, e amostras de tecido de larvas infectadas, foram examinadas utilizando o microscópio de contraste de fase.

Utilizaram-se os valores de TL₅₀ como parâmetro de avaliação de variações no tempo do desenvolvimento da infecção viral, em cada temperatura. Foram comparadas as mortalidades produzidas por esses vírus em cada temperatura testada. Também, foi determinada a produção de vírus por grama de larva morta.

3.2.7 EFEITOS DA INOCULAÇÃO DE VIRUS INATIVADO COMO INDUTOR DE MECANISMOS DE DEFESA EM LARVAS DE *D. saccharalis*.

Esses experimentos consistiram em utilizar 5 isolados diferentes de virus (VPNAgP, VPNAgF₁₀, VPNTnP, VPNTnF₁₁ e VGDs) inativados por tratamento térmico (100°C por 10 minutos) como antígenos dos mecanismos de defesa em larvas de *D. saccharalis*.

Foram inoculadas 3 doses para cada virus (10⁴ a 10⁷ cristais), dependendo da sua patogenicidade para *D. saccharalis*. Grupo de larvas de *D. saccharalis* foram previamente inoculadas oralmente com virus inativado e após 5 dias repetiu-se a inoculação com a mesma dose do virus ativo nestes insetos.

As lagartas de *D. saccharalis* foram inoculadas aos 11 e 16 dias de idade. Como controle inoculou-se um grupo de larvas aos 16 dias com virus ativo que haviam recebido apenas água destilada aos 11 dias. Outros três grupos controles receberam tratamento aos 11 dias de idade consistindo de virus ativo, inativo e ambos respectivamente.

Para avaliar a possível atividade antigênica, comparou-se o grupo "vacinado" ao grupo sem a inoculação aos 11 dias e as diferenças (significâncias) entre os valores de mortalidade foram verificadas através do teste T de Student.

3.2.8 PASSAGEM SERIADA DE DOIS ISOLADOS SELECIONADOS NUM HOSPEDEIRO ALTERNATIVO

A partir dos isolados selecionados, foram realizados dois grupos de experimentos de passagens seriadas, um com o VPNAgF₁₀ e o outro com o VPNTnF₁₁, em larvas de *D. saccharalis*.

Efetuarão-se dez passagens seriadas do VPNAg e nove passagens do VPNTn sobre o hospedeiro alternativo, *D. saccharalis*. Lagartas do 3^o estágio foram inoculadas com seis doses conhecidas (10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 cristais/larva) de cada um desses vírus, e, para cada dose foram inoculadas cerca de 100 larvas.

Em todos os experimentos manteve-se um grupo controle de 30 lagartas, tratadas somente com água destilada.

A partir dos dados de mortalidade, estimou-se os valores de DL₅₀ e TL₅₀ que foram parâmetros para verificar possíveis alterações na virulência de cada passagem seriada daqueles respectivos vírus.

3.2.9 ANÁLISE COMPARATIVA DAS PROTEÍNAS DOS ISOLADOS VPNA₉F₁₀ E VPNTnF₁₁ SELECIONADOS EM *D. saccharalis*.

3.2.9.1 PREPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS VIRAIS

Os vírus purificados através de centrifugação diferencial, foram resuspendidos em água destilada e precipitados por 3 ciclos de centrifugação a 10.000g por 30 minutos, visando a eliminação de possíveis contaminantes na superfície do poliedro.

O precipitado final é resuspendido em água destilada e sujeito ao processo de solubilização alcalina, descrito por McCARTHY e LIU (1976) com modificações.

Amostras de vírus a uma concentração de 10^7 cristais/2,7ul são submetidos a 100°C por 10 minutos para inativação da protease presente no cristal viral. Adiciona-se, a seguir, a estas amostras o mesmo volume de solução alcalina DAS (Na_2CO_3 0,5M + NaCl 0,17M + EDTA 0,01M - pH 10,9), e colocando-os em temperatura ambiente por 30 minutos. Estas amostras são então submetidas a centrifugação 20 segundos em micro-centrifuga (Micronal SPIN- I). O precipitado resultante é descartado e o sobrenadante é transferido para outros tubos que são centrifugados por 15 minutos. O sobrenadante é descartado e o precipitado final é resuspendido em tampão de amostra de eletroforese.

3.2.9.2 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS VIRAIS EM GEL DE POLIACRILAMIDA E SDS

As proteínas virais foram analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS), conforme o procedimento descrito por LAEMMLI (1970) com modificações.

As eletroforeses foram realizadas em aparato vertical, com a placa de gel medindo 16,5 x 14 x 15cm.

A composição das soluções estoques, composições dos tampões, das soluções corante e descorante e dos géis estão apresentados nos anexos 1 a 7.

As corridas eletroforéticas tiveram um tempo de duração de cerca de 4 horas, utilizando-se corrente elétrica de 20mA e 50 V até o limite do gel de empacotamento, e, 40mA e 120V até o final do gel de resolução ou de corrida.

Nas eletroforeses foram empregados géis simples e géis de gradiente (5 a 20%), que fornece melhor resolução. Após a corrida, o gel é retirado da placa e corado por um período de meia a uma hora em solução corante. Em seguida, é colocado na solução descorante, sendo esta solução trocada várias vezes até a obtenção de contraste desejável. Os géis após descoramento, foram guardados em uma solução de 2,5% de ácido acético.

Mediu-se as distâncias das bandas dos padrões e as distâncias das bandas das amostras corridas na eletroforese, após terem sido devidamente coradas. Determinou-se o Rf (mobilidade relativa) de cada proteína. Através dos valores de Rf, construiu-se uma curva padrão, a partir da qual se estimou os pesos moleculares das proteínas das amostras testadas.

4. RESULTADOS

4.1 ESTABILIDADE TÉRMICA VIRAL

Os testes realizados visaram avaliar a estabilidade térmica do VPNAgF, VPNAgF₁₀, VPNTnP, VPNTnF₁₁ e VGDs em larvas de *D. saccharalis*, e os resultados destes experimentos estão apresentados nas tabelas 1, 1A, 2, 2A, 3, 3A, 4, 4A, 5 e 5A respectivamente.

Analisando os resultados, constata-se que todos os 5 baculovirus testados foram completamente inativados à temperatura de 100°C em menos de cinco minutos.

Dos 5 virus estudados, apenas o VGDs e o VPNTnF₁₁ mantiveram sua infectividade para as larvas de *D. saccharalis* à 80°C por 5 minutos, sendo que aos 10 minutos todos foram totalmente inativados.

Verificou-se que os 5 baculovirus foram completamente inativados em menos de 30 minutos à temperaturas de 70°C, ao passo que a 60°C chegaram a resistir por 2 horas sem perder totalmente a infectividade.

Todos os 5 virus testados, foram capazes de resistir por até 1 dia (1440 minutos), sem perder totalmente sua infectividade em temperaturas de 50°C. Já, em temperaturas de 40°C, os baculovirus

analisados mantiveram a infectividade por até 5 dias (7200 minutos) de exposição.

Nota-se que os valores de TL₅₀ aumentaram com o aumento do tempo de incubação a uma determinada temperatura. No cálculo de TL₅₀ observou-se altos coeficientes de correlação, variando entre os valores de 0,88 a 0,99.

Nestes experimentos, verificou-se ainda que há uma relação linear entre o aumento de temperatura e a taxa de inativação viral. E, quanto maior foi o tempo de incubação em uma determinada temperatura maior foi a inativação dos 5 baculovirus testados.

Comparando-se os 5 isolados, pode-se constatar que o VPNAgP foi o mais estável, apresentando as menores taxas de inativação de seus poliedros

Diante dos resultados, constatou-se que os 5 baculovirus testados apresentaram semelhante estabilidade térmica.

TABELA 1 - Termoinativação do VPNAgP. Avaliado em larvas de *D. saccharalis*. Inoculação via oral com uma dose de 10^6 cristais/larva.

Temperaturas (°C)	Tempo de Incubação (Minutos)	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	r*	Poliedros Ativos (Estimativa da Dose Efetiva)	Taxa de Poliedros Inativados
100	0	50	44,0	--	--	$1,0 \times 10^6$	----
	5	50	0,0	--	--	----	----
	10	50	0,0	--	--	----	----
80	0	50	42,0	--	--	$1,0 \times 10^6$	----
	5	50	0,0	--	--	----	----
	10	50	0,0	--	--	----	----
70	0	50	44,0	--	--	$1,0 \times 10^6$	----
	5	50	14,0	--	--	$3,0 \times 10^4$	$3,3 \times 10^1$
	10	50	12,0	--	--	$2,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^1$
60	0	50	44,0	--	--	$1,0 \times 10^6$	----
	5	50	36,0	--	--	$2,8 \times 10^5$	$3,5 \times 10^0$
	10	50	34,0	--	--	$2,5 \times 10^5$	$4,4 \times 10^0$
	15	50	32,0	--	--	$2,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^0$
	20	50	30,0	--	--	$1,8 \times 10^5$	$5,5 \times 10^0$
	30	40	27,5	--	--	$1,2 \times 10^5$	$8,0 \times 10^0$
	40	40	17,5	--	--	$4,9 \times 10^4$	$2,0 \times 10^1$
	60	40	7,5	--	--	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2$

r* - Coeficiente de Correlação

Taxa de poliedros inativados = n° de poliedros inoculados/ n° de poliedros ativos x 100

TABELA 1A - Termoinativação do VPNAgP. Avaliado em larvas de *D. saccharalis*. Inoculação via oral com uma dose de 10^6 cristais/larva.

Temperaturas (°C)	Tempo de Incubação (Minutos)	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	r*	Poliedros Ativos (Estimativa da Dose Efetiva)	Taxa de Poliedros Inativados
50	0	50	43,3	--	--	$1,0 \times 10^6$	----
	5	50	38,0	--	--	$3,2 \times 10^5$	$3,1 \times 10^0$
	10	50	36,0	--	--	$2,8 \times 10^5$	$3,5 \times 10^0$
	15	50	34,0	--	--	$2,5 \times 10^5$	$4,0 \times 10^0$
	20	50	32,0	--	--	$2,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^0$
	30	50	30,0	--	--	$1,8 \times 10^5$	$5,5 \times 10^0$
	40	50	28,0	--	--	$1,3 \times 10^5$	$7,6 \times 10^0$
	60	50	18,0	--	--	$5,1 \times 10^4$	$1,9 \times 10^1$
	120	50	14,0	--	--	$3,2 \times 10^4$	$3,1 \times 10^1$
	300	50	8,0	--	--	$1,2 \times 10^4$	$8,3 \times 10^1$
1440	50	2,0	--	--	$4,2 \times 10^3$	$2,3 \times 10^2$	
40	0	50	52,0	15,0	0,98	$1,0 \times 10^6$	----
	5	50	50,0	17,9	0,97	$8,0 \times 10^5$	$1,2 \times 10^0$
	10	50	48,0	--	--	$7,8 \times 10^5$	$1,3 \times 10^0$
	15	50	44,0	--	--	$5,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^0$
	20	50	42,0	--	--	$4,0 \times 10^5$	$2,5 \times 10^0$
	30	50	38,0	--	--	$3,2 \times 10^5$	$3,1 \times 10^0$
	40	50	34,0	--	--	$2,5 \times 10^5$	$4,0 \times 10^0$
	60	50	30,0	--	--	$1,8 \times 10^5$	$5,5 \times 10^0$
	120	50	26,0	--	--	$1,2 \times 10^5$	$8,3 \times 10^0$
	300	50	16,0	--	--	$4,0 \times 10^4$	$2,5 \times 10^2$
1440	50	10,0	--	--	$1,7 \times 10^4$	$5,8 \times 10^2$	
7200	50	4,0	--	--	$2,0 \times 10^3$	$5,0 \times 10^3$	

r* - Coeficiente de Correlação

Taxa de Poliedros Inativados = n° de poliedros inoculados / n° de poliedros ativos $\times 100$

TABELA 2 - Termoinativação do VPNAgF₁₀. Avaliado em larvas de *D. saccharalis*. Inoculação via oral com uma dose de 10⁶ cristais/larva.

Temperaturas (°C)	Tempo de Incubação (Minutos)	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	r*	Poliedros Ativos (Estimativa da Dose Efetiva)	Taxa de Poliedros Inativados
100	0	40	97,5	11,1	0,96	1,0 x 10 ⁶	----
	5	50	0,0	--	--	----	----
	10	40	0,0	--	--	----	----
80	0	50	96,0	14,4	0,95	1,0 x 10 ⁶	----
	5	50	0,0	--	--	----	----
	10	50	0,0	--	--	----	----
70	0	60	96,7	13,7	0,88	1,0 x 10 ⁶	----
	5	50	12,0	--	--	8,0 x 10 ¹	1,2 x 10 ⁵
	10	50	8,0	--	--	5,0 x 10 ¹	2,0 x 10 ⁵
	15	50	4,0	--	--	1,3 x 10 ¹	7,6 x 10 ⁵
	20	60	0,0	--	--	----	----
60	0	50	100,0	13,3	0,97	1,0 x 10 ⁶	----
	5	50	72,0	21,0	0,99	8,0 x 10 ⁴	1,2 x 10 ¹
	10	60	66,7	28,0	0,98	4,7 x 10 ⁴	2,1 x 10 ¹
	15	50	48,0	--	--	5,0 x 10 ³	2,0 x 10 ²
	20	40	42,5	--	--	3,0 x 10 ³	3,3 x 10 ²
	30	40	17,5	--	--	1,9 x 10 ²	5,2 x 10 ³
	40	40	8,0	--	--	5,0 x 10 ¹	2,0 x 10 ⁴

r* - Coeficiente de Correlação

Taxa de poliedros inativados = n^o de poliedros inoculados/ n^o de poliedros ativos x 100

TABELA 2A. Terminativação do VPNAgF₁₀. Avaliado em larvas de *D. saccharalis*. Inoculação via oral com uma dose de 10⁶ cristais/ larva.

Temperaturas (°C)	Tempo de Incubação (Minutos)	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	r*	Poliedros Ativos (Estimativa da Dose Efetiva)	Taxa de Poliedros Inativados
50	0	50	100,0	16,5	0,93	1,0 x 10 ⁶	----
	5	50	86,0	21,7	0,97	6,8 x 10 ⁵	1,0 x 10 ⁰
	10	50	80,0	23,6	0,98	2,5 x 10 ⁵	4,0 x 10 ⁰
	15	50	76,0	25,7	0,92	1,2 x 10 ⁵	8,3 x 10 ⁰
	20	50	72,0	28,0	0,93	8,0 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁰
	30	50	62,0	28,5	0,99	2,5 x 10 ⁴	4,0 x 10 ¹
	40	50	58,0	28,0	0,94	1,6 x 10 ⁴	6,2 x 10 ¹
	60	50	50,0	28,7	0,97	6,7 x 10 ³	1,5 x 10 ²
	120	50	44,0	--	--	3,5 x 10 ³	2,8 x 10 ²
	300	50	32,0	--	--	1,0 x 10 ³	1,0 x 10 ³
1440	50	2,0	--	--	1,1 x 10 ¹	9,0 x 10 ⁴	
40	0	50	98,0	16,4	0,99	1,0 x 10 ⁶	----
	5	50	94,0	18,6	0,99	9,8 x 10 ⁵	1,0 x 10 ⁰
	10	50	92,0	20,9	0,98	9,4 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁰
	15	50	84,0	22,3	0,98	4,5 x 10 ⁵	2,2 x 10 ⁰
	20	50	76,0	22,7	0,98	1,2 x 10 ⁵	8,3 x 10 ⁰
	30	50	74,0	22,7	0,98	1,0 x 10 ⁵	1,0 x 10 ¹
	40	50	72,0	23,5	0,99	8,0 x 10 ⁴	1,2 x 10 ¹
	60	50	66,0	23,6	0,91	4,0 x 10 ⁴	2,5 x 10 ¹
	120	50	56,0	27,7	0,97	1,2 x 10 ⁴	8,3 x 10 ¹
	1440	50	30,0	--	--	9,8 x 10 ²	1,1 x 10 ³
7200	50	21,2	--	--	3,0 x 10 ²	3,3 x 10 ³	

r* - Coeficiente de Correlação

Taxa de Poliedros Inativados = n^o de poliedros inoculados/ n^o de poliedros ativos x 100

TABELA 3. Terminativação do VPNTnF. Avaliado em larvas de *D. saccharalis*. Inoculação via oral com uma dose de 10^6 cristais/larva.

Temperaturas (°C)	Tempo de Incubação (Minutos)	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	r*	Poliedros Ativos (Estimativa da Dose Efetiva)	Taxa de Poliedros Inativados
100	0	50	80,0	14,2	0,89	$1,0 \times 10^6$	----
	5	50	0,0	--	--	----	----
	10	50	0,0	--	--	----	----
80	0	34	82,4	14,3	0,93	$1,0 \times 10^6$	----
	5	50	0,0	--	--	----	----
	10	33	0,0	--	--	----	----
70	0	50	78,0	12,8	0,93	$1,0 \times 10^6$	----
	5	50	26,0	--	--	$1,7 \times 10^4$	$5,8 \times 10^1$
	10	43	9,3	--	--	$2,9 \times 10^3$	$3,4 \times 10^2$
	15	42	0,0	--	--	----	----
	20	50	0,0	--	--	----	----
60	0	50	82,0	12,2	0,97	$1,0 \times 10^6$	----
	5	50	58,0	13,7	0,99	$1,8 \times 10^5$	$5,5 \times 10^0$
	10	50	54,0	16,1	0,99	$1,5 \times 10^5$	$6,6 \times 10^0$
	15	50	48,0	--	--	$9,0 \times 10^4$	$1,1 \times 10^1$
	20	40	35,0	--	--	$3,5 \times 10^4$	$2,8 \times 10^1$
	30	40	25,0	--	--	$1,5 \times 10^4$	$6,6 \times 10^1$
	40	40	10,0	--	--	$3,0 \times 10^3$	$3,3 \times 10^2$

r* - Coeficiente de Correlação

Taxa de Poliedros Inativados = n° de poliedros inoculados / n° de poliedros ativos x 100

TABELA 3A. Terminativação do VPNTnP. Avaliado em larvas de *D. saccharalis*. Inoculação via oral com uma dose de 10^6 cristais / larva.

Temperaturas (°C)	Tempo de Incubação (Minutos)	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	r*	Poliedros Ativos (Estimativa da Dose Efetiva)	Taxa de Poliedros Inativados
50	0	50	78,0	10,7	0,94	$1,0 \times 10^6$	---
	5	50	62,0	11,1	0,95	$2,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^0$
	10	50	60,0	11,7	0,94	$2,1 \times 10^5$	$4,7 \times 10^0$
	15	50	54,0	13,5	0,98	$1,4 \times 10^5$	$7,1 \times 10^0$
	20	50	48,0	--	--	$9,0 \times 10^4$	$1,1 \times 10^1$
	30	50	46,0	--	--	$8,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^1$
	40	50	40,0	--	--	$5,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^1$
	60	50	34,0	--	--	$3,2 \times 10^4$	$3,1 \times 10^1$
	120	50	24,0	--	--	$1,4 \times 10^4$	$7,1 \times 10^1$
	300	50	12,0	--	--	$4,0 \times 10^3$	$2,5 \times 10^2$
1440	50	2,0	--	--	$3,5 \times 10^2$	$2,8 \times 10^3$	
40	0	51	84,3	12,2	0,98	$1,0 \times 10^6$	---
	5	51	80,4	14,4	0,95	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^0$
	10	51	78,4	14,6	0,97	$9,6 \times 10^5$	$1,1 \times 10^0$
	15	51	62,7	15,5	0,95	$2,5 \times 10^5$	$4,0 \times 10^0$
	20	51	58,8	15,6	0,92	$1,8 \times 10^5$	$5,5 \times 10^0$
	30	51	54,9	16,6	0,95	$1,5 \times 10^5$	$6,6 \times 10^0$
	40	51	51,0	18,9	0,89	$1,1 \times 10^5$	$9,1 \times 10^0$
	60	51	45,1	--	--	$7,0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^1$
	120	51	37,2	--	--	$4,0 \times 10^4$	$2,5 \times 10^1$
	300	51	29,4	--	--	$2,4 \times 10^4$	$4,1 \times 10^1$
1440	51	19,6	--	--	$9,7 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	
7200	51	7,8	--	--	$1,8 \times 10^3$	$5,5 \times 10^2$	

r* - Coeficiente de Correlação

Taxa de Poliedros Inativados = n^0 de poliedros inoculados / n^0 de poliedros ativos x 100

TABELA 4. Termoinativação do VPNTnF₁₁. Avaliado em larvas de *D. saccharalis*. Inoculação via oral com uma dose de 10⁶ cristais/larva.

Temperaturas (°C)	Tempo de Incubação (Minutos)	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	r*	Poliedros Ativos (Estimativa da Dose Efetiva)	Taxa de Poliedros Inativados
100	0	40	95,0	12,6	0,96	1,0 x 10 ⁶	----
	5	40	0,0	--	--	----	----
	10	40	0,0	--	--	----	----
80	0	60	100,0	14,3	0,91	1,0 x 10 ⁶	----
	5	60	5,0	--	--	----	----
	10	60	0,0	--	--	----	----
70	0	50	96,0	12,8	0,99	1,0 x 10 ⁶	----
	5	50	4,0	--	--	----	----
	10	55	3,6	--	--	----	----
	15	55	0,0	--	--	----	----
	20	60	0,0	--	--	----	----
60	0	50	98,0	13,5	0,97	1,0 x 10 ⁶	----
	5	50	76,0	15,8	0,98	2,5 x 10 ⁴	4,0 x 10 ²
	10	50	66,0	20,2	0,97	7,0 x 10 ²	1,4 x 10 ³
	15	50	54,0	24,8	0,98	5,5 x 10 ²	1,8 x 10 ³
	20	50	52,0	26,5	0,92	1,5 x 10 ²	6,6 x 10 ³
	30	50	46,0	--	--	5,0 x 10 ¹	2,0 x 10 ⁴
	40	50	44,0	--	--	4,0 x 10 ¹	2,5 x 10 ⁴
	60	50	30,0	--	--	1,0 x 10 ¹	1,0 x 10 ⁵
	120	50	16,0	--	--	2,0 x 10 ⁰	5,0 x 10 ⁵

* r - Coeficiente de Correlação

Taxa de poliedros Inativados = n^o de poliedros inoculados/ n^o de poliedros ativos x 100

TABELA 4A. Termoinativação do VPNTnF₁₁. Avaliado em larvas de *D. saccharalis*. Inoculação via oral com uma dose de 10⁶ cristais / larva.

Temperaturas (°C)	Tempo de Incubação (Minutos)	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	r*	Poliedros Ativos (Estimativa da Dose Efetiva)	Taxa de Poliedros Inativados
50	0	50	100,0	13,1	0,98	1,0 x 10 ⁶	----
	5	50	94,0	16,9	0,97	9,0 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁰
	10	50	90,0	17,8	0,96	3,0 x 10 ⁵	3,3 x 10 ⁰
	15	50	86,0	17,9	0,96	1,3 x 10 ⁵	7,6 x 10 ⁰
	20	50	72,0	18,2	0,96	1,5 x 10 ⁴	6,6 x 10 ¹
	30	50	66,0	18,6	0,96	7,0 x 10 ²	1,4 x 10 ³
	40	50	60,0	21,7	0,95	4,0 x 10 ²	2,5 x 10 ³
	60	50	54,0	25,8	0,97	1,7 x 10 ²	5,8 x 10 ³
	120	50	46,0	--	--	5,0 x 10 ¹	2,0 x 10 ⁵
	300	50	40,0	--	--	3,0 x 10 ¹	3,3 x 10 ⁵
1440	50	50	4,0	--	--	1,0 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁶
40	0	50	94,0	13,8	0,97	1,0 x 10 ⁶	----
	5	50	92,0	15,7	0,96	4,5 x 10 ⁵	2,2 x 10 ⁰
	10	50	90,0	16,1	0,93	3,0 x 10 ⁵	3,3 x 10 ⁰
	15	50	88,0	16,3	0,93	2,0 x 10 ⁵	5,0 x 10 ⁰
	20	50	86,0	17,9	0,97	1,3 x 10 ⁵	7,6 x 10 ⁰
	30	50	84,0	18,8	0,99	9,0 x 10 ⁴	1,1 x 10 ¹
	40	50	76,0	21,7	0,95	2,5 x 10 ⁴	4,0 x 10 ¹
	60	50	74,0	22,7	0,95	2,0 x 10 ⁴	5,0 x 10 ¹
	120	50	70,0	23,5	0,98	1,0 x 10 ⁴	1,0 x 10 ²
	300	50	60,0	27,5	0,98	4,0 x 10 ²	2,5 x 10 ³
1440	50	50	42,0	--	--	4,1 x 10 ¹	2,4 x 10 ⁴
7200	50	50	32,0	--	--	1,8 x 10 ¹	5,5 x 10 ⁴

*r - Coeficiente de Correlação

Taxa de Poliedros Inativados = n^o de poliedros inoculados / n^o de poliedros ativos x 100.

TABELA 5. Terminativação do VGDs. Avaliado em larvas de *D. saccharalis*. Inoculação via oral com uma dose de 10^6 cristais/larva.

Temperaturas (°C)	Tempo de Incubação (Minutos)	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	r*	Poliedros Ativos (Estimativa da Dose Efetiva)	Taxa de Poliedros Inativados
100	0	50	98,0	12,4	0,95	$1,0 \times 10^6$	----
	5	50	0,0	--	--	----	----
	10	50	0,0	--	--	----	----
80	0	50	96,0	12,8	0,97	$1,0 \times 10^6$	----
	5	50	6,0	--	--	$5,0 \times 10^0$	$2,0 \times 10^5$
	10	50	0,0	--	--	----	----
70	0	50	96,0	12,6	0,96	$1,0 \times 10^6$	----
	5	50	22,0	--	--	$8,0 \times 10^3$	$1,2 \times 10^2$
	10	50	16,0	--	--	$2,0 \times 10^3$	$5,0 \times 10^2$
	15	50	10,0	--	--	$8,4 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3$
	20	50	4,0	--	--	$4,0 \times 10^0$	$2,5 \times 10^5$
	30	50	0,0	--	--	----	----
60	0	50	98,0	14,3	0,98	$1,0 \times 10^6$	----
	5	50	80,0	21,2	0,98	$9,0 \times 10^4$	$1,1 \times 10^1$
	10	50	74,0	25,7	0,96	$6,0 \times 10^4$	$1,6 \times 10^1$
	15	50	68,0	27,3	0,97	$3,3 \times 10^4$	$3,0 \times 10^1$
	20	50	50,0	27,9	0,97	$4,2 \times 10^3$	$2,3 \times 10^2$
	30	60	43,3	--	--	$3,0 \times 10^3$	$3,3 \times 10^2$
	40	50	38,0	--	--	$2,4 \times 10^3$	$4,3 \times 10^2$
	60	60	33,3	--	--	$9,6 \times 10^2$	$1,1 \times 10^3$
120	50	22,0	--	--	$8,0 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3$	

r* - Coeficiente de Correlação

Taxa de Poliedros Inativados = n° de poliedros inoculados / n° de poliedros ativos x 100

TABELA 5A. Terminativação do VGDs. Avaliado em larvas de *D. saccharalis*. Inoculação via oral com uma dose de 10^6 cristais/larva.

Temperaturas (°C)	Tempo de Incubação (Minutos)	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	r*	Poliedros Ativos (Estimativa da Dose Efetiva)	Taxa de Poliedros Inativados
50	0	50	96,0	15,2	0,98	$1,0 \times 10^6$	----
	5	50	94,0	19,3	0,99	$7,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^0$
	10	50	92,0	19,5	0,98	$5,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^0$
	15	50	86,0	20,1	0,98	$2,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^0$
	20	50	82,0	21,8	0,98	$8,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^1$
	30	50	74,0	24,1	0,98	$5,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^1$
	40	50	68,0	24,7	0,98	$3,0 \times 10^4$	$3,3 \times 10^1$
	60	44	63,6	27,2	0,97	$1,8 \times 10^4$	$5,5 \times 10^1$
	120	50	50,0	28,5	0,93	$4,2 \times 10^3$	$2,4 \times 10^2$
	300	50	40,0	--	--	$2,5 \times 10^3$	$4,0 \times 10^2$
1440	50	20,0	--	--	$4,2 \times 10^2$	$2,4 \times 10^3$	
40	0	50	96,0	14,3	0,96	$1,0 \times 10^6$	----
	5	50	94,0	16,4	0,93	$7,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^0$
	10	50	94,0	16,8	0,98	$7,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^0$
	15	50	88,0	18,1	0,96	$3,5 \times 10^5$	$2,8 \times 10^0$
	20	50	86,0	18,3	0,95	$2,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^0$
	30	50	84,0	18,7	0,98	$1,6 \times 10^5$	$6,2 \times 10^0$
	40	50	74,0	18,9	0,97	$5,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^1$
	60	50	70,0	19,6	0,98	$4,0 \times 10^4$	$2,5 \times 10^1$
	120	50	62,0	20,2	0,97	$1,6 \times 10^4$	$6,2 \times 10^1$
	300	50	54,0	20,3	0,94	$8,0 \times 10^3$	$1,2 \times 10^2$
1440	50	38,0	--	--	$2,3 \times 10^3$	$4,3 \times 10^2$	
7200	50	22,0	--	--	$8,0 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3$	

r* - Coeficiente de Correlação

Taxa de Poliedros Inativados = nº de poliedros inoculados / nº de poliedros ativos x 100

4.2 EFEITOS DE DIFERENTES TEMPERATURAS NO DESENVOLVIMENTO DA INFECCÃO VIRAL

Os resultados dos experimentos com diferentes temperaturas no desenvolvimento da infecção dos vírus: VPNAgP, VPNAgF₁₀, VPNTnP e VPNTnF₁₁ estão respectivamente nas tabelas 6, 7, 8 e 9.

Verificou-se que os baculovirus se desenvolveram normalmente na faixa de 17°C a 39°C, não exibindo quaisquer alterações morfológicas nos poliedros ou cristais virais, assim como todas as larvas mortas analisadas demonstraram os sintomas típicos da infecção por Virus de Poliedrose Nuclear.

As larvas controle (grupo de larvas que não foram inoculadas com vírus) nas temperaturas 39°C, 37°C e 35°C, mostraram uma mortalidade larval de 100%, 80% e 5% respectivamente para os 4 experimentos. Nas demais temperaturas, no entanto, não ocorreu mortalidade no grupo controle, que passaram à fase de pupa e emergiram como adultos normais. O exame de amostras de tecidos dessas larvas, mostraram sempre a ausência de vírus.

Pode-se observar nestes experimentos, que os valores de TL₅₀ foram diminuindo à proporção que a temperatura era aumentada. Por exemplo, no caso do VPNTnF₁₁, a 17°C o valor de TL₅₀ é de 46,3 dias enquanto que a 39°C é de apenas 6,6 dias.

De modo geral, constatou-se que as porcentagens de mortalidade larvais foram crescentes à medida que a temperatura era aumentada. Os 4 experimentos demonstraram que a 17°C foi onde ocorreu a menor porcentagem de mortalidade larval. O VPNAgP, à 17°C ocasionou uma mortalidade larval de apenas 7,5%, aumentando gradativamente até atingir 100% à temperatura de 37°C. O VPNTnP produziu uma mortalidade larval de 35% a 17°C, e como o VPNAgP, aumentou gradativamente até alcançar 100% a 37°C. Já, os isolados selecionados, VPNAgF₁₀ e VPNTnF₁₁, a 17°C, causaram respectivamente uma mortalidade larval de 47,5% e 75% e, em contraste com os isolados não-selecionados já atingiram 100% de mortalidade larval à 28°C.

Para os 4 baculovirus testados, à temperatura de 39°C, foi onde ocorreu a menor produção viral (produção de vírus por grama de larva morta), não obstante em todos os experimentos verificarmos que nesta temperatura houve 100% de mortalidade larval. Desse modo, nota-se que nem sempre uma maior mortalidade larval indica uma maior produção viral.

Pode-se observar, que para os 4 vírus analisados, a temperatura ótima foi de 28°C, onde ocorreu a maior produção viral. Verificou-se que a medida que se afastou desta temperatura, menor foi essa produção. Os vírus: VPNAgP, VPNAgF₁₀, VPNTnP e VPNTnF₁₁, quando mantidos no intervalo de temperatura de 28°C a 26°C, ou seja a variação de apenas 2°C abaixo da temperatura ótima, mostraram uma redução na produção viral de 1,07, 4,56, 1,21 e 3,83 vezes respectivamente. Já o intervalo de temperatura de 30°C a 28°C, isto é,

a alteração de 20°C acima da temperatura ótima, o VPNAgF, VPNAgF₁₀, VPNTnF e VPNTnF₁₁ exibiram uma redução na produção viral de respectivamente 4,61, 2,79, 1,39 e 1,92 vezes.

No intervalo de temperatura entre 17°C a 28°C, notou-se em todos os experimentos um aumento substancial na produção viral. Destarte, o VPNAgF ter apresentado neste intervalo de temperatura um aumento na produção viral de 31,1 vezes, o aumento exibido pelo isolado selecionado VPNAgF₁₀ foi de 323,8 vezes. O VPNTnF mostrou um aumento na produção viral de 13,8 vezes e o do isolado VPNTnF₁₁ foi de 44 vezes. Esses dados indicaram que os isolados selecionados em comparação com os isolados originais, exibiram um maior aumento do que estes últimos na produção viral, neste intervalo de temperatura.

Já no intervalo entre 28°C e 39°C, verificou-se com o aumento da temperatura uma redução significativa na produção viral. Neste intervalo de temperatura, o VPNAgF apresentou uma redução de 1445 vezes na produção viral, ao passo que o isolado selecionado VPNAgF₁₀ mostrou uma redução de 1783,8 vezes. Já o VPNTnF exibiu uma redução na produção viral de 405,8 vezes enquanto que a redução demonstrada pelo VPNTnF₁₁ foi de 3632,6 vezes. Desse modo, verifica-se que neste intervalo de temperatura, os isolados selecionados apresentaram uma maior redução na produção viral do que os isolados originais.

Por outro lado, a eficiência de produção viral que é uma estimativa do número de poliedros produzidos por grama de larva inoculada, multiplicado pelo número de larvas mortas, foi o outro

parâmetro utilizado para avaliar os efeitos de temperatura no desenvolvimento da infecção viral.

Para os 4 virus testados, a temperatura de 39°C foi onde se deu a menor eficiência de produção viral.

Nestes experimentos, constatou-se que no intervalo de temperatura entre 17°C e 28°C, o VPNAgP apresentou um aumento na eficiência de produção viral de 114,4 vezes ao passo que o isolado selecionado VPNAgF₁₀ teve um aumento de 670 vezes. Neste mesmo intervalo de temperatura, observou-se que o aumento na eficiência de produção viral do VPNTnP foi de 24,5 vezes enquanto o isolado selecionado VPNTnF₁₁ mostrou um aumento de 3632,6 vezes.

No intervalo de 11°C, entre as temperaturas de 28°C a 39°C, notou-se que o VPNAgP teve uma redução na eficiência de produção viral de 397,2 vezes e o isolado selecionado VPNAgF₁₀ foi de 1744,8 vezes. O VPNTnP teve uma redução na eficiência de produção viral de 252,9 vezes ao passo que o isolado selecionado VPNTnF₁₁ exibiu uma redução de 3632,6 vezes.

Os dados demonstraram ainda que a alteração de apenas 2°C, pode significar um aumento ou diminuição substancial tanto na produção como na eficiência de produção viral. Por exemplo, o VPNTnF₁₁ apresentou uma redução significativa de 125 vezes tanto na produção como na eficiência de produção viral no intervalo entre as temperaturas de 35°C a 37°C.

TABELA 6 - Efeito de Temperatura no desenvolvimento da infecção viral do VPNAgP, em larvas de *D. saccharalis*. Dose: 10^5 cristais / larva.

Temperaturas (°C)	Número de Indivíduos Analisados	Larvas mortas com infecção Viral		TL ₅₀ (Dias)	r*	Produção de vírus por grama de larvas mortas (10 ⁶ poliedros)	Eficiência de Produção Viral (10 ⁶ poliedros)
		Nº	%				
17	40	3	7,5	----	----	51	4
22	40	5	12,5	----	----	141	18
24	40	4	10,0	----	----	238	24
26	40	5	12,5	----	----	1480	185
28	40	11	27,5	----	----	1590	437
30	40	20	50,0	13,1	0,89	345	172
32	40	20	50,0	12,6	0,94	256	128
35	40	28	70,0	12,1	0,98	49	34
37	40	40	100,0	10,3	0,97	24	24
39	40	40	100,0	9,8	0,96	1	1

r* - Coeficiente de Correlação

Eficiência de Produção Viral = produção de vírus por grama de larva morta x % larva mortas / 100

TABELA 7 - Efeito de Temperatura no desenvolvimento da infecção viral do VFNAgF₁₀, em larvas de *D. saccharalis*. Dose: 10⁵ cristais / larva.

Temperaturas (°C)	Número de Indivíduos Analisados	Larvas mortas com infecção Viral		TL ₅₀ (Dias)	r*	Produção de vírus por grama de larvas mortas (10 ⁶ poliedros)	Eficiência de Produção viral (10 ⁶ poliedros)
		Nº	%				
17	40	19	47,5	----	----	42	20
20	40	36	90,0	29,2	0,97	2670	2400
24	40	37	92,5	19,8	0,94	1770	1640
26	40	38	95,0	14,6	0,92	3000	2850
28	40	39	97,5	14,1	0,92	13700	13400
30	40	39	97,5	12,9	0,98	4910	4780
32	40	39	97,5	11,8	0,96	1500	1460
35	40	40	100,0	11,4	0,98	286	286
37	40	40	100,0	9,4	0,95	44	44
39	40	40	100,0	9,2	0,98	8	8

r* - Coeficiente de Correlação

Eficiência de Produção Viral = Produção de vírus por grama de larva morta x % larvas mortas / 100

TABELA 8 - Efeito de Temperatura no desenvolvimento da infecção viral do VPNTnP, em larvas de *D. saccharalis*. Dose: 10^5 cristais / larva.

Temperaturas (°C)	Número de Indivíduos Analisados	Larvas mortas com infecção Viral		TL ₅₀ (Dias)	r*	Produção de vírus por grama de larvas mortas (10 ⁶ poliedros)	Eficiência de Produção viral (10 ⁶ poliedros)
		Nº	%				
17	40	14	35,0	----	----	150	53
22	40	18	45,0	----	----	346	155
24	40	20	50,0	16,6	0,91	633	316
26	40	18	45,0	----	----	1710	769
28	40	25	62,5	13,9	0,99	2070	1290
30	40	26	65,0	13,5	0,99	1480	962
32	40	32	80,0	12,3	0,98	2090	167
35	40	38	95,0	11,4	0,99	178	169
37	40	40	100,0	10,7	0,95	9	9
39	40	40	100,0	9,1	0,87	2	2

r* - Coeficiente de Correlação

Eficiência de Produção Viral = Produção de vírus por grama de larva morta x % larvas mortas / 100

TABELA 9 - Efeito de Temperatura no desenvolvimento da infecção viral do VPNTnF₁₁, em larvas de *D. saccharalis*. Dose: 10⁵ cristais / larva.

Temperaturas (°C)	Número de Indivíduos Analisados	Larvas mortas com infecção		TL ₅₀ (Dias)	r*	Produção de vírus por grama de larvas mortas (10 ⁶ poliedros)	Eficiência de Produção Viral (10 ⁶ poliedros)
		Nº	%				
17	40	30	75,0	46,3	0,79	404	303
22	40	34	85,0	16,3	0,93	935	795
24	40	32	80,0	22,1	0,99	1260	1010
26	40	34	85,0	14,7	0,91	4650	3950
28	40	40	100,0	13,8	0,93	17800	17800
30	40	40	100,0	12,4	0,91	9270	9270
32	40	40	100,0	10,7	0,93	1750	1750
35	40	40	100,0	9,2	0,99	2650	2950
37	40	40	100,0	9,1	0,87	24	24
39	40	40	100,0	6,6	0,95	5	5

* - Coeficiente de Correlação

Eficiência de Produção Viral = Produção do vírus por gram de larva morta x % larvas mortas / 100

Os dados demonstraram ainda que a alteração de apenas 2°C, pode significar um aumento ou diminuição substancial tanto na produção como na eficiência de produção viral. Por exemplo, o VPNTnF₁₁ apresentou uma redução significativa de 125 vezes tanto na produção como na eficiência de produção viral no intervalo entre as temperaturas de 35°C a 37°C.

4.3 EFEITOS DA INOCULAÇÃO PRÉVIA DE VIRUS INATIVADOS COMO INDUTOR DE MECANISMOS DE DEFESA EM LARVAS DE *D. saccharalis*

Nesse estudos, através da inoculação prévia de um vírus inativado, procurou-se detectar a estimulação de mecanismos de defesa do inseto hospedeiro à posterior introdução do mesmo vírus ativo cinco dias mais tarde.

Foram utilizados os seguintes vírus neste trabalho: VPNAgP, VPNAg F₁₀, VPNTnP, VPNTn F₁₁ e VGDs. Os resultados destes experimentos estão apresentados nas tabelas 10, 11, 12, 13, 14 e 15.

Utilizou-se a comparação de mortalidade de lagartas com e sem inoculação prévia como parâmetros para avaliação do aparecimento de uma resposta ao estímulo tipo vacina.

Observou-se que nos 5 vírus testados, em todas as doses empregados, houve uma redução da mortalidade quando comparada com a mortalidade do grupo sem a inoculação prévia.

Os resultados indicam que a inoculação prévia de vírus inativado inibiu parcialmente o desenvolvimento da infecção do vírus inoculado cinco dias mais tarde.

Na tabela 15, através do teste T, verificou-se que a diferenças entre os valores de mortalidade, do grupo "vacinado" e do grupo sem inoculação aos 11 dias, foram significativos ao nível de 95%

de probabilidade ($\alpha = 0,05$) em todas as doses inoculadas dos 5 baculovirus testados.

TABELA 10 -Efeito da Inoculação prévia de VPNAgP inativado contra a multiplicação do segundo inóculo de VPNAgP ativo, em larvas do 3º estágio de *D. saccharalis*.

INÓCULOS		DOSES cristais / larvas					
1º	2º	10 ⁷ cristais/larva		10 ⁶ cristais/larva		10 ⁵ cristais/larva	
11 dias	16 dias	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (X)	Número de Indivíduos Inoculadas	Mortalidade Corrigida (X)	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (X)
VI	Agua Dest.	50	0,0	50	0,0	50	0,0
VA	Agua Dest.	40	90,0	50	60,0	50	45,0
VI + VA	Agua Dest.	50	89,0	50	58,0	50	40,0
Agua Dest.	VA	50	88,0	50	46,0	50	24,0
VI	VA	50	62,0	50	22,0	50	2,0

VI - Virus inativado (100°C - por 10 minutos)

VA - Virus ativo

TABELA 11 -Efeito da Inoculação prévia de VPNAgF₁₀ inativado contra a multiplicação do segundo inóculo de VPNAgF₁₀ ativo, em larvas de *D. saccharalis* do 3º estágio.

INÓCULOS		DOSES cristais / larvas					
1º	2º	10 ⁶ cristais/larva		10 ⁵ cristais/larva		10 ⁴ cristais/larva	
11 dias	16 dias	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (%)	Número de Indivíduos Inoculadas	Mortalidade Corrigida (%)	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (%)
VI	Agua Dest.	50	0,0	50	0,0	50	0,0
VA	Agua Dest.	40	100,0	40	87,0	20	55,0
VI + VA	Agua Dest.	50	100,0	50	86,0	50	54,0
Agua Dest.	VA	50	56,0	50	48,0	50	34,0
VI	VA	50	32,0	50	26,0	50	8,0

VI - Virus inativado (100°C - por 10 minutos)

VA - Virus ativo

TABELA 12 -Efeito da Inoculação prévia de VPNTnP inativado contra a multiplicação do segundo inóculo de VPNTnP ativo, em larvas do 3º estágio de *D. saccharalis*

INÓCULOS		DOSES cristais / larvas					
1º	2º	10 ⁷ cristais/larva		10 ⁶ cristais/larva		10 ⁵ cristais/larva	
11 dias	16 dias	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (%)	Número de Indivíduos Inoculadas	Mortalidade Corrigida (%)	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (%)
VI	Agua Dest.	50	0,0	50	0,0	50	0,0
VA	Agua Dest.	40	97,5	40	85,0	40	42,5
VI + VA	Agua Dest.	50	96,0	50	82,0	50	44,0
Agua Dest.	VA	50	46,0	50	34,0	50	26,0
VI	VA	50	20,0	50	16,0	50	6,0

VI - Virus inativado (100°C - por 10 minutos)

VA - Virus ativo

TABELA 13 -Efeito da Inoculação prévia de VPNTnF11 inativado contra a multiplicação do segundo inóculo de VPNTnF11 ativo, em larvas do 3º estágio de *D. saccharalis*

INÓCULOS		DOSES cristais / larvas					
1º	2º	10 ⁷ cristais/larva		10 ⁶ cristais/larva		10 ⁵ cristais/larva	
11 dias	16 dias	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (%)	Número de Indivíduos Inoculadas	Mortalidade Corrigida (%)	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (%)
VI	Agua Dest.	50	0,0	50	0,0	50	0,0
VA	Agua Dest.	40	100,0	40	97,5	40	90,0
VI + VA	Agua Dest.	50	100,0	50	98,0	50	92,0
Agua Dest.	VA	50	52,0	50	40,0	50	34,0
VI	VA	50	22,0	50	18,0	50	12,0

VI - Virus inativado (100°C - por 10 minutos)

VA - Virus ativo

TABELA 14 -Efeito da Inoculação prévia de V60s inativado contra a multiplicação do segundo inóculo de VGDs ativo, em larvas do 3º estágio de *D. saccharalis*

INÓCULOS		DOSES cristais / larvas					
1º	2º	10 ⁶ cristais/larva		10 ⁵ cristais/larva		10 ⁴ cristais/larva	
11 dias	16 dias	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (%)	Número de Indivíduos Inoculadas	Mortalidade Corrigida (%)	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (%)
VI	Agua Dest.	50	0,0	50	0,0	50	0,0
VA	Agua Dest.	40	100,0	40	97,5	20	85,0
VI + VA	Agua Dest.	50	98,0	50	94,0	50	84,0
Agua Dest.	VA	50	70,0	50	64,0	50	64,0
VI	VA	50	48,0	50	44,0	50	38,0

VI - Virus inativado (100°C - por 10 minutos)

VA - Virus ativo

TABELA 15 -Efeito da Inoculação prévia de vírus inativado em larvas do 3º estágio de *D. saccharalis*.
 Avaliação do efeito pelo teste T de Student para comparação entre o grupo "Vacinado"
 (grupo de larvas previamente inoculados aos 11 dias) e o grupo sem inoculação aos 11 dias
 ao nível de 95%.

$$t_{(n-1)} = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{(\bar{x} + \bar{y}) (2 - \bar{x} - \bar{y})}} \cdot \sqrt{2m}$$

Vírus Inoculados	10 ⁷ cristais/larva	10 ⁶ cristais/larva	10 ⁵ cristais/larva	10 ⁴ cristais/ larva
VPNAgP	*t=3,02	*t=2,55	*t=3,28	-----
VPNAgF ₁₀	-----	*t=2,42	*t=2,28	*t=3,19
VPNTnP	*t=2,76	*t=2,09	*t=2,74	-----
VPNTnF ₁₁	-----	*t=3,12	*t=2,42	*t=2,61
VGDs	-----	*t=2,23	*t=2,02	*t=2,62

* Significativo ao nível de 95% de probabilidade (α=0,05) comparando com t₉₈= 1,97.

4.4 SELEÇÃO GENÉTICA

4.4.1 SELEÇÃO GENÉTICA DO VPNAg EM LARVAS DE *D. saccharalis*

De modo geral, as larvas de *D. saccharalis* infectadas com o VPNAg se caracterizaram inicialmente por pouca mobilidade e falta de apetite e com a evolução da infecção as larvas se tornaram flácidas e demonstraram uma coloração esbranquiçada na parte ventral do corpo que posteriormente se estendia por todo o organismo.

Após o 5º - 8º dia de tratamento, as larvas começaram a morrer e o exume destas sob o microscópio de contraste de fase, confirmava a presença do vírus. Os poliedros ou cristais do VPNAg observados ao microscópio de contraste de fase, não apresentaram qualquer modificação no decorrer das passagens seriadas.

As tabelas 16, 17, 18, 19, 20 e 21 apresentam os dados de mortalidade corrigida das larvas de *D. saccharalis* nos diferentes doses (10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 cristais/larva) dos inóculos do VPNAg obtidos nas dez passagens seriadas a que se procede. Nota-se nessas tabelas que a resposta de mortalidade corrigida das larvas de *D. saccharalis* ao VPNAg está diretamente relacionada com a dose.

Nas tabelas acima mencionadas constam também os valores de TL₅₀ com seus respectivos coeficientes de correlação, as quais variaram entre os valores de 0,75 a 0,99. Pode-se observar que os valores de TL₅₀ em geral diminuíram com o aumento da dose, isto é, quanto maior a

dose menor foi o tempo letal necessário para matar 50% da população de *D. saccharalis*. Os valores de T_{150} variaram muito no transcorrer das passagens seriadas do VPNAg nas larvas de *D. saccharalis*, não mostrando nenhuma tendência de aumento ou diminuição.

Para avaliar as alterações na virulência do VPNAg submetido ao processo de passagem seriada, foram calculados os valores de DL_{50} de isolados desse vírus nas larvas de *D. saccharalis*.

Constata-se na tabela 22 que ocorreu um aumento gradual na virulência do VPNAg durante as passagens seriadas em larvas de *D. saccharalis*.

Quando comparado com a geração parental, o isolado F_{10} do VPNAg apresentou-se com uma dose letal 50 (DL_{50}) 118 vezes menor do que o VPNAgP. Já o isolado F_{20} quando comparado com o isolado F_{10} do VPNAg mostrou-se cerca de 12,6 vezes mais virulento do que este isolado para as larvas de *D. saccharalis*.

Na tabela 22 pode-se observar ainda que na 1ª passagem o DL_{50} é de $7,89 \times 10^5$ cristais/larva enquanto que na 20ª passagem seriada o DL_{50} é de $5,27 \times 10^2$ ou 527 cristais/larva, indicando a ocorrência de uma redução do DL_{50} do VPNAg para as larvas de *D. saccharalis*.

O VPNAg após ter sido submetido a vinte passagens seriadas tornou-se cerca de 1.500 vezes mais virulento para as larvas de *D.*

saccharalis.

Na figura 1, que mostram os gráficos com equações de regressão, pode-se verificar da mesma forma o aumento na virulência do VPNAg através do deslocamento da linha tracejada que indica o valor de DL₅₀, ao longo das dez passagens seriadas desse baculovirus nas lagartas de *D. saccharalis*. Observa-se ainda nessas equações de regressão que os valores da inclinação da reta mostraram uma pequena oscilação indicando a pouca variação na população viral do VPNAg.

TABELA 16 -Porcentagem de mortalidade induzida pelo VPNAg nas várias passagens seriadas em larvas de *D. saccharalis*. Dose: 10^7 cristais / larva.

Geração do Inóculo	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	*r
Parental	103	26,4	15,0	0,75
1 ^o	100	100	9,0	0,98
11 ^o	95	100	12,4	0,95
12 ^o	100	100	12,3	0,98
13 ^o	100	100	15,5	0,90
14 ^o	95	100	11,5	0,97
15 ^o	100	100	12,2	0,90
16 ^o	100	100	14,3	0,99
17 ^o	100	100	8,2	0,97
18 ^o	100	100	15,9	0,98
19 ^o	90	100	12,7	0,99
20 ^o	100	98,0	12,8	0,95

*r - Coeficiente de Correlação

TABELA 17 -Porcentagem de mortalidade induzida pelo VPNAg nas várias passagens seriadas em larvas de *D. saccharalis*. Dose: 10^6 cristais / larva.

Geração do Inóculo	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	*r
Parental	100	42,8	----	----
10 ^o	100	93,7	10,6	0,78
11 ^o	100	100	12,6	0,96
12 ^o	93	97,0	13,8	0,95
13 ^o	80	100	19,4	0,95
11 ^o	100	97,0	13,4	0,91
15 ^o	100	98,0	12,7	0,94
16 ^o	100	100	16,8	0,97
17 ^o	87	100	12,1	0,98
18 ^o	100	99,0	18,6	0,97
19 ^o	80	100	14,4	0,97
20 ^o	92	99,0	13,2	0,96

*r - Coeficiente de Correlação

TABELA 18 -Porcentagem de mortalidade induzida pelo VPNAg nas várias passagens seriadas em larvas de *D. saccharalis*. Dose: 10^5 cristais / larva.

Geração do Inóculo	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	*r
Parental	97	22,9	----	----
10 ^o	100	67,3	17,7	0,78
11 ^o	100	85,0	15,7	0,95
12 ^o	95	75,0	17,1	0,95
13 ^o	100	90,0	23,2	0,97
11 ^o	87	93,0	16,4	0,94
15 ^o	100	80,0	17,8	0,96
16 ^o	94	87,0	16,9	0,98
17 ^o	113	89,0	16,9	0,94
18 ^o	100	85,0	19,7	0,95
19 ^o	90	90,0	16,4	0,98
20 ^o	100	93,0	18,0	0,97

*r - Coeficiente de Correlação

TABELA 19 -Porcentagem de mortalidade induzida pelo VPNAg nas várias passagens seriadas em larvas de *D. saccharalis*. Dose: 10^4 cristais / larva.

Geração do Inóculo	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	*r
Parental	100	10,0	----	----
10 ^o	100	51,3	27,8	0,75
11 ^o	100	47,0	----	----
12 ^o	95	60,0	17,3	0,97
13 ^o	80	64,0	25,2	0,96
14 ^o	100	63,0	17,6	0,99
15 ^o	100	61,0	19,9	0,93
16 ^o	100	82,0	18,2	0,95
17 ^o	80	83,0	18,2	0,95
18 ^o	100	81,0	19,8	0,94
19 ^o	80	80,0	16,8	0,95
20 ^o	100	80,0	21,4	0,95

*r - Coeficiente de Correlação

TABELA 20 -Porcentagem de mortalidade induzida pelo VPNAg nas várias pasagens seriadas em larvas de *D. saccharalis*. Dose: 10^3 cristais / larva.

Geração do Inóculo	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	*r
Parental	110	5,3	----	----
10 ^o	100	37,7	----	----
11 ^o	100	34,0	----	----
12 ^o	90	40,0	----	----
13 ^o	100	39,0	----	----
14 ^o	92	52,0	18,1	0,97
15 ^o	100	53,0	19,8	0,91
16 ^o	100	51,0	20,1	0,94
17 ^o	90	48,0	----	----
18 ^o	100	64,0	20,3	0,97
19 ^o	90	62,0	18,1	0,96
20 ^o	100	54,0	24,2	0,93

*r - Coeficiente de Correlação

TABELA 21 -Porcentagem de mortalidade induzida pelo VPNAg nas várias passagens seriadas em larvas de *D. saccharalis*. Dose: 10^2 cristais / larva.

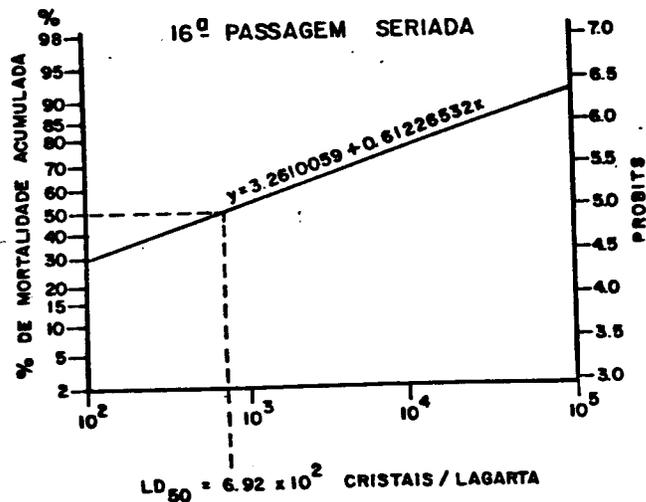
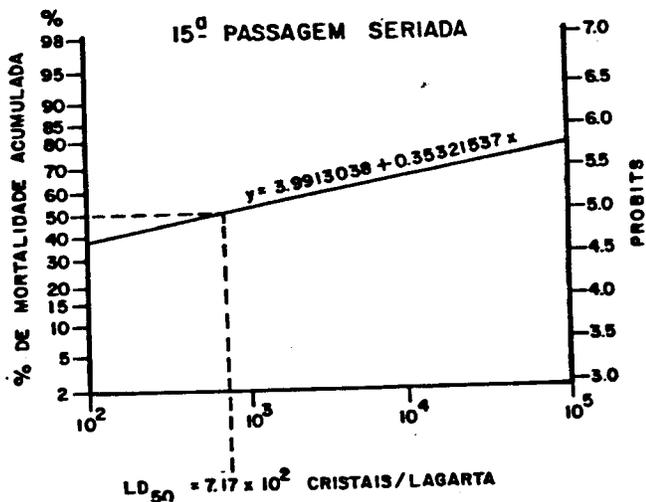
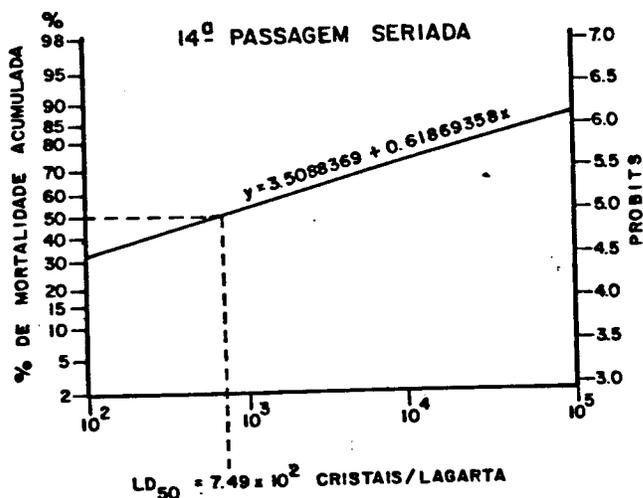
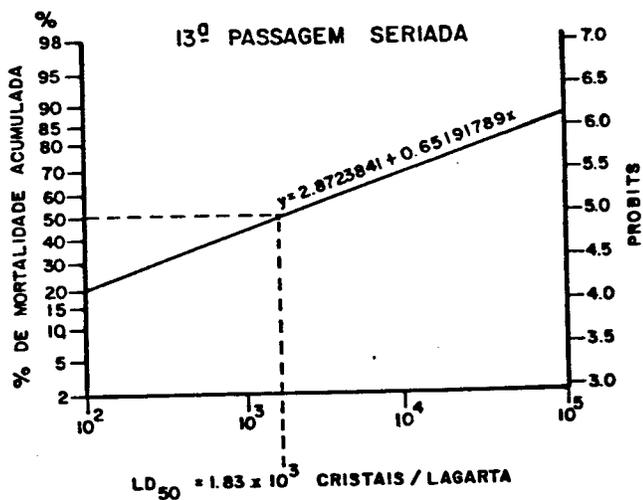
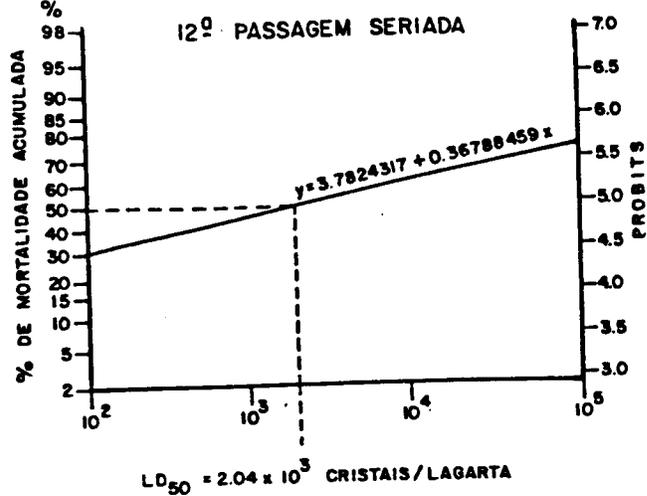
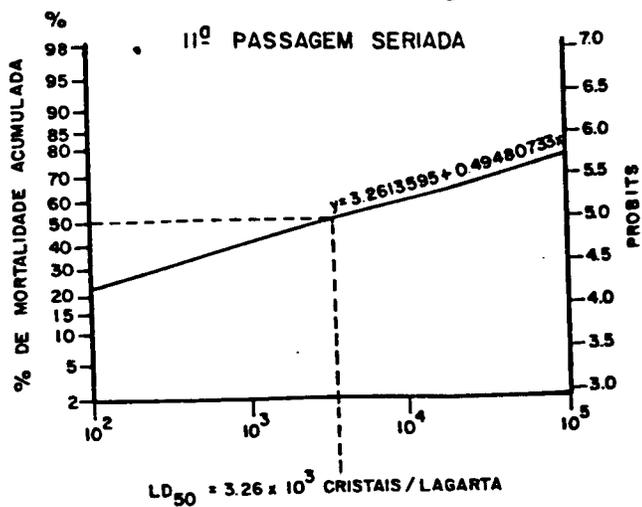
Geração do Inóculo	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	*r
Parental	----	----	----	----
10 ^o	----	----	----	----
11 ^o	100	30,0	----	----
12 ^o	95	35,0	----	----
13 ^o	80	25,0	----	----
14 ^o	89	35,0	----	----
15 ^o	100	39,0	----	----
16 ^o	100	30,0	----	----
17 ^o	90	34,0	----	----
18 ^o	100	26,0	----	----
19 ^o	80	28,0	----	----
20 ^o	100	34,0	----	----

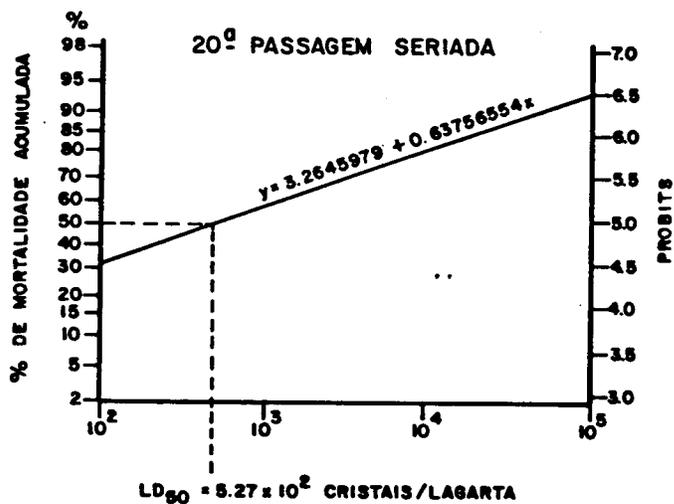
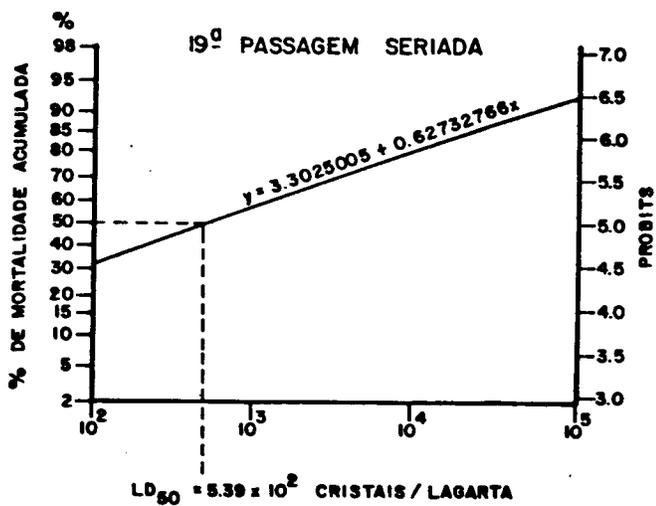
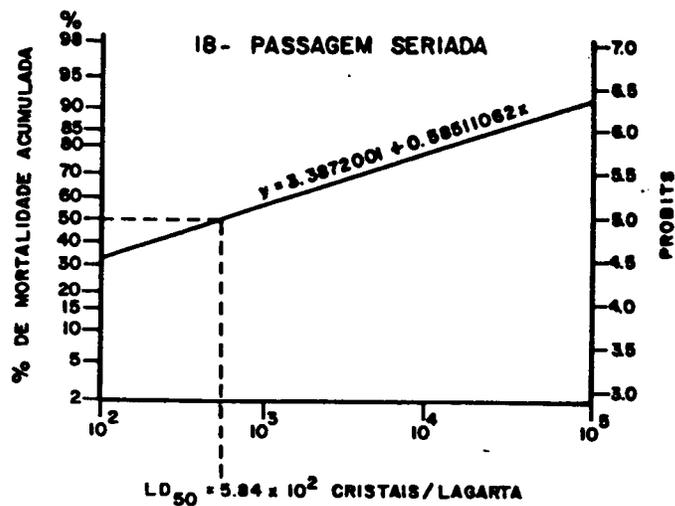
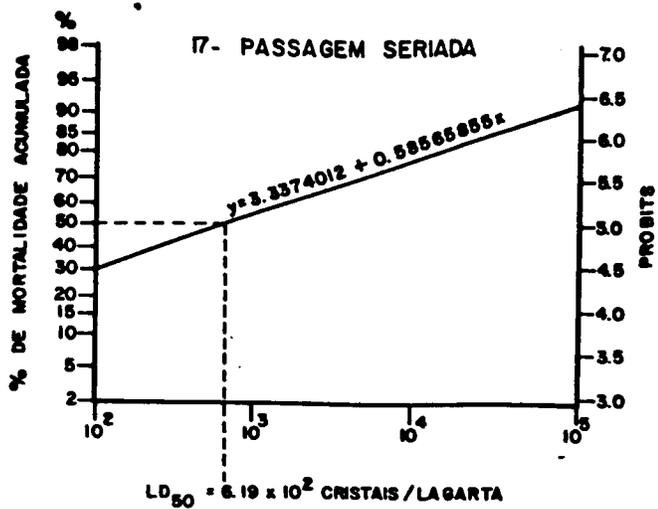
*r - Coeficiente de Correlação

TABELA 22 -Doses Letais 50 (DL₅₀) dos 10 isolados do VPNAg em larvas de *D. saccharalis*

Geração do Inóculo	Número de Indivíduos Analisados	DL ₅₀ (cristais / larva)	Intervalo de Confiança (95%)	
			L. inferior	L. superior
Parental	508	7,89 x 10 ⁵	1,18 x 10 ⁵	5,23 x 10 ⁶
10 ^o	500	6,64 x 10 ³	7,20 x 10 ²	6,11 x 10 ⁴
11 ^o	595	3,26 x 10 ³	7,7 x 10 ¹	1,38 x 10 ⁴
12 ^o	568	2,04 x 10 ³	2,95 x 10 ²	1,41 x 10 ⁴
13 ^o	540	1,83 x 10 ³	3,98 x 10 ²	8,46 x 10 ³
14 ^o	563	7,49 x 10 ²	4,70 x 10 ¹	1,19 x 10 ⁴
15 ^o	600	7,17 x 10 ²	1,06 x 10 ²	4,83 x 10 ³
16 ^o	594	6,92 x 10 ²	1,32 x 10 ²	3,62 x 10 ³
17 ^o	560	6,19 x 10 ²	6,80 x 10 ¹	5,62 x 10 ³
18 ^o	600	5,84 x 10 ²	3,61 x 10 ¹	9,46 x 10 ³
19 ^o	510	5,39 x 10 ²	1,10 x 10 ²	2,64 x 10 ³
20 ^o	592	5,27 x 10 ²	2,85 x 10 ²	9,72 x 10 ²

FIGURA 1 - Equação de regressão da mortalidade, em função da dose, para a larva de *D. saccharalis*, inoculadas com Virus de Poliiose Nuclear de *A. gemmatalis* (VPNAg).





4.4.2 SELEÇÃO GENÉTICA DO VPNTn EM LARVAS DE *D. saccharalis*

As larvas de *D. saccharalis* infectadas com o VPNTn se apresentaram em geral com tamanho reduzido devido a falta de apetite e o tegumento externo exibiu uma coloração esbranquiçada. Com o progresso da infecção, os corpos destas larvas se tornaram completamente liquefeitos, morrendo as primeiras lagartas após o 3º dia da inoculação do vírus. Esses sintomas externos característicos das larvas de *D. saccharalis* infectadas com o VPNTn apresentaram-se inalterados em todas as passagens seriadas. Através do exame de amostras do tecido gorduroso em microscópio de contraste de fase pode-se constatar a presença do VPNTn nesses insetos. Os cristais ou poliedros observados nestas amostras de tecidos gordurosa não demonstraram qualquer modificação na forma ou tamanho no decorrer dos passagens seriadas.

Nas tabelas 23, 24, 25, 26, 27 e 28 apresentamos os dados de mortalidade corrigida das larvas de *D. saccharalis* nas diferentes doses (10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , e 10^2 cristais/larva) do VPNTn dos inóculos obtidos através de passagens seriadas. Verifica-se nessas tabelas que a mortalidade corrigida das larvas de *D. saccharalis* aumenta com a dose.

Nas tabelas mencionadas constam ainda os valores de TL₅₀ com seus respectivos coeficientes de correlação que se mostram elevados. Pode-se observar nessas tabelas que os valores de TL₅₀ de modo geral foram inversamente proporcionais às doses utilizadas. Observa-se ainda

que os valores de TL₅₀ variaram muito no transcorrer das passagens seriadas do VPNTn nas larvas de *D. saccharalis*, não mostrando nenhuma tendência consistente de aumento ou de diminuição desses valores.

Para avaliar a ocorrência de qualquer variação na patogenicidade dos isolados obtidos de VPNTn submetido a nove passagens seriadas nas larvas de *D. saccharalis* foram calculados os valores de DL₅₀ que estão apresentados na tabela 29.

Constata-se na tabela 29 que não ocorreu qualquer alteração significativa na virulência dos isolados de VPNTn no decorrer das passagens seriadas nas larvas de *D. saccharalis*. Pode-se observar também que enquanto na 11^ª passagem o DL₅₀ é de 120 cristais por larva, na 20^ª o DL₅₀ de 218 cristais por larva.

Em trabalhos anteriores, quando comparado, com a geração parental, o isolado F₁₁ do VPNTn apresentou-se com uma dose letal 50% (DL₅₀) 800 vezes (806,6) menor do que o VPNTnF, representando um aumento na virulência do isolado F₁₁ de 800 vezes para as larvas de *D. saccharalis*.

Face aos resultados, observa-se que após a 11^ª passagens, não ocorreu uma redução significativa do DL₅₀, ao longo das nove passagens seriadas do VPNTn nas larvas de *D. saccharalis* como pode ser constatado na figura 2.

Nessa figura que mostram, os gráficos com as equações de regressão, pode-se verificar ainda, a não ocorrência de aumento da patogenicidade do VPNTn através da variação muito pequena no deslocamento da linha tracejada que indica o valor de DL₅₀ ao longo das nove passagens seriadas desse baculovirus nas lagartas de *D. saccharalis*.

TABELA 23 -Porcentagem de mortalidade induzida pelo VPNTn nas várias passagens seriadas em larvas de *D. saccharalis*. Dose: 10^7 cristais / larva.

Geração do Inóculo	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	*r
VPNTn Parental	111	98,2	10,0	0,93
11 ^o	100	99,7	5,0	0,90
12 ^o	----	----	----	----
13 ^o	100	100	12,8	0,90
11 ^o	100	100	10,5	0,96
15 ^o	----	----	----	----
16 ^o	100	100	11,6	0,96
17 ^o	50	100	12,5	0,94
18 ^o	87	100	10,5	0,96
19 ^o	95	100	10,8	0,90
20 ^o	80	100	10,2	0,90

*r - Coeficiente de Correlação

TABELA 24 -Porcentagem de mortalidade induzida pelo VPNTn nas várias em larvas de *D. saccharalis*.

Dose: 10^6 cristais / larva.

Geração do <i>Inóculo</i>	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	*r
VPNTn Parental	111	81,9	12,0	0,91
11 ^o	95	98,9	5,2	0,81
12 ^o	80	100	12,5	0,96
13 ^o	91	100	13,1	0,95
11 ^o	95	100	11,7	0,96
15 ^o	91	100	12,8	0,96
16 ^o	100	100	15,3	0,99
17 ^o	100	98,0	13,5	0,96
18 ^o	100	98,0	11,7	0,96
19 ^o	98	100	11,1	0,95
20 ^o	100	99,0	10,6	0,87

*r - Coeficiente de Correlação

TABELA 25 -Porcentagem de mortalidade induzida pelo VPNTn nas várias passagens seriadas em larvas de *D. saccharalis*. Dose: 10^5 cristais / larva.

Geração do Inóculo	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	*r
VPNTn Parental	113	38,7	----	----
11 ^o	98	93,8	21,5	0,97
12 ^o	92	94,6	15,0	0,95
13 ^o	80	87,5	16,2	0,98
14 ^o	95	89,5	12,3	0,95
15 ^o	100	90,0	14,8	0,97
16 ^o	80	87,5	17,0	0,96
17 ^o	100	84,0	16,1	0,94
18 ^o	100	80,0	14,4	0,95
19 ^o	100	70,0	13,6	0,98
20 ^o	100	94,0	12,8	0,94

*r - Coeficiente de Correlação

TABELA 26 -Porcentagem de mortalidade induzida pelo VPNTn nas várias passagens seriadas em larvas de *D. saccharalis*. Dose: 10^4 cristais / larva.

Geração do Inóculo	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	*r
VPNTn Parental	90	32,2	----	----
11 ^o	96	86,5	37,1	0,97
12 ^o	92	78,2	16,2	0,92
13 ^o	96	79,8	17,6	0,94
11 ^o	100	71,0	14,3	0,95
15 ^o	100	84,0	16,2	0,93
16 ^o	100	85,0	18,3	0,95
17 ^o	100	74,0	18,1	0,98
18 ^o	100	70,0	18,1	0,98
19 ^o	100	80,0	16,7	0,91
20 ^o	100	75,0	14,5	0,98

*r - Coeficiente de Correlação

TABELA 27 -Porcentagem de mortalidade induzida pelo VPNTn nas várias passagens seriadas em larvas de *D. saccharalis*. Dose: 10^3 cristais / larva.

Geração do Inóculo	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	*r
VPNTn Parental	100	15,8	----	----
11 ^o	100	64,0	40,3	0,96
12 ^o	84	61,2	19,-	0,99
13 ^o	98	67,9	18,7	0,91
11 ^o	94	66,0	16,6	0,91
15 ^o	100	62,0	17,6	0,95
16 ^o	100	69,0	19,5	0,93
17 ^o	100	58,0	18,7	0,91
18 ^o	100	56,0	19,6	0,91
19 ^o	60	58,3	17,4	0,99
20 ^o	95	55,8	15,8	0,99

*r - Coeficiente de Correlação

TABELA 28 -Porcentagem de mortalidade induzida pelo VPNTn nas várias passagens seriadas em larvas de *D. saccharalis*. Dose: 10^2 cristais / larva.

Geração do Inóculo	Número de Indivíduos Analisados	Mortalidade Corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	*r
VPNTn Parental	----	----	----	----
11 ^o	----	----	----	----
12 ^o	95	48,0	----	----
13 ^o	87	46,0	----	----
14 ^o	100	47,0	----	----
15 ^o	100	48,7	----	----
16 ^o	100	41,0	----	----
17 ^o	100	49,8	----	----
18 ^o	95	48,0	----	----
19 ^o	97	49,0	----	----
20 ^o	100	49,0	----	----

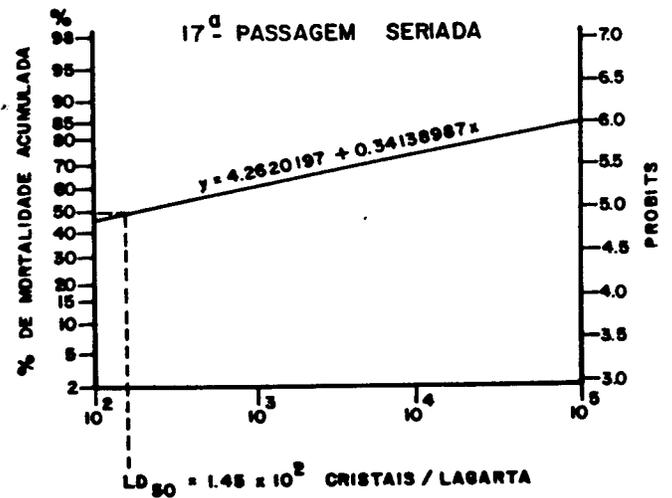
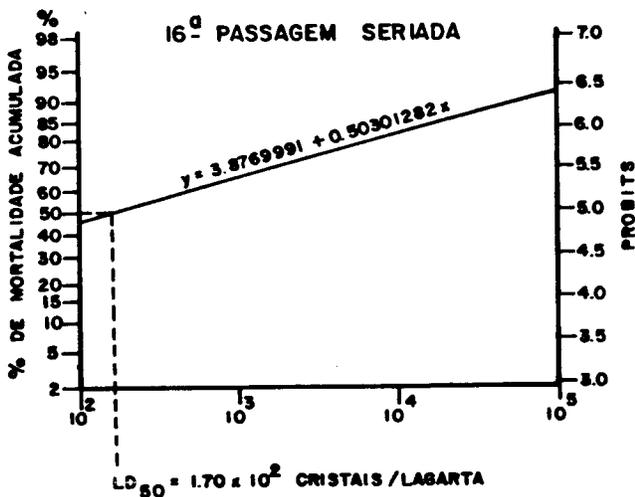
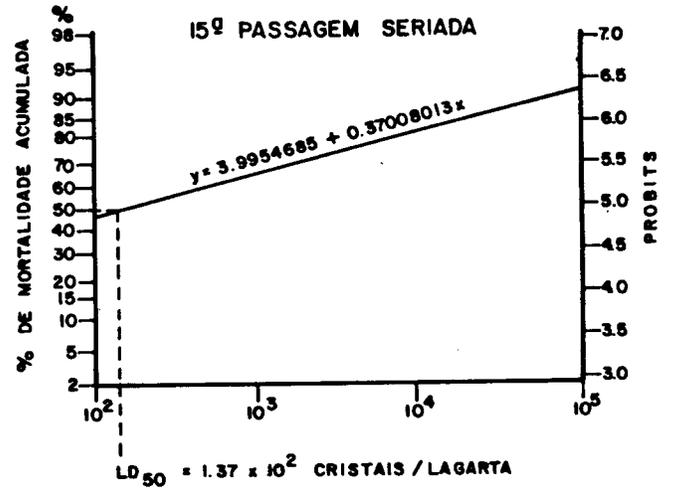
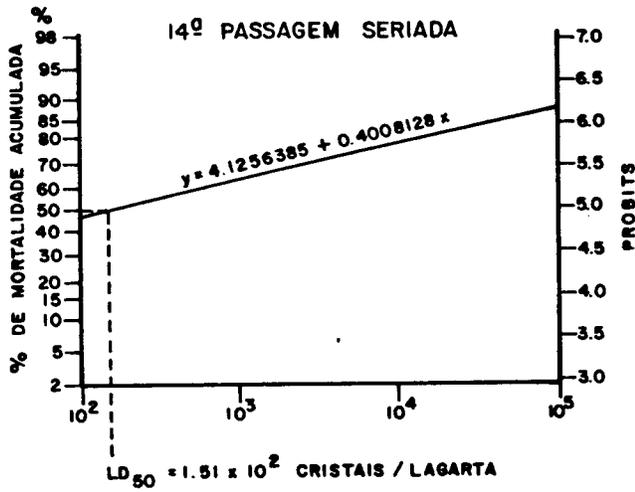
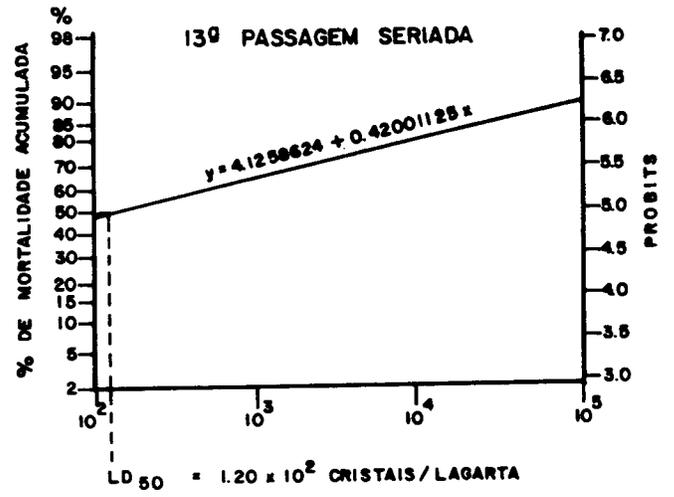
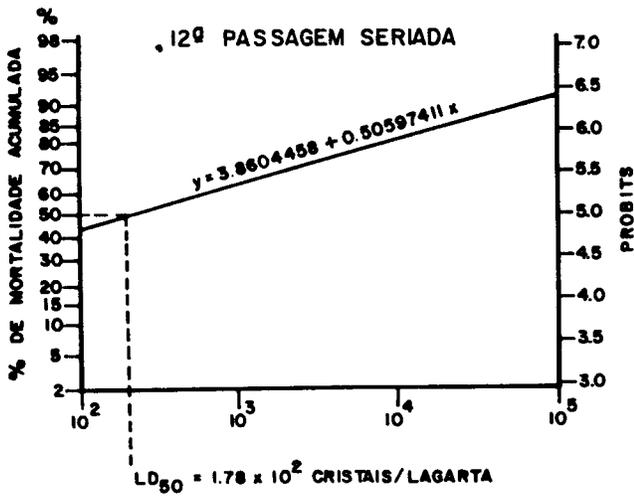
*r - Coeficiente de Correlação

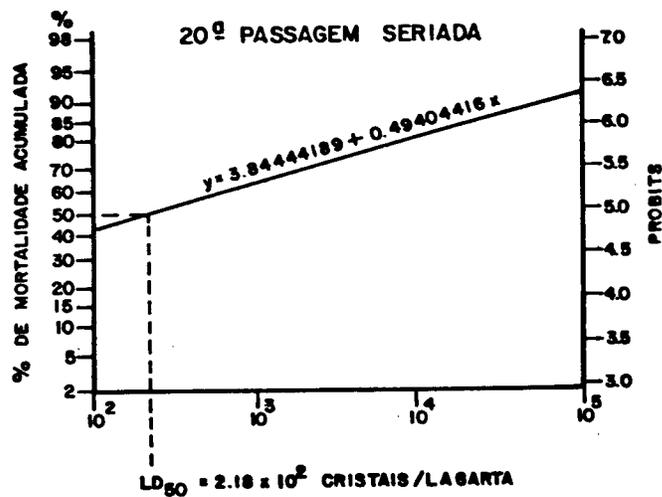
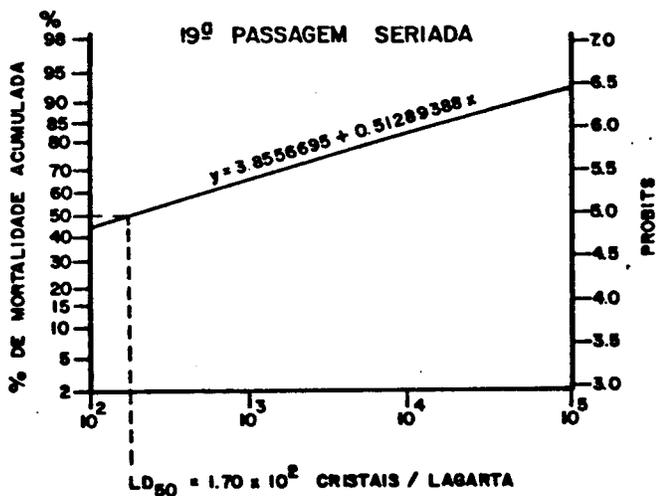
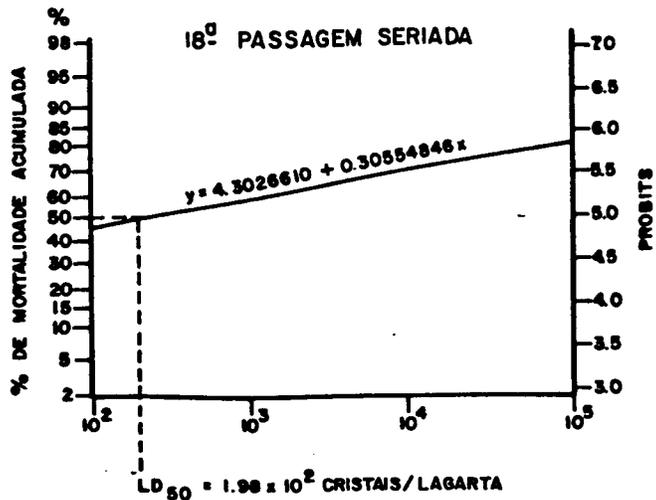
TABELA 29 -Doses Letais 50 (DL₅₀) dos 11 isolados de VPNTn em larvas de *D. saccharalis*.

Geração do Inóculo	Número de Indivíduos Analisados	DL ₅₀ (cristais / larva)	Intervalo de Confiança (95%)	
			L.Inferior	L.Superior
VPNTn Parental	525	$9,68 \times 10^4$	$1,25 \times 10^4$	$7,47 \times 10^5$
11º	489	$1,20 \times 10^2$	$1,40 \times 10^1$	$9,92 \times 10^2$
12º	443	$1,78 \times 10^2$	$2,40 \times 10^1$	$1,33 \times 10^3$
13º	552	$1,20 \times 10^2$	$1,51 \times 10^1$	$9,17 \times 10^2$
11º	584	$1,51 \times 10^2$	$6,86 \times 10^0$	$3,36 \times 10^3$
15º	491	$1,37 \times 10^2$	$2,40 \times 10^1$	$7,67 \times 10^2$
16º	580	$1,70 \times 10^2$	$5,12 \times 10^0$	$5,69 \times 10^3$
17º	550	$1,45 \times 10^2$	$2,25 \times 10^1$	$9,34 \times 10^2$
18º	582	$1,98 \times 10^2$	$4,15 \times 10^1$	$9,45 \times 10^2$
19º	550	$1,70 \times 10^2$	$4,83 \times 10^0$	$6,00 \times 10^3$
20º	575	$2,18 \times 10^2$	$7,88 \times 10^0$	$6,04 \times 10^3$

*r - Coeficiente de Correlação

FIGURA 2 - Equação de regressão da mortalidade em função da dose, para a larva de *D. saccharalis*, inoculados com o Virus de Folie-dose Nuclear de *Trichoplusia ni* (VPNTn).





4.4.3 ANÁLISE COMPARATIVA DAS PROTEÍNAS DOS ISOLADOS DO VPNAg E VPNTn

O padrão protéico viral com seus respectivos pesos moleculares dos isolados do VPNAg e dos isolados do VPNTn estão nas figuras 3, 4, 5, e 6.

Na figura 3, quando comparamos o vírus original (VPNAgP) com os isolados selecionados (VPNAg F₁₅ e VPNAg F₂₀), estes se apresentaram idênticos quanto ao número de bandas e quanto aos pesos moleculares de seus polipeptídeos.

O isolado que foi selecionado através de dez passagens seriadas em larvas de *D. saccharalis*, e posteriormente voltou a ser inoculado em seu hospedeiro original, *A. gemmatalis* (VPNAg F₁₀ R¹) se mostrou idêntico ao VPNAgP, quanto ao número de bandas e seus respectivos pesos moleculares.

Na figura 3, verifica-se ainda que os VPNAgs analisados apresentaram 18 bandas, cujos pesos moleculares foram os seguintes: 92.000, 82.000, 64.000, 58.500, 54.500, 48.000, 43.000, 38.000, 36.000, 32.000, 28.000, 26.000, 24.000, 22.000, 18.800, 16.500, 15.000 e 13.000 daltons.

A poliedrina, principal componente protéico dos baculovirus do subgrupo A, correspondente à banda nº 11, de peso molecular 28.000 daltons também não exibiu qualquer diferença em sua mobilidade para os

isolados do VPNAg.

Na figura 4, comparando-se os perfis protéicos do VPNTnP e do seu isolado selecionado VPNTnF20, constata-se que os mesmos apresentaram o mesmo padrão protéico de 22 bandas polipeptídicas com os mesmos pesos moleculares.

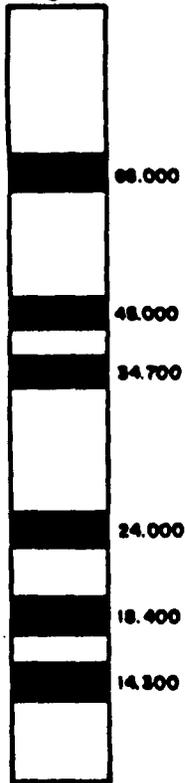
Analisando-se as proteínas do VPNTnP e do seu isolado VPNTnF20, verificou-se que os 22 polipeptídeos encontrados mostraram os seguintes pesos moleculares: 135.000, 117.000, 109.000, 92.000, 85.500, 76.000, 62.000, 61.000, 55.000, 46.700, 42.000, 37.000, 28.000, 27.000, 23.000, 21.000, 18.500, 17.000, 15.500, 13.000, 12.800 e 11.000 daltons, sendo que a maior banda ou a mais intensa é a de nº 13, correspondente à poliedrina.

Verificou-se que tanto o VPNAg quanto o VPNTn e os seus isolados apresentaram os mesmos pesos moleculares para as suas respectivas poliedrinas, apesar de serem vírus diferentes.

FIGURA 3 - Representação esquemática das bandas polipeptídicas para:
0) Padrão de Peso Molecular 1) VPNAg Parental (VPNAgP) 2)
VPNAg F₁₀ R₁ 3) VPNAg F₁₅ e 4)VPNAg F₂₀, purificados por
centrifugação diferencial.

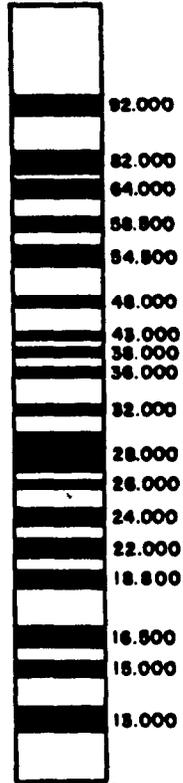
**Padrão
Dalton VI**

0



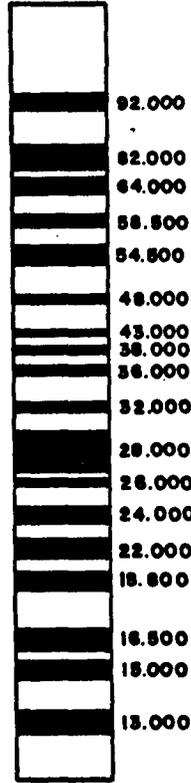
**VPNAg
Parental**

1



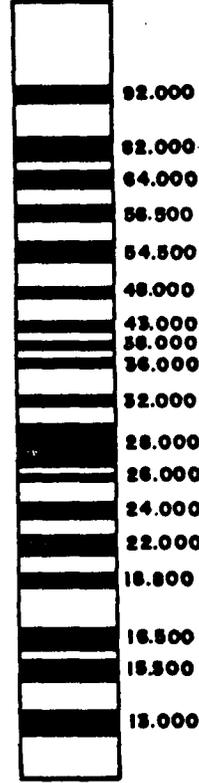
VPNAg F10R1

2



VPNAg F15

3



VPNAg F20

4

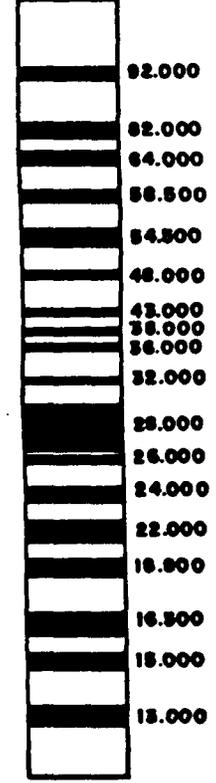
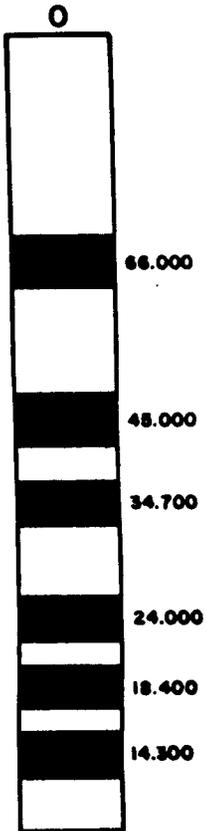
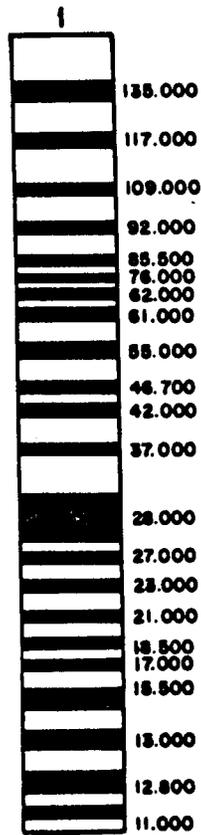


FIGURA 4 - Representação esquemática dos bandas polipeptídicas encontrada para: 0) Padrão de Peso Molecular 1) VPMTn Parental 2) VPNTnF₂₀, purificados por centrifugação diferencial.

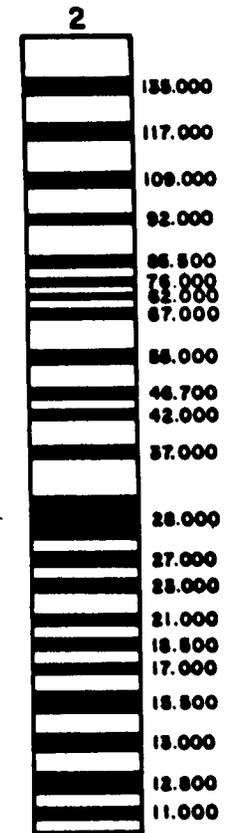
**Padrão
Dalton VI / Sigma**



**VPNTn
Parental (VPNTnP)**



VPNTn F20



5. DISCUSSÃO

5.1 ESTABILIDADE TÉRMICA VIRAL

Em todos os experimentos realizados, observou-se uma relação linear entre o aumento de temperatura e a taxa de inativação viral. Essa relação linear também foi observada quanto ao aumento de temperatura e o tempo de incubação dos 5 baculovirus testados.

Os dados da literatura mostram que 100°C é uma temperatura suficiente para inativar completamente os virus de insetos em menos de dez minutos (STEINHAUS & DINEEN, 1960; DAVID & GARDINER, 1967; LOWE & PASCHKE, 1968; STUERMER & BULLOCK, 1968; MORRIS, 1971; LATHIKA & JACOB, 1974; HARPAZ & RACCAH, 1978; STAIRS & MILLIGAN, 1979; BEDFORD, 1981; YOUNG III & YEARIAN, 1986). Com efeito, neste estudo, constatou-se que todos os 5 virus testados foram totalmente inativados com essa temperatura por 5 minutos. Em virtude dessas respostas, pode-se sugerir que materiais ou mesmo equipamentos podem ser efetivamente descontaminados de tais virus, quando, em banho-maria, são expostos por um pequeno período à temperatura de 100°C.

Não obstante, a literatura relatar que alguns baculovirus são capazes de manter a infectividade mesmo após 15 minutos de exposição a 80°C (STUERMER & BULLOCK, 1968; LATHIKA & JACOB, 1974; MARTIGNONI & IWAI, 1977; HARPAZ & RACCAH, 1978), nossos resultados demonstraram que os 5 baculovirus analisados foram inativados em menos

de dez minutos nesta temperatura.

Neste trabalho, observou-se que os 5 virus foram inativados em menos de 30 minutos à temperaturas de 70°C, ao passo que a 60°C chegaram a resistir por 2 horas, sem perder totalmente a infectividade. Esses resultados indicam que os 5 virus testados foram mais sensíveis a estas temperaturas, quando comparados com outros baculovirus analisados por outros autores (TANADA, 1953; 1959; GUDAUSKAS & CONNERDAY, 1968; LOWE & FASCHKE, 1968; PAWAR & RAMAKRISHNAM, 1971; LATHIKA & JACOB, 1974; MARTIGNONI & IWAI, 1977; HARPAZ & RACCAH, 1978; JAQUES, 1985).

Diversos autores notaram que os baculovirus são capazes de resistir de 1 a 5 dias, sem perder totalmente a infectividade em temperaturas de 50°C (TANADA, 1953; DAVID & GARDINER, 1967; IGNOFFO, 1967; GUDAUSKAS & CANNERDAY, 1968; TANADA & CHANG, 1968; JAQUES, 1985; YOUNG III & YEARIAN, 1986). Já em temperaturas de 40°C, os baculovirus, em geral, são capazes de suportar mantendo a infectividade por períodos que vão de 5 a 20 dias de exposição (DAVID & GARDINER, 1967; STUERMER & BULLOCK, 1968; MORRIS, 1971; JAQUES, 1985; YOUNG III & YEARIAN, 1986).

Todos os 5 virus testados, foram capazes de resistir por até 1 dia, sem perder totalmente sua infectividade em temperaturas de 50°C, enquanto que a 40°C, estes mantiveram a infectividade por até 5 dias; resultados que estão de acordo com a literatura.

Face a esses resultados, pode-se constatar que apesar da diferença de origem dos 5 virus analisados, estes apresentaram estabilidade térmica semelhante. E, quando esses experimentos foram comparados aos demais descritos na literatura, verificamos uma certa homogeneidade dos baculovirus nas respostas ao tratamento térmico, que reflete, sem dúvida alguma, uma similaridade na constituição destes virus (RIBEIRO & PAVAN, 1985b).

A estabilidade térmica dos baculovirus inclusos (VPN e VG) parece depender da resistência do corpo de inclusão ou cristal protéico à desnaturação (JAQUES, 1985). O cristal protéico ou poliedro tem a função de proteger os virus das condições adversas do meio ambiente (STAIRS, 1968; SMITH, 1976; JAQUES, 1985) e esses cristais ou corpos de inclusão consistem de proteína, as quais em temperaturas muito elevadas (45°C a 85°C) perdem grande parte de sua ordem e são "denaturadas" ou inativadas. A resistência da proteína à denaturação vai depender da sua natureza, isto é, da sua composição de aminoácidos (KLIBANOV & AHERN, 1987). Contudo, segundo esses mesmos autores, quase todas as proteínas são inativadas ou "denaturadas" a 100°C.

Diante desses dados, pode-se sugerir que a provável causa da perda de viabilidade dos virus em temperaturas muito altas, parece ser a desnaturação de suas proteínas do corpo de inclusão. Pode-se inferir ainda que a extensão da inativação viral está diretamente relacionada com a temperatura efetiva testada. Quanto mais elevada for a temperatura, menor será a atividade biológica viral. Devido à complexidade do assunto, é muito difícil determinar as consequências

da inativação térmica para os vários componentes virais. Não há ainda uma correlação clara entre a inativação térmica de baculovirus e a desnaturação de proteínas do poliedro, e, se esta asserção for verdadeira podemos assumir que apenas parte do virus está inativado. Todavia, é possível ser essa desnaturação proteica a responsável pela perda da integridade funcional do virus. Em temperaturas mais elevadas, evidentemente, aumenta a taxa de inativação ou desnaturação dos poliedros virais.

Os estudos sobre a estabilidade térmica viral apresentam importância fundamental quando se trata de estocagem de produtos experimentais ou comerciais durante períodos de mais de um ano. Está bem estabelecido que os Virus de Poliedrose Nuclear (VPN) e os Virus de Granulose (VG) retém atividade por longos períodos quando estocados com seus cristais protéicos (JAQUES, 1985). Verificou-se assim, que enquanto a atividade dos baculovirus com seus poliedros retém atividade por longos períodos, os virions livres, liberados do corpo de inclusão, mantém infectividade por períodos curtos, poucas horas ou dias em alguns casos (IGNOFFO & McINTOSH, 1988). Esses fatos confirmam a importância dos poliedros ou cristais protéicos na estabilidade térmica viral.

Dados da literatura demonstram que temperaturas acima de 50°C, a atividade viral é perdida em algumas horas ou minutos, ao passo que em temperaturas em torno de 40°C, os baculovirus retém atividade por até 1 ano, quando estocados (DAVID & GARDINER, 1967; HUNTER e cols, 1973; KINSINGER & McGAUGHEY, 1976; JAQUES, 1985; YOUNG

III & YEARIAN, 1986). Diante disso, pode-se aventar que quando se deseja estocar um baculovirus como produto experimental ou comercial, deve-se mantê-lo com seus poliedros ou grânulos em temperaturas ambientais, para que os mesmos não sejam significativamente afetados.

Por outro lado, através de diferenças na termo-estabilidade, podem ser distinguidos tipos ou isolados de um mesmo virus (MARTIGNONI & IWAI, 1977). Esses autores verificaram que o tipo SEV do Virus de Poliedrose Nuclear de *Orgyia pseudotsugata*, é menos estável do que o tipo MEV, sendo inativado a 65°C por 30 minutos e a 60°C por 4 horas; enquanto que o tipo MEV requereu 1 hora de exposição a 65°C e 14 horas de exposição para ser totalmente inativado a 60°C.

Os nossos resultados mostraram que os isolados selecionados foram um pouco mais sensíveis ao tratamento térmico do que os isolados não selecionados nas diferentes temperaturas testadas. Esses dados indicam que diferenças na termo-estabilidade podem ser muito úteis para diagnosticar uma grande diversidade de baculovirus.

Os estudos de estabilidade térmica, além de fornecerem informações a respeito dos mecanismos envolvidos no controle da resposta viral a temperaturas elevadas, contribuem também para um melhor desempenho na manipulação desses microorganismos no laboratório.

5.2 EFEITOS DE DIFERENTES TEMPERATURAS NO DESENVOLVIMENTO DA INFECÇÃO VIRAL

O efeito de temperatura foi analisado através dos valores de mortalidade larval, de TL_{50} , da produção viral e da eficiência de produção viral.

Verificou-se, que para os 4 baculovirus (VPNAgP, VPNAgF₁₀, VPNTnP e VPNTnF₁₁) analisados a temperatura ótima foi de 28°C.

Segundo JOHNSON e colaboradores (1982), deve se esperar uma similaridade entre a temperatura ótima do hospedeiro e a do vírus infectante, visto que este último é um parasita intracelular e necessita dos sistemas enzimáticos do hospedeiro para sua replicação. Entretanto, o que se tem constatado na maioria dos casos estudados, é que a temperatura ótima para o desenvolvimento viral não é a mesma do seu hospedeiro natural (SMITH e cols, 1961; DAY & DUDZINSKI, 1966; WITT & STAIRS, 1976; ALVES, 1986; FEEMERS, 1986).

WITT e STAIRS (1976), por exemplo, constataram que a temperatura ótima para o desenvolvimento do *Vírus Iridescente de Tipula* é de 24°C, e já de seu hospedeiro natural é de 32°C.

E, a despeito dessa não similaridade entre a temperatura ótima do hospedeiro e a do vírus infectante, o que se constata é que de um modo geral os vírus de insetos apresentam uma mesma faixa de temperatura ótima de 25°C a 30°C (ALVES, 1986b; HARPER, 1986). De

fato, em nossos experimentos, onde ocorreu maior eficiência de produção viral foi na faixa de 26°C a 30°C.

Pode-se observar nestes experimentos, que o sistema vírus-hospedeiro é intensamente afetado tanto por temperaturas baixas como por temperaturas elevadas.

Observações experimentais dos efeitos de diferentes temperaturas no desenvolvimento da infecção viral em insetos, demonstram que de modo geral, quando os insetos são expostos a temperaturas baixas de 16°C a 18°C, o vírus infectante se desenvolve lentamente e a produção viral é significativamente pequena, indicando que as condições metabólicas dos insetos não são suficientemente alteradas (WITT & STAIRS, 1976; STAIRS, 1978; BOUCIAS e cols, 1980).

A 17°C, os 4 baculovirus testados neste trabalho, além de apresentarem uma acentuada redução na produção viral, exibiram uma baixa mortalidade e um TL₅₀ muito alto.

Em temperaturas próximas de 20°C a 24°C, comumente a produção viral é muito reduzida e o inseto hospedeiro exibe um acentuado aumento na duração do seu estágio larval (STAIRS, 1978; SHAPIRO, 1986).

Neste estudo, temperaturas de 22°C a 24°C, exibiram baixos valores de eficiência de produção viral e valores relativamente altos de TL₅₀.

Em geral, a taxa de mortalidade dos insetos por infecção viral é maior e mais rápida em temperaturas na faixa de 28°C a 30°C, onde ocorre também uma maior atividade e produção viral (JOHNSON e cols, 1982; SALAMA e cols, 1986; SHAPIRO, 1986). De fato, em nosso caso, temperaturas na faixa de 28°C a 30°C foi onde ocorreu maior eficiência na produção viral. Contudo, não observamos nesta faixa de temperatura uma maior e mais rápida taxa de mortalidade dos insetos, contrastando com os dados descritos na literatura.

Temperaturas de 35°C, em geral tem efeitos detrimenais sobre os baculovirus e os demais virus de insetos (YADAVA, 1970). O Virus Iridescente de *Sericessthis* foi capaz de manter o estado de infecção viral, mas não foi capaz de se multiplicar em larvas de *G. mellonella* a 35°C (DAY & DUDZINSKY, 1965). O baculovirus de *Yponomeuta evonymellus* foi totalmente suprimido quando larvas de *Y. evonymellus* infectadas com este respectivo virus foram mantidas a 35°C (FEEMERS, 1986).

Em oposição a esses dados da literatura, não se notou qualquer efeito detrimental, nem tampouco supressão total do desenvolvimento viral, quando os 4 baculovirus foram expostos a esta temperatura de 35°C.

Estudos demonstraram que pode ocorrer pelo menos 2 mecanismos diferentes em tratamentos com temperaturas próximas a 37°C no desenvolvimento da infecção viral:

- 1) Um é o mecanismo referido como "terapia termal", que é uma "cura" do hospedeiro da infecção viral (TANADA, 1967; WATANABE & TANADA, 1972; INOUE & TANADA, 1977).
- 2) Um segundo possível mecanismo é que temperaturas próximas a 37°C restringem o desenvolvimento do vírus inibindo a produção de constituintes vitais para a replicação do mesmo (STAIRS, 1978; KOBAYASHI e cols, 1981; SAID & SIKOROWSKI, 1986; SHAPIRO, 1986).

Provavelmente, no nosso caso, ocorreu o segundo mecanismo descrito, já que não ocorreu restabelecimento ou cura das larvas de *D. saccharalis* da infecção viral em temperatura de 37°C.

Na faixa de 37°C a 39°C, a eficiência de produção viral foi significativamente reduzida. Esses dados são muito interessantes, visto que a literatura relata que há um bloqueio total no desenvolvimento viral em temperaturas acima de 36°C (YADAVA, 1970; BULLOCK, 1972; STAIRS, 1978; KOBAYASHI & KAWASE, 1980; JOHNSON e cols, 1982; FEEMERS, 1986), e, os nossos resultados demonstram claramente que os 4 baculovirus foram capazes de se desenvolverem nas temperaturas de 37°C e 39°C.

Ao contrário do que foi observado por BULLOCK (1972) e SHAPIRO (1986), as larvas de *D. saccharalis* infectadas com baculovirus não exibiram qualquer efeito teratológico em temperaturas de 37°C e 39°C.

Os resultados obtidos mostram que temperaturas elevadas não inibem completamente o desenvolvimento dos virus, indicando que a função celular do hospedeiro não é tão intensamente afetada a ponto de evitar o desenvolvimento da infecção viral. Nos nossos experimentos, os controles das temperaturas 39°C e 37°C mostraram uma mortalidade larval de cerca de 100% e 80% respectivamente. Apesar dessas temperaturas matarem as larvas de *D. saccharalis* independentemente da presença do virus, nas larvas inoculadas mortas sempre foi constatado a presença do virus se desenvolvendo normalmente nos tecidos do inseto hospedeiro. Com efeito, através dos valores de produção e eficiência de produção viral verificou-se que mesmo que essas temperaturas tenham alterado significativamente o metabolismo das larvas de *D. saccharalis*, os virus testados foram capazes ainda de infectar esses insetos.

Por outro lado, comumente os trabalhos de efeito de temperatura no desenvolvimento da infecção de baculovirus, avaliam apenas as respostas de mortalidade larval produzidas pelo virus em estudo e os valores de TL₅₀, não levando em consideração a produção e a eficiência de produção viral no inseto hospedeiro. Contudo, em nossos experimentos ficou claro que nem sempre uma maior mortalidade larval indica uma maior produção e eficiência de produção viral. Desse modo, a não utilização de tais parâmetros pode conduzir a resultados não tão fidedignos.

Outro fator de maior importância também, é que a alteração de apenas 2°C, pode significar uma diferença substancial quanto à

produção e à eficiência de produção viral. Tais dados demonstram a importância do estabelecimento efetivo da temperatura ótima de cada vírus no inseto hospedeiro que permitirá uma maior otimização da produção destes.

5.3. EFEITOS DA INOCULAÇÃO DE VIRUS INATIVADO COMO INDUTOR DE MECANISMOS DE DEFESA EM LARVAS DE *D. saccharalis*

Os resultados da inoculação prévia dos 5 vírus analisados, indica claramente a estimulação de um sistema de defesa reduzindo o efeito da infecção viral nas larvas de *D. saccharalis*. Esta resposta observada pode ser causada por mecanismos descritos individualmente ou conjuntamente nos insetos em diferentes tipos de associação.

Um primeiro mecanismo que se conhece é o que se refere as reações de defesa celular do inseto hospedeiro que envolvem diretamente os hemócitos. Não obstante, a literatura relatar que esse sistema de defesa tem uma função pouco conhecida e não muito eficiente em infecções virais, as observações mais recentes, demonstram que os hemócitos como elementos celulares da hemolinfa do inseto, devem participar de uma série de mecanismos de defesa contra os vírus. CARTER e GREEN (1988), verificaram, por exemplo, que a quantidade de hemócitos aumentou significativamente nas larvas de *Tipula paludosa* durante a infecção com baculovirus. Estes autores observaram que simultâneamente ao aumento de hemócitos ocorria uma inibição nos processos celulares de melanização e coagulação. Estes resultados, segundo esses mesmos autores, fornecem evidências circunstanciais de que estes processos celulares estejam envolvidos na inibição viral.

É provável, que neste trabalho de forma semelhante aos daqueles descritos na literatura, tenha ocorrido o reconhecimento do

virus previamente inoculado como antígeno pelo inseto hospedeiro, o qual se protegeu através de reações celulares que conseqüentemente inibiram parcialmente a reinfecção pelo vírus ativo.

Um segundo mecanismo que pode suceder é a reação de defesa humoral do inseto hospedeiro à infecção viral. Tal reação evidentemente não é celular e corresponde à produção de anticorpos nos mamíferos. Nos mecanismos de defesa humoral há um envolvimento indireto dos hemócitos, que produzem substâncias que são liberadas na hemolinfa. Os hemócitos podem sintetizar muitas substâncias com poder microbicida (SIDEN, 1983; MENEZES, 1984). Tais substâncias, apesar de demonstrarem eficiência na atividade anti-bacteriana em larvas de lepidópteros, não foram ainda testadas contra a invasão viral (BURAND e cols, 1986). Porém, parece que dentro dos fatores produzidos durante a defesa humoral do inseto, as heteroaglutininas desempenhariam um importante papel no reconhecimento de agentes estranhos que incluiriam os vírus (AMIRANTE, 1976; SIDEN, 1983). A presença destas heteroaglutininas na hemolinfa faz com que qualquer partícula que penetre na hemocele dos insetos seja recoberta por estas moléculas à maneira que ocorre com os anticorpos dos cordados (AMIRANTE, 1976). Estas moléculas são de ocorrência natural na hemolinfa de vários insetos e permanecem na circulação durante as diferentes infecções (ROWLEY & RATCLIFFE, 1979; GOLDENBERG e cols, 1983; MENEZES, 1984).

Possivelmente, no nosso caso, as células de *D. saccharalis* reconheceram o vírus previamente inoculado como substância estranha e induziram a síntese de heteroaglutininas, as quais reduziram a

infecção do vírus ativo posteriormente inoculado.

Por outro lado, diversos autores notaram que a recuperação completa de uma variedade de infecções virais se deu na completa ausência da imunidade em vários animais e seres humanos testados. Quantidades fisiológicas de anticorpos não parecem alterar o curso da infecção viral após os vírus estarem estabelecidos em determinados órgãos alvos (ASKONAS, 1988; HARNDEN, 1988). A cura ou recuperação de uma infecção viral pode ser dada então por mecanismos não imunológicos, tais como a produção de interferon. O interferon foi descoberto por ISAACS e LINDENMANN (1957) e se caracteriza por ser uma proteína excepcionalmente estável, que pode ser produzida pelas células do hospedeiro logo no início da infecção viral e inibe ou bloqueia a transcrição primária do RNAm viral (HARNDEN, 1988).

Em insetos, há poucos relatos na literatura sobre a produção de interferon. Verificou-se a presença de uma substância com atividade similar ao interferon, quando culturas de células do inseto *S. frugiperda* infectadas com o Vírus de Poliedrose Nuclear de *Spodoptera* se tornaram super-resistentes à infecção deste baculovírus (BURAND e cols, 1986). Da mesma forma, em culturas de células de mosquito *A. aegypti* e *A. albopictus* ocorreu supressão do vírus da febre amarela pela indução de interferon. McINTOSH e IGNOFFO (1981), sugerem existir outros inibidores virais com modos de ação diferentes em insetos.

É provável que esse mecanismo possa ter ocorrido em nossos experimentos. Uma vez que avocamos que o vírus inativado sofreu

desnaturação de suas proteínas do corpo de inclusão, e, portanto, manteve íntegro os outros constituintes virais. Podemos inferir, por conseguinte, que as células de *D. saccharalis* reconheceram o virion ainda infectivo do vírus inativo -préviamente inoculado- e produziram um inibidor similar ao interferon que reduziu o desenvolvimento do vírus ativo na segunda exposição.

Podemos ainda aventar que a redução no efeito viral, ocorrido no nosso caso, foi produzido por mecanismos de defesa do inseto hospedeiro e não por processos virais tais como a auto-interferência ou antagonismo homólogo.

Embora a auto-interferência não seja um dos mecanismos de defesa produzido pelas células do inseto, este processo também ocasiona inibição viral. Evidências deste mecanismo ocorreram em células de cultura de mosquito que foram persistentemente infectadas com togavirus, liberando no meio de cultura fatores que interferiram com a replicação do vírus homólogo. Estudos bioquímicos e biofísicos demonstraram que esta substância ou fator inibidor da replicação viral não se tratava de interferon, e sim de uma proteína derivada do próprio cristal viral. BURAND e colaboradores (1986), sugeriram a possibilidade da ocorrência de mecanismos similares a este em baculovirus persistentemente infectando culturas de células de insetos.

Contudo, diante desses dados da literatura deduz-se que provavelmente o processo de auto-interferência não ocorreu em nossos

experimentos. Fomos levados a tal conclusão pelo fato da literatura relatar que a substância ou fator de origem viral é uma proteína derivada do próprio cristal viral. Se assumimos que o vírus inativado previamente inoculado tinha suas proteínas do corpo de inclusão desnaturada, fica evidente a sua incapacidade de produzir qualquer substância que inibiria a infecção do vírus homólogo ativo inoculado cinco dias mais tarde.

Um outro processo que poderia ter ocorrido ainda é a interferência ou antagonismo produzido entre os dois inóculos virais. Todavia, supomos que tal mecanismo também não aconteceu em nossos experimentos. Tal inferência é baseada a partir dos nossos próprios resultados, nos quais se constatou que no controle onde foi inoculado simultaneamente o vírus ativo e o vírus inativo, não houve interferência viral. Essa conclusão pode ser reforçada ainda pelo trabalho de GARCIA CANEDO (1989), que utilizou dois baculovirus testados nesses experimentos. GARCIA CANEDO (1989), estudando tipo de interação entre dois vírus, no controle de seus experimentos verificou que a primeira inoculação viral não prevenia ou evitava a ocorrência do vírus homólogo subsequentemente inoculado três dias mais tarde em larvas de *D. saccharalis*. Esta autora constatou em seus experimentos a ocorrência de um efeito aditivo entre os dois inóculos administrados em larvas de *D. saccharalis*.

Face a esses dados, acreditamos não haver dúvida quanto ao fato das larvas de *D. saccharalis* possuírem mecanismos de defesa que atuaram eficientemente, quando estimulados pela inoculação prévia do

virus inativo, na inibição do segundo inóculo viral. Porém, em virtude da escassa literatura sobre esse tema e a necessidade de maiores estudos no que se refere aos aspectos moleculares envolvidos nos mecanismos de defesa, fica difícil estabelecer qual desses processos descritos tenha de fato ocorrido. Pode-se sugerir que devido a íntima relação entre vírus-hospedeiro, os mecanismos ou processos de defesa atuam sincronicamente na melhor forma de conservação ou preservação do inseto envolvido na competição de sobrevivência com o seu invasor.

5.4. SELEÇÃO GENÉTICA DE VIRUS DE POLIEDROSE NUCLEAR (VPN)

Não obstante, a infectividade da maioria dos VPN ser, de modo geral, restrita a membros do gênero ou da família do hospedeiro original (GRANADOS & WILLIAMS, 1986), verificou-se, neste trabalho, que tanto o VPNAg como o VPNTn, cujos hospedeiros originais são da família *Noctuidae*, foram capazes de infectar e desenvolver-se em *D. saccharalis*, hospedeiro alternativo da família *Pyralidae*.

Segundo revisão feita por GRONER (1986), o VPN do tipo MEV, além de ser mais virulento para seus hospedeiros, possui uma maior gama de hospedeiros do que o tipo SEV. Desta forma, esses dados explicariam em parte o fato de que o VPNTn e o VPNAg, ambos do tipo MEV, serem capazes de se replicar em um hospedeiro alternativo de uma outra família.

Em trabalhos anteriores, o VPNTn após ter sido submetido a onze passagens seriadas, tornou-se cerca de oitocentas vezes mais virulento para as larvas de *D. saccharalis*. Nas nove últimas passagens seriadas testadas neste trabalho, constatou-se, contudo, que não ocorreu qualquer modificação significativa na virulência deste vírus. É muito difícil determinar porque o VPNTn se estabilizou, não continuando o aumento de virulência para as larvas de *D. saccharalis*. Como SHAPIRO & IGNOFFO (1970) e CROIZIER e cols (1985), acreditamos também que o número de passagens seriadas requeridas para estabilização, aparentemente depende do sistema patógeno-hospedeiro em

estudo. Contudo, evidentemente, serão necessários estudos moleculares para evidenciar os mecanismos envolvidos neste processo.

Quando comparado com a geração parental, o isolado F₁₀ do VPNAg apresentou-se com uma dose letal 50 (DL₅₀) 118 vezes menor do que o VPNAgP. Já o isolado F₂₀, quando comparado com o isolado F₁₀ do VPNAg, mostrou-se cerca de 12,6 vezes mais virulento do que este isolado para larvas de *D. saccharalis*. Isto resultou num isolado aproximadamente 1450 vezes mais virulento para as larvas de *D. saccharalis*.

Comparando-se esses dados com experimentos semelhantes aos descritos na literatura, constata-se que os aumentos de virulência relatados, são, de modo geral, de poucas vezes o valor original observado, ou seja, muito inferiores aos observados no caso do VPNAgF₂₀-MEV. Excetuando-se RODRIGUES (1989), dentre os valores descritos na literatura para aumento de virulência de VPNAg após várias passagens seriadas em hospedeiros alternativos, o maior foi o encontrado por TOMPKINS e cols (1981), que relatam um aumento de 10 vezes na capacidade do Virus de Foliedrose Nuclear de *Autographa californica* (VPNAc) infectar larvas de *Trichoplusia ni* após passá-lo 13 vezes por *S. exigua* e 2 por *T.ni*.

RODRIGUES (1989), obteve resultados surpreendentes, quando conseguiu aumentar em cerca de 1000 vezes a virulência do VPNAc, após somente 5 passagens seriadas em lagartas de *D. saccharalis*.

Neste trabalho como no de RODRIGUES (1989), considerou-se como aumento de virulência a redução proporcional da DL₅₀. Embora ambos os trabalhos demonstrarem uma grande alteração deste valor, a verificada por RODRIGUES foi bem mais rápida ao longo das sucessivas passagens do que a constatada neste caso. De acordo com RODRIGUES (1989), apenas entre a segunda e a terceira passagem do VPNAc em *D. saccharalis* ocorreu um redução de quase 130 vezes na DL₅₀.

Uma das possíveis explicações para o aumento substancial na virulência destes patógenos para seus hospedeiros alternativos, é que a partir de uma alta dose inicial do vírus, vai ocorrendo uma seleção efetiva de isolados virais mais infectivos para os hospedeiros durante as passagens seriadas. Essa hipótese já foi ventilada por vários autores (SHAPIRO & IGNOFFO, 1970; STAIRS e cols, 1981; SHAPIRO E cols, 1982). Contudo, no caso específico do isolado F₂₀ do VPNAg, essa explicação fica dificultada pelo fato de que o aumento de virulência foi gradual ao longo das passagens e não abrupto e rápido como se esperaria em caso de uma seleção de um genótipo mais bem adaptado que se desenvolvesse melhor em *D. saccharalis*.

Uma outra explicação mais plausível seria baseada no fato de que a cada passagem seriada no hospedeiro alternativo, pequenas inserções, deleções ou outras mutações fossem sendo introduzidas gradualmente no genoma viral. WOOD e cols (1981), sugeriram que são necessárias apenas sutis mudanças no genoma viral para que ocorra alterações na virulência. Foram descritos vários casos na literatura de alteração do DNA viral após várias passagens seriadas em

hospedeiros alternativos ou mesmo no hospedeiro original (VAIL e cols, 1982; CROIZIER e cols, 1985; McINTOSCH & IGNOFFO, 1986). E, dentro dessa perspectiva existe ainda a possibilidade de que as alterações seriam ocasionadas por DNA do hospedeiro sob a forma de transposon do tipo "copia-like", num mecanismo descrito para esse grupo de vírus por vários autores (BURAND & SUMMERS, 1982; MILLER & MILLER, 1982; FRASER e cols, 1983, 1985; CARTENS, 1987; BEAMES & SUMMERS, 1988).

Procurando correlacionar as alterações funcionais com possíveis modificações bioquímicas foram realizadas eletroforeses em gel de acrilamida/SDS das proteínas virais de isolados selecionados e comparados com as dos isolados originais. Possíveis alterações nos perfis protéicos destes isolados selecionados do VPNAg e do VPNTn poderiam estar correlacionadas com a virulência dos mesmos para *D. saccharalis*.

Na literatura há vários casos relatando diferenças no padrão eletroforético de proteínas quando o vírus foi inoculado em um hospedeiro alternativo (CIBULSKY e cols, 1977a, 1977b; MARUNIAK e cols, 1979; HOTCHKIN, 1981; MASKOS & MILTENBURGUER, 1981; RODRIGUES, 1989). Diversos autores, analisando perfis protéicos, constataram diferenças qualitativas e quantitativas entre o tipo SEV e MEV e entre isolados geográficos de um mesmo VPN (CIBULSKY & HARPER, 1977; CIBULSKY e cols, 1977a, 1977b; MERDAN e cols, 1977; MONROE & McCARTHY, 1984; REINGANUM, 1984). Foram também descritos diferenças na mobilidade eletroforética em sistema de acrilamida e SDS, quando

apenas um aminoácido estava alterado em uma determinada proteína (CARSTENS e cols, 1986).

No entanto, ao contrário do constatado na literatura, a análise dos perfis protéicos dos isolados selecionados do VPNAg e do VPNTn se apresentou idêntico aos dos isolados originais destes respectivos virus, isto é, não ocorreram diferenças no padrão eletroforético das proteínas virais, embora esses patógenos foram inoculados em um hospedeiro alternativo de uma outra família por várias gerações. Esses dados indicam ainda que provavelmente as alterações não se encontram a nível dessas proteínas.

Em relação as proteínas estruturais dos isolados selecionados do VPNAg e do VPNTn, o número de polipeptídeos encontrados e seus pesos moleculares foram muito semelhantes aos descritos na literatura para algumas dessas proteínas (EPPSTEIN & THOMA, 1975; 1977; EPPSTEIN e cols, 1975; SUMMERS & SMITH, 1976; CIBULSKY e cols, 1977a, 1977b; CROIZIER & CROIZIER, 1977; SUMMERS & SMITH, 1978; CAVALLARO, 1988). Porém, deve-se considerar que há variações de estimativa no peso molecular de uma dada proteína de autor para autor. Parece, contudo, que todos os pesquisadores estão em consonância de que essas discrepâncias denotam de técnicas diferentes para obtenção do peso molecular. São muitos os fatores que podem causar diferenças na obtenção dos dados e dentre estes estão: as variações nas concentrações de acrilamida, diferença no tampão da cuba e da amostra, emprego ou não de uréia, o tipo de aparato utilizado (placa ou tubo), tempo de corrida, corrente elétrica, tipo de corante

e reagentes. Segundo MARUNIAK (1986), deve-se também considerar as diferenças nos dados obtidos na eletroforese para a construção da reta e determinação dos pesos moleculares.

Por outro lado, diversos autores observaram que durante ou após várias passagens seriadas de VPN em insetos hospedeiros ocorria uma modificação na forma ou tamanho do cristal desses virus (AIZAWA, 1961; CUNNINGHAM, 1970; HUNTER e cols, 1973; WATANABE e cols, 1975; TOMPKINS e cols, 1981; RODRIGUES, 1989). Esses autores notaram que a alteração na forma do cristal viral não estava relacionado com a variação na virulência destes virus, e, sim, provavelmente por mutações no gene da poliedrina, a semelhança do encontrado por CARSTENS e cols (1986). Já, RODRIGUES (1989) e TOMPKINS e cols (1980), verificaram que o aumento no tamanho dos cristais virais era acompanhado por um aumento no número de virions e nucleocapsídeos, o que explicaria em parte o aumento de virulência do VPNAc obtido por esses autores para os hospedeiros alternativos.

No entanto, ao contrário do observado por aqueles autores, no nosso caso, os poliedros dos isolados selecionados do VPNAg e do VPNTn, não apresentaram qualquer modificação na forma ou tamanho no decorrer das passagens seriadas, como constatado pelo exame das amostras de tecido larval e de suspensão viral ao microscópio de contraste de fase.

Ainda em relação as eventuais modificações que possam ocorrer durante o processo de passagens seriadas de VPN em hospedeiro

alternativo, RODRIGUES (1989) e TOMPKINS e colaboradores (1981), observaram uma redução progressiva na quantidade dos cristais virais pelos respectivos hospedeiros utilizados. RODRIGUES (1989), aventou a possibilidade de ter ocorrido algo semelhante aos mutantes FP (produzem poucos poliedros por célula) ou ainda pela produção de mutantes morfológicos que não produzem corpos de inclusão. Em 1987, CARSTENS e cols, constataram que a incapacidade de formar corpo de inclusão era devido a uma mutação puntual no gene da poliedrina deste mutante morfológico. E, o outro fator que pode impedir também a formação do cristal viral é a ausência ou a alteração de proteínas do envelope viral, visto que, estudos de microscopia eletrônica revelaram que virus submetidos a muitas passagens seriadas em culturas de células de insetos mostram defeitos nos processos de aquisição do envelope viral e de inclusão (WOOD, 1980; MILLER, 1986).

Neste trabalho, em oposição ao constatado por aqueles autores, não foi observado qualquer anormalidade na quantidade da produção de cristais virais durante ou após várias passagens seriadas do VPNAg e do VPNTn em *D. saccharalis*.

Face aos resultados do presente trabalho, constata-se que os virus como sistemas biológicos possuem uma capacidade de adaptação muito grande e que através de método como o de passagem seriada pode-se manipular as características genéticas destes patógenos num prazo muito curto, já que o tempo entre a inoculação e a mortalidade larval produzida por esses baculovirus é da ordem de uma semana.

6. SUMÁRIO E CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, concluiu-se que:

a) Apesar da diferença de origem quanto ao hospedeiro, o VPNAgP, VPNAgF₁₀, VPNTnP, VPNTnF₁₁ e o VGDs, mostraram comportamento biológico muito semelhante em larvas de *D. saccharalis*.

b) Os experimentos **in vitro** de estabilidade térmica do VPNAgP, VPNAgF₁₀, VPNTnP, VPNTnF₁₁ e VGDs, demonstraram que:

Os 5 baculovirus foram completamente inativados em temperaturas de 100°C, 80°C e 70°C, em menos de cinco, dez e trinta minutos respectivamente.

Os 5 virus foram capazes de resistir mantendo a infectividade por 2 horas a temperaturas de 60°C, por 1 dia a 50°C e por até 5 dias a temperaturas de 40°C.

c) Os experimentos **in vivo** dos efeitos de diferentes temperaturas no desenvolvimento da infecção viral com o VPNAgP, VPNAgF₁₀, VPNTnP e VPNTnF₁₁ em larvas de *D. saccharalis*, revelaram que:

Os 4 baculovirus se desenvolveram normalmente na faixa de temperatura de 17°C a 39°C em larvas de *D. saccharalis*.

Para os 4 Virus de Poliedrose Nuclear, a temperatura de 39°C foi onde ocorreu a menor produção viral.

A temperatura ótima foi a de 28°C, onde ocorreu a maior produção viral em *D. saccharalis*, para os 4 virus testados.

Com um aumento de 2°C da temperatura ótima (30°C), o VPNAgP, VPNAgF₁₀, VPNTnP e o VPNTnF₁₁ apresentaram uma redução na produção viral de 461%, 279%, 139% e 192%, respectivamente.

Uma diminuição de 2°C da temperatura ótima (26°C), também causou uma redução na produção viral do VPNAgP, VPNAgF₁₀, VPNTnP e o VPNTnF₁₁, os quais respectivamente mostraram uma redução de 107%, 456%, 121% e 383%.

d) A inoculação prévia dos 5 virus inativados, inibiu parcialmente o desenvolvimento da infecção dos mesmos quando inoculados 5 dias mais tarde em *D. saccharalis*.

e) Na continuação da passagem seriada dos isolados selecionados, VPNAgF₁₀ e VPNTnF₁₁, constatou-se que:

Tanto o VPNAg como o VPNTn foram capazes de infectar e multiplicar-se no hospedeiro alternativo, *D. saccharalis*.

Após vinte passagens seriadas, o isolado F₂₀ do VPNAg mostrou uma redução no valor de DL₅₀ de 1500 vezes para *D. saccharalis*, quando

comparado com o vírus original obtido de larvas de *A. gemmatalis*.

O isolado F₁₁ de VPNTn, o qual mostrou uma redução no valor de DL₅₀ de 800 vezes após 11 passagens seriadas em *D. saccharalis*, quando comparado com o vírus original obtido de larvas de *T. ni*, não mais apresentou alteração a partir da 12^a passagem seriada.

Os poliedros ou cristais do VPNAg e do VPNTn não apresentaram qualquer modificação no decorrer das passagens seriadas, em *D. saccharalis*.

A análise proteica dos isolados selecionados do VPNAg (F₁₀, F₁₅ e F₂₀) não mostrou diferenças quando comparado com o vírus original obtido de larvas de *A. gemmatalis*.

O VPNAgF e os isolados VPNAgF₁₀, VPNAgF₁₅ e VPNAgF₂₀ apresentaram 18 bandas polipeptídicas, cujos pesos moleculares variaram entre 15000 a 92000 daltons.

O VPNTnF e o isolado selecionado VPNTnF₂₀ não apresentaram diferenças quanto a seus polipeptídeos quando analisados em gel de SDS e poliacrilamida.

O VPNTnF e o isolado selecionado VPNTnF₂₀ exibiram 22 bandas polipeptídicas, cujos pesos moleculares variaram de 11000 a 135000 daltons.

Tanto o VPNAg como o VPNTn e os seus isolados apresentaram o mesmo peso molecular de 28000 daltons para a poliedrina.

A passagem seriada em um hospedeiro alternativo é um método eficiente para indução de alterações genéticas nos Virus de Poliedrose Nuclear (VPNs)

7. SUMMARY

Based on the results obtained in the present work we were able to conclude:

a) Despite the different original hosts and different strains the AgNPV, AgNPVF₁₀, TnNPV, TnNPVF₁₁ and DsGV all exhibited the same general infection pattern in *D. saccharalis*, the sugarcane borer.

b) The tests of thermal stability for these virus show that

:

All five baculovirus were completely inactivated when exposed to temperatures of 100°C, 80°C and 70°C in less than five, ten and thirty minutes respectively.

All these virus still retained infectivity for 2 hours when exposed to a temperature of 60°C, for 24 hours at 50°C and up to 5 days at 40°C.

c) The effect of temperature of the virus development in *D. saccharalis* was analysed for the AgNPV, AgNPVF₁₀, TnNPV and TnNPVF₁₁ and showed that:

All four virus were able to develop normally in temperatures ranging from 17°C to 39°C exhibiting development of polyhedra.

The greatest reduction in the number of polyhedra produced was observed at 39°C.

The optimal temperature for polyhedral production was 28°C for all virus.

An increase in the optimal temperature of 2°C (30°C) caused a reduction on the viral production of 461, 279, 139 and 192% for the AgNPV, AgNPVF₁₀, TnNPV and TnNPVF₁₁ respectively.

The viral production at 2°C below the optimal temperature (26°C) also was drastically reduced; this reduction being respectively of 107, 456, 121 and 383% when compared to the production at 28°C.

d) A previous inoculation of the 5 heat-inactivated virus caused a partial inhibition of the infection when active virus was inoculated 5 days after the first treatment in *D. saccharalis*.

e) The continuation of the serial passage on the AgNPVF₁₀ and TnNPVF₁₁ strains resulted in the following observations:

No significant alterations were observed in the infection process and polyhedral formation of either virus.

The F₂₀ strain of AgNPV after 20 passages through *D. saccharalis* showed a 1500 fold reduction in the LD₅₀ value for the *D. saccharalis* larvae, when compared with the original inoculum obtained from

Anticarsia gemmatalis larvae.

The F₁₁ strain of the TnNPV which showed a 800 fold reduction after 11 passages through *D. saccharalis* when compared to the original inoculum obtained from *Trichoplusia ni* showed no alteration on passages 12 through 20 in *D. saccharalis*.

The protein analysis of the selected strains of AgNPV showed no differences when compared to the original inoculum obtained from *A. gemmatalis*.

The SDS-PAGE pattern exhibited 18 polypeptide bands with the molecular weight ranging from 15 to 92 K daltons.

The protein analysis comparing TnNPV and TnNPV_{F20} strain showed identical patterns.

The SDS-PAGE pattern showed 22 polypeptide bands with the molecular weight ranging from 11 to 135 k daltons.

The main protein component of the Nuclear Polyhedrosis Virus, polyhedrin showed for all the strain of both virus the same molecular weight of 28k daltons.

The serial passage in an alternate-host has shown to be an efficient method for inducing directed genetic alterations in these NPVs.

8. BIBLIOGRAFIA

- ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. econ. Ent.*, 18: 265-7. 1925.
- AIZAWA, K. Change in the shape of silkworm polyhedra by means of passage through chick embryo. *Entomophaga.*, 3: 197-201. 1961.
- ALLAWAY, G.P. & PAYNE, C.C. A biochemical and biological comparison of three european isolates of nuclear polyhedrosis viruses from *Agrotis segetum*. *Arch. Viro.*, 75: 43-54, 1983.
- ALLEN, G.E. & KNELL, J.D. A nuclear polyhedrosis virus of *Anticarsia gemmatalis*: Ultrastructure, replication and pathogenicity. *Fla. Ent.*, 60: 233-40. 1977.
- ALMEIDA, L.C.; DEGASPARI, N.; PAVAN, O.H.O.; BOTELHO, P.S.M. & COLETI, J.T. Virus de Granulose da broca de cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*: Avaliação de um bioinseticida em potencial. In: Congresso Nacional da Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil (STAB), 3, São Paulo. 1984. Anais. p. 289-92.
- ALVES, S.B. Epizootia - Fatores climáticos. *Controle Microbiano de Insetos*, Manole ed., São Paulo, 1986a. p.44 - 54.

- ALVES, S.B. Agentes entomopatogênicos no controle microbiano -
Virus entomopatogênicos. **Controle Microbiano de Insetos**, Manole
ed., São Paulo, 1986b. p. 171-87.
- AMIRANTE, G.R. Production of heteroagglutinin in hemocytes of
Leucophora modestae. **Experientia.**, 32: 526 - 8. 1976.
- ASKONAS, B. Porque necessitamos aprender imunologia celular ?
Boletim Biotecnológico, CNPQ - IBICT, nº 21, São Paulo, 1988.
- BARON, S. Mechanism of recovery from viral infection. **Adv. Virus.
Res.**, 17: 39-64. 1970.
- BEAMES, B. & SUMMERS, M.D. Comparison of host cell DNA insertions
and altered transcription at the site of insertions in few
polyhedra baculovirus mutants. **Virology.**, 162: 206-20. 1988.
- BEDFORD, G.O. Control of the rhinoceros beetle by baculovirus. In:
BURGES, H.D., ed. **Microbial Control of Pests and Plants Diseases**.
New York, Academic Press, 1981. p.409-26.
- BENNETT, I.L. & NICASTRI, A. Fever as a mechanism of resistance.
Bact. Rev., 24: 16-34. 1960.
- BENSAUDE, O. & MORANGE, M. Lubiquitine: les cellules font le
ménage. **La Recherche.**, 17: 536-8. 1986.

- BENZ, G.A. Introduction: Historical Perspectives. In: GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B.A., eds. **The Biology of Baculoviruses**. Vol I. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1986. p.1-35.
- BERGOLD, G.H. Uber die kapselvirus krankheit. *Z. Naturf.*, 3: 338-42. 1948.
- BERGOLD, G.H. Viruses of Insects. In: HALLAUER, C. & MEYER, K.F., eds. **Hanbuch der virus for chung**. Viena, Springer, 1958. p. 60-142.
- BETZ, F.S. Registration of baculoviruses as pesticides. In: GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B.A., eds. **The Biology of Baculoviruses**. Vol II. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1986. p. 203-22.
- BIER, D. Imunidade. Melhoramentos., ed. **Bacteriologia e Imunologia**. 1976, São Paulo.
- BILIMORIA, S.L. Taxonomy and identification of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B.A., eds. **The Biology of Baculoviruses**. Vol I. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1986.p. 37-59.
- BLISS, C.I. The calculation of the dosage mortality curve. *Ann. appl. Biol.*, 22: 134-67. 1935a.

- BLISS, C.I. The comparison of dosage mortality data. *Ann. appl. Biol.*, 22: 307-33. 1935b.
- BLOCK, S.S. Desinfection, Sterilization and Preservation. In: LEA, S.D. & FEBIGER, L.A. Filadélfia, 1976.
- BOLETIM TÉCNICO DA PLANALSUCAR. Controle químico da *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar na região Centro Sul do Brasil. 3: 1-16. 1981.
- BONATO, M.M.C. & JULIANI, M.H. Choque hiper-térmico em resposta a acentuadas elevações de temperaturas. *Ciencia Hoje.*, 35: 54-60. 1987.
- BOUCIAS, D.G.; JOHNSON, D.W. & ALLEN, G.E. Effects of host, age, virus dosage, and temperature on the infectivity of a nucleopolyhedrosis virus against velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* larvae. *Environ. Entomol.*, 9: 59-61. 1980.
- BRIESE, D.T. & PODGWAITE, J.D. Development of viral resistance in insect populations. In: MARAMOROSCH, K. & SHERMAN, K.E., eds. *Viral Insecticides for Biological Control*. New York, Academic Press, 1986. p. 361-98.
- BUD, H.M. & KELLY, D.C. The DNA contained by nuclear polyhedrosis viruses isolated from four *Spodoptera spp* (Lepidoptera : Noctuidae) ; genome size and configuration assessed by electron

- microscopy. *J. Gen. Virol.*, 37: 135-43. 1977.
- BULLOCK, H.R. Therapeutic effect of high temperature on tobacco budworms to a cytoplasmic-polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.*, 19: 148-50. 1972.
- BURAND, J.P. & SUMMERS, M.D. Alteration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus DNA upon serial passage in cell culture. *Virology*, 119: 223-9. 1982.
- BURAND, J.P.; WOOD, H.A. & SUMMERS, M.D. Defective particles from a persistent baculovirus infection in *Trichoplusia ni* tissue culture cells. *J. Gen. Virol.*, 64: 391-7. 1983.
- BURAND, J.P.; KAWANISHI, C.Y. & HUANG, Y.S. Persistent baculovirus infections. In: GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B.A., eds. *The Biology of Baculoviruses*. Vol I. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1986. p. 159-76.
- CARBONE, D. & FORTUNA, E. Ability of the silkworm, *Bombyx mori* to acquire resistance against nuclear polyhedrosis virus. *Vet. Microbiol.*, 1: 105-13. 1965.
- CARNER, G.E. & TURNIPSEED, S.G. Potential of a nucleopolyhedrosis virus for control of the velvetbean caterpillar in soybean. *J. econ. Ent.*, 70: 608-10. 1977.

- CARNER, G.E.; HUDSON, J.S. & BARNET, D.W. The infectivity of a nuclear polyhedrosis virus of the velvetbean caterpillar for eight Noctuidae hosts. *J. Invertebr. Pathol.*, 33: 211-6. 1979.
- CARSTENS, E.B. Identification and nucleotide sequences of the regions of *Autographa californica* Nuclear polyhedrosis Virus genome carrying insertion elements derived from *Spodoptera frugiperda*. *Virology.*, 161: 8-17. 1987.
- CARSTENS, E.B.; KREBS, A. & GALLERNEAULT, C.E. Identification of an amino acid essential to the normal assembly of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus polyhedra. *J. Virol.*, 58: 684-8. 1986.
- CARTER, J.B. & GREEN, E.I. Hemocytes of baculovirus infected *Tipula paludosa* larvae (Diptera : Tipulidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 52: 393-400. 1988.
- CAVALLARD, A.C. Método de Purificação do Virus de Granulose de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) e Caracterização de Seu Principal Componente Protéico. *Tese de Mestrado*, IB, UNICAMP, 1988, Campinas, São Paulo.
- CHERRY, C.L. & SUMMERS, M.D. Genotypic variation among wild isolates of two nuclear polyhedrosis viruses isolated from *Spodoptera littoralis*. *J. Invertebr. Pathol.*, 46: 289-95. 1985.

- CIBULSKY, R.J. & HARPER, D.J. Biochemical comparison of polyhedral protein from five nuclear polyhedrosis viruses infecting Plusiinae larvae (Lepidoptera : Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 29: 182-91. 1977.
- CIBULSKY, R.J.; HARPER, D.J. & GUDAUSKAS, R.T. Biochemical comparison of polyhedral viruses infecting Plusiine larvae (Lepidoptera : Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 29: 171-6. 1977a.
- CIBULSKY, R.J.; HARPER, D.J. & GUDAUSKAS, R.T. Biochemical comparison of virion proteins from five nuclear polyhedrosis viruses infecting Plusiine larvae (Lepidoptera : Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 30: 303-13. 1977b.
- COCHRAN, M.A.; BROWN, S.E. & KNUDSON, D.L. Organization and expression of the baculovirus genome. In: GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B.A., eds. *The Biology of Baculoviruses*. Vol I. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1986.p.239-58.
- CONSIGLI, R.A.; TWEETEN, K.A.; ANDERSON, D.K. & BULLA, L.A. Granulosis viruses with emphasis on the GV of the indian meal moth, *Plodia interpunctella*. *Adv. Virus. Res.*, 28: 141-69. 1983.
- CORSO, I.C.; GAZZONI, D.L.; OLIVEIRA, E.B. & GATTI, I.H. Ocorrência de Poliedrose Nuclear em *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1818, na região Sul do Brasil. *Anais. Soc. Ent. Bras.*, 6: 312-4.

1977.

CROIZIER, G. & CROIZIER, L. Evaluation du poids moléculaire de la protéine des corps d'inclusion de divers baculovirus des insectes. *Arch. Virol.*, 55: 247-50. 1977.

CROIZIER, G.; CROIZIER, L.; BIACHE, G. & CHAUFaux, J. Evolution de la composition génétique et du pouvoir infectieux du baculovirus de *Mamestra brassicae* au cours de 25 multiplications successives sur les larves de la noctuelle du chou. *Entomophaga.*, 30: 365-74. 1985.

CROIZIER, G.; QUIOT, J.M.; PARADIS, S. & BOUKHOUDMIAMIRI, K. Comparaison de la composition génétique de trois isolats du baculovirus de la polyhedrose nucléaire du lepidoptère *Spodoptera littoralis*. *Entomophaga.*, 31: 385-92. 1986.

CUNNINGHAM, J.C. Strains of nuclear polyhedrosis viruses displaying different inclusion body shapes. *J. Invertebr. Pathol.*, 16: 299-300. 1970.

DAVID, W.A.L. The status of viruses pathogenic for insect and mites. *Ann. Rev. Entomol.*, 20: 97-117. 1975.

DAVID, W.A.L. & GARDINER, B.O.C. The effect of heat, cold, and prolonged storage on a Granulosis Virus of *Pieris brassicae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 9: 555-62. 1967.

- DAY, F.M. & DUDZINSKI, M.L. The effect of temperature on the development of *Sericesthis* Iridescent Virus. **Aust. J. Biol. Sci.**, 19: 481-93. 1966.
- DEGASPARI, N; BOTELHO, P.S.M. & MACEDO, N. Controle químico da *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar na região Centro Sul do Brasil. **Bol. Tec. IAA/PLANALSUCAR.**, 3: 1-16. 1981.
- EPPSTEIN, D.A. & THOMA, J.A. Alkaline protease associated with the matrix protein of a virus infecting the cabbage looper. **Bioch. biophys. Res. Commun.**, 62: 478-84. 1975.
- EPPSTEIN, D.A.; THOMA, J.A. Characterization and serology of the matrix protein from nuclear polyhedrosis virus of *Trichoplusia ni* before and after degradation by an endogenous proteinase. **Biochem. J.**, 167: 321-32. 1977.
- EPPSTEIN, D.A. & THOMA, J.A.; SCOTT, H.A. & YOUNG III, S.Y. Degradation of matrix protein from a nuclear polyhedrosis virus of *Trichoplusia ni* by endogenous protease. **Virology.**, 67: 591-4. 1975.
- EVANS, H.F. Ecology and epizootiology of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B.A., eds. **The Biology of Baculoviruses**. Vol II. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1986. p.89-132.

- FAULKNER, P. & HENDERSON, J.F. Serial passage of a nuclear polyhedrosis virus of the cabbage looper in a continuous tissue culture cell line. *Virology.*, 50: 920-4. 1972.
- FEDERICI, B.A. Ultrastructure of Baculoviruses. In: GRANADOS, R. R. & FEDERICI, B.A., eds. *The Biology of Baculoviruses*. Vol I. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1986. p.61-88.
- FEEMERS, V.M. Untersuchungen über ein kernolytisches Virus aus *Yponomeuta evonymellus* und seine Wirkung auf verschiedene *Yponomeuta* Arten. *J. Appl. Ent.*, 101: 425-44. 1986.
- FINNEY, J.D. Probit Analysis. Cambridge University, London, 1947.
- FRASER, M.J. & HINK, W.F. The isolation and characterization of the MP and FP plaque variants of *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis virus. *Virology.*, 117: 366-9. 1983.
- FRASER, M.J.; SMITH, G.E. & SUMMERS, M.D. Acquisition of host cell DNA sequences by baculoviruses: relationship between host DNA insertions and FP mutants of *Autographa californica* and *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis viruses. *J. Virol.*, 47: 287-300. 1983.
- FRASER, M.J.; BRUSCA, J.S.; SMITH, G.E. & SUMMERS, M.D. Transposon mediated mutagenesis of a baculovirus. *Virology.*, 145: 356-61. 1985.

- GARCIA-CANEDO, A.M.G. Infecção mista em *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera : Pyralidae) com 2 baculovirus. Tese de Mestrado, IB, UNICAMP, 1989, Campinas, São Paulo.
- GATTI, I.M.; SILVA, D.M. & CORSO, I.C. Polyhedrosis occurrence in caterpillar of *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) in the south of Brasil. *Infect. Dis.*, 5: 136. 1977.
- GETTING, R.R. & MCCARTHY, W.J. Genotypic variation among wild isolates of *Heliothis* spp. Nuclear polyhedrosis viruses from different geographical regions. *Virology*, 117: 245-52. 1982.
- GOLDENBERG, P.Z.; VEY, A. & GREENBERG, A.H. Functional heterogeneity carbohydrate-binding hemolymph proteins: evidence of a non-agglutinating opsenin in *Homarus americanus*. *J. Invertebr. Pathol.*, 42: 33-41. 1983.
- GRANADOS, R.R. & WILLIAMS, K.A. In vivo infection and replication of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R. & FREDERICI, B.A., eds. **The biology of Baculoviruses**. vol I. Boca Raton, Florida, CRC Press. p.89-108, 1986.
- GRONER, A. Specificity and safety of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R. & FREDERICI, B.A., eds. **The biology of Baculoviruses**. vol I. Boca Raton, Florida, CRC Press. p. 177-202, 1986.

- GUDAUSKAS, R.T. & CONNERDAY, D. The effect of heat, buffer salt and H-ion concentration, and ultraviolet light on the infectivity of *Heliothis* and *Trichoplusia* nuclear polyhedrosis viruses. *J. Invertebr. Pathol.*, 12: 405-11. 1968.
- HARNDEN, M.R. Les médicaments antiviraux. *La Recherche*, 195, 19: 30-41. 1988.
- HARPAZ, I. & RACCAH, B. Nucleopolyhedrosis virus (NPV) of the egyptian cottonworm, *Spodoptera littoralis* (Lep.:Noctuidae): Temperature and pH relations, host range and synergism. *J. Invertebr. Pathol.*, 32: 368-72. 1978.
- HARPER, J.D. Interactions between baculoviruses and other entomopathogens, chemical pesticides, and parasitoids. In: GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B.A., eds. *The biology of Baculoviruses*. Vol II. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1986. p.133-56.
- HARPER, J.M.M.; PARSONAGE, M.T.; PELHAM, H.R.B. & DARBY, G. Heat inactivation of vaccinia virus-particle associated functions: Properties of heated particles in vivo and in vitro. *J.Virol.*, 26: 646-59. 1978.
- HARRAP, K.A.; PAYNE, C.C. & ROBERTSON, J.S. The properties of three baculoviruses from closely related hosts. *Virology.*, 79: 14-31. 1977.

- HEIMPEL, A.M. & ADAMS, J.R. A new polyhedrosis virus of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *J. Invertebr. Pathol.*, 8: 340-6. 1966.
- HENSLEY, S.D. & HAMMOND, J.R.A.M. Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. *J. econ. Entomol.*, 61: 1742-4. 1968.
- HILDEMAN, W.H. Some new concepts in immunological phylogeny. *Nature.*, 250: 116-20. 1974.
- HIRUMI, H.; HIRUMI, K. & McINTOSH, A.H. Morphogenesis of a nuclear polyhedrosis virus of the alfalfa looper cell line. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 266: 302-26. 1975.
- HOSTETTER, D.L. & BELL, M.R. natural dispersal of baculoviruses in the environment. In: MARAMOROSCH, K. & SHERMAN, K.E., eds. *Viral Insecticides for Biological Control*. New York, Academic Press, 1985. p. 249-84.
- HOTCHKIN, P.G. Comparison of virion proteins and granulin from a granulosis virus produced in two host species. *J. Invertebr. Pathol.*, 38: 303-4. 1981.
- HUBER, J. Use of baculoviruses in pest management programs. In: GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B.A., eds. *The Biology of Baculoviruses*. Vol. II. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1986.

p.181-202.

HUGHES, P.R.; GETTING, R.R. & McCARTHY, W.J. Comparison of the time-mortality response of *Heliothis zea* nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.*, 41: 256-61. 1983.

HUNTER, D.K.; HOFFMAN, D.F. & COLLIER, S.J. Crossinfection of a nuclear polyhedrosis virus of the almond moth to the indian meal moth. *J. Invertebr. Pathol.*, 22: 231-7. 1973.

IGNOFFO, C.M. Effects of temperature on mortality of *Heliothis zea* larvae exposed to sublethal doses of a nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.*, 9: 290-5. 1967.

IGNOFFO, C.M. & McINTOSH, A.H. Low temperature stability of baculovirus virions from tissue culture and from inclusion bodies. *J. Invertebr. Pathol.*, 51: 304-6. 1988.

INDUE, H. & TANADA, Y. Thermal therapy of the flacherie virus disease in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Invertebr. Pathol.*, 29: 63-9. 1977.

ISAACS, A. & LINDENMANN, J. Virus Interference. I. "Interferon". *Proc. Royal. Soc. Ser.*, 174: 258-63. 1957.

JAKUES, R.P. Stability of entomopathogenic viruses. *Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.*, 10: 99-103. 1977.

- JAGUES, R.P. Stability of insect viruses in the environment. In: MARAMORDSCH, K. & SHERMAN, K.E., eds. **Viral Insecticides for Biological Control**. New York, Academic Press, 1985. p. 285-361.
- JENNER, E. An inquiry into the causes and effects of the variole vaccina, a disease discovered in some of the western countries of England, particularly Gloucesterhire, and known by the name of cowpox. **Army Medical Library**, 4232. 1798.
- JOHNSON, D.W.; BOUCIAS, D.B.; BARFIELD, C.S. & ALLEN, G.E. A temperature-dependent development model for a nucleopolyhedrosis virus of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera : Noctuidae). **J. Invertebr. Pathol.**, 40: 292-8. 1982.
- KAWASE, S. Pathology associated with densovirus. In: MARAMORDSCH, K. & SHERMAN, K.E., eds. **Viral Insecticides for Biological Control**. New York, Academic Press, 1985. p.197-232.
- KELLY, D.C. The DNA contained by nuclear polyhedrosis viruses isolated from four *Spodoptera sp* (Lepidoptera : Noctuidae): Genome size and homology assessed by DNA reassociation kinetics. **Virology**, 76: 468-71. 1977.
- KELLY, D.C. Suppression of baculovirus and iridescent virus replication in dually infected cells. **Microbiologica**, 4: 35-57.

1981.

- KINSINGER, R.A. & McGAUGHEY, W.H. Stability of *Bacillus thuringiensis* and a granulosis virus of *Plodia interpunctella* on stored wheat. *J. econ. Entomol.*, 69: 149-54. 1976.
- KIRSCHBAUM, J.B. Potential implication of genetic engineering and other biotechnologies to insect control. *Ann. Rev. Entomol.*, 30: 51-70. 1985.
- KISLEV, N. & EDELMAN, M. DNA restriction pattern differences from geographic isolates of *Spodoptera littoralis* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 119: 219-22. 1982.
- KLIBANOV, A.M. & AHERN, T.J. Thermal stability of proteins. In: LISS, A.R., ed. *Protein Engineering*. New York, Academic Press, 1987. p. 213-8.
- KNUDSON, D.L. & TINSLEY, T.W. Replication of a nuclear polyhedrosis virus in a continuous cell line of *Spodoptera frugiperda*: Partial characterization of the viral DNA, comparative DNA-DNA hybridization, and patterns of DNA synthesis. *Virology*, 87: 42-57. 1978.
- KOBAYASHI, M. & KAWASE, S. Absence of detectable accumulation of cytoplasmic polyhedrosis viral RNA in the silkworm, *Bombyx mori*, reared at a supraoptimal temperature. *J. Invertebr. Pathol.*, 35:

96-8. 1980.

KOBAYASHI, M.; INAGAKI, S. & KAWASE, S. Effect of high temperature on the development of nuclear polyhedrosis virus in the silkworm, *Bombyx mori*. J. Invertebr. Pathol., 38: 386-94. 1981.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature., 227: 680-5. 1970.

LATHIKA, P. & JACOB, A. Effect of temperature on the infectivity of a nuclear polyhedrosis virus of *Spodoptera mauritia*. Curr. Sci., 43: 587-8. 1974.

LEE, C.H. & SCHLOEMER, R.H. Mosquito cells infected with Banzi virus secrete an antiviral activity which is of viral origin. Virology., 110: 402-10. 1981.

LOWE, R.E. & PASCHKE, J.D. Simultaneous infection with the nucleopolyhedrosis and granulosis viruses of *Trichoplusia ni*. J. Invertebr. Pathol., 12: 86-92. 1968.

MALEKI-MILANI, H. Influence de passages repetes du virus de la polyhedrose nucleaire de *Autographa californica* chez *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera : Noctuidae). Entomophaga., 23: 217-24. 1978.

- MARTIGNONI, M.E. & IWAI, P.J. Thermal inactivation characteristics of two strains of nucleopolyhedrosis virus pathogenic for *Orgyia pseudotsugata*. *J. Invertebr. Pathol.*, 30: 255-62. 1977.
- MARUNIAK, J.E. Baculovirus structural proteins and protein synthesis. In: GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B.A., eds. *The Biology of Baculoviruses*. Vol I. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1986. p. 129-46.
- MARUNIAK, J.E.; SUMMERS, M.D.; FALCON, L.A. & SMITH, G.E. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus structural proteins compared from in vivo and in vitro sources. *Intervirology*, 11: 82-5. 1979.
- MASKOS, C.B. & MILTENBURGER, H.G. SDS-PAGE comparative studies on the polyhedral and viral polypeptides of the nuclear polyhedrosis viruses of *Mamestra brassicae*, *Autographa californica* and *Lymantria dispar*. *J. Invertebr. Pathol.*, 37:174-80. 1981.
- MATTA, H.C.S.; CAVALLARO, A.C.; PAVAN, O.H.O. & ALMEIDA, L.C. Efeito de passagem seriada de dois baculovirus. **VIII Congresso Brasileiro de Entomologia**, Brasilia, DF, p.259. 1983.
- MATTHEWS, R.E.F. Viral taxonomy for the nonvirologist. *Ann. Rev. Microbiol.*, 39: 451-74. 1985.

- MATTHEWS, T. & BOLOGNESI, D.P. Aids Vaccines. **Scientific American.**, 259: 98-106. 1988.
- MAZZONE, H.M. Pathology associated with baculovirus infection. In: MARAMOROSCH, K. & SHERMAN, K.E., eds. **Viral Insecticide for Biological Control**. New York, Academic Press, 1985. p.81-120.
- McCARTHY, W.J. & LIU, S.Y. Electrophoretic and serological characterization of *Forthetria dispar* polyhedron protein. **J. Invertebr. Pathol.**, 28: 57-65. 1976.
- McINTOSH, A.H. & IGNOFFO, C.M. Establishment of a persistent infection in a lepdoteran cell line. **J. Invertebr. Pathol.**, 38: 395-7. 1981.
- McINTOSH, A.H. & IGNOFFO, C.M. Restriction endonuclease cleavage patterns of commercial and serially passaged isolates of *Heliothis* baculovirus. **Intervirology.**, 25: 172-6. 1986.
- McKINNON, E.A.; HENDERSON, J.F.; STOLTZ, D.D. & FAULKNER, P. Morphogenesis of nuclear polyhedrosis virus under conditions of prolonged passage in vitro. **J. Ultrastruct. Res.**, 49: 419-35. 1974.
- MENEZES, H. Estudo sobre a participação dos hemócitos de *Bombyx mori*, nos mecanismos de defesa contra agentes estranhos. **Tese de Doutorado, USP, São Paulo, 1984. 81p.**

- MERDAN, A.; CROIZIER, L.; VEYRUNES, J.C. & CROIZIER, G. Etude comparée des porteines des polyédres et des virions de trois isolats de baculovirus de *Spodoptera littoralis*. *Entomophaga.*, 22: 413-20. 1977.
- MILLER, L.K. The genetics of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B.A., eds. **The Biology of Baculoviruses**. Vol.I. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1986. p. 217-39.
- MILLER, D.W. & MILLER, L.K. A virus mutant with an insertion of a copia-like transposable element. *Nature*. 299:562-4. 1982.
- MONROE, J.E. & McCARTHY, W.J. Polipeptide analysis of genotypic variants of occluded *Heliothis* spp. baculoviruses. *J. Invertebr. Pathol.*, 43: 32-40. 1984.
- MORRIS, O.N. The effect of sunlight, ultraviolet and gamma radiations and temperature on the infectivity of nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.*, 18: 292-4. 1971.
- ORLOVSKAYA, E.V. Adaptation des virus de la polyhedrose nucléaire à d'autres hôtes étrangers. *Trudy. Vsees. Nautsh. Issled. Inst. Zashch. Rast.*, 42: 45- 54. 1975.
- PASTEUR, L.; JOUBERT, R. & CHAMBERLAND, D. Sur le charbon des poules. *Compt. Rend.*, 87: 47-74. 1878.

- PAVAN, O.H.O. O Virus de granulose de *Diatraea saccharalis* Fabricius (broca de cana-de-açúcar). *Saccharum.*, 25: 27-9. 1983.
- PAVAN, O.H.O. Biologia Molecular de Baculovirus. **IX Congresso de Entomologia.**, Fundação Cargill, Rio de Janeiro, 1988. p. 107-15.
- PAVAN, O.H.O. & BOUCIAS, D.G. Virus de Poliedrose Nuclear de *Anticarsia gemmatalis* : Métodos de inoculação e especificidade. **Seminário Nacional de Pesquisa de Soja**, Brasilia,DF, 1981. p. 191-7.
- PAVAN, O.H.O. & RIBEIRO, H.C.T. Biological control of sugarcane borer *Diatraea saccharalis* with a virus insecticide in Brazil. **I Simpósio Nacional de Controle Biológico de Pragas e Vetores (1º SINCOBIOL)**, Rio de Janeiro, 1988. p.9.
- PAVAN, O.H.O.; BOUCIAS, D.G. & FENDLAND, J.C. The effects of serial passage of a nucleopolyhedrosis virus through an alternate host system. *Entomophaga.*, 26: 99-108. 1981.
- PAVAN, O.H.O.; BOUCIAS, D.G.; ALMEIDA, L.C.; GASPAR, J.O.; BOTELHO, P.S. M. & DEGASPARI, N. A granulosis virus of *Diatraea saccharalis* Fabr. I. Pathogenicity, replication and ultrastructure. **International Congress ISSCT**, Havana, 1983, 18: 644-59.
- PAVAN, O.H.O.; RIBEIRO, H.C.T. & MACEDO, N. Seleção genética de baculovirus com alteração de virulência. **I Congresso de**

Biotecnologia - ABRAPI, Rio de Janeiro, 1988.p.23.

PAWAR, V.M. & RAMAKRISHNAM, N. Investigations on the nuclear polyhedrosis of *Prodenia litura*. II. Effect of surface disinfectants temperature and alkalies on the virus. **Indian J. Entomol.**, 33: 428-32. 1971.

PAYNE, C.C. Insect viruses as control agents. **Parasitology.**, 84: 35-77. 1982.

PELCZAR, M.; REID, R. & CHAN, E.S.C. Virus: características gerais. **Microbiologia**, Vol I. McGRAW-HILL.,ed. 1981, São Paulo. p. 417-36.

RAHEJA, A.K. & BROOKS, M.A. Inability of the forest tent caterpillar, *Malacosoma disstria* to acquire resistance to viral infection. **J. Invertebr. Pathol.**, 17: 136-7. 1971.

REIDEL, B. & BROWN, D.T. Role of extracellular virus in the maintenance of the persistent infection induced in *Aedes albopictus* cells by Sindbis virus. **J. Virol.**, 23: 554-61. 1977.

REIDEL, B. & BROWN, D.T. Novel antiviral activity found in the medium of Sindbis virus persistently infected mosquito *Aedes albopictus* cell cultures. **J.Virol.**, 29: 51-60. 1979.

- REIGANUM, C. Polyacrilamide gel electrophoresis of baculovirus proteins: a simplified and sensitive modification for differentiating between isolates. **J. Invertebr. Pathol.**, 44: 134-9. 1984.
- RIBEIRO, H.C.T. Seleção genética e interação de baculovirus em *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794). **Tese de Mestrado**, IB, UNICAMP, 1985, Campinas, São Paulo.
- RIBEIRO, H.C.T. & PAVAN, O.H.O. Baculovirose de *Diatraea saccharalis*. **I Encontro de Pós-Graduação em Ciências Biológicas**, UNICAMP, 1984, Campinas, São Paulo.
- RIBEIRO, H.C.T. & PAVAN, O.H.O. Seleção genética de dois baculovirus. **II Encontro de Pós-Graduação em Ciências Biológicas**, UNICAMP, 1985a, Campinas, São Paulo.
- RIBEIRO, H.C.T. & PAVAN, O.H.O. Inativação térmica de baculovirus. **II Encontro de Pós-Graduação em Ciências Biológicas**, UNICAMP, 1985b, Campinas, São Paulo.
- RIBEIRO, H.C.T.; PAVAN, O.H.O. & ALMEIDA, L.C. Seleção genética de dois baculovirus. **Anais da XIII Reunião Anual de Genética de Microorganismos, Soc. Bras. Genética.**, 1986, Ribeirão Preto, São Paulo, p.82.

- RODRIGUES, J.J.S. Seleção genética do Virus de Poliedrose Nuclear de *Autographa californica* (Baculoviridae) em *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera : Pyralidae). Tese de Mestrado, IB, UNICAMP, 1989, Campinas , São Paulo.
- ROHRMANN, G.F. Evolution of occluded baculoviruses. In: GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B.A., eds. **The Biology of Baculoviruses**. Vol I. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1986.p.203-16.
- ROWLEY, A.F. & RATCLIFFE, N.A. An ultrastructural and cytochemical study of the interaction between latex particles and the haemocytes on the wax-moth, *Galleria mellonella* in vitro. **Cell. Tissue. Res.**, 199: 124-37. 1979.
- SAID, A. & SIKOROWSKI, P.P. Effects on sunlight, cotton foliage surface and temperature on the infectivity of cytoplasmic polyhedrosis virus to *Heliothis virescens* larvae. **J. econ. Entomol.**, 79: 364-7. 1986.
- SALAMA, H.S.; MOAWED, S.M. & MEGAHED, M.I. Effect of nuclear polyhedrosis virus on the cabbage worm, *Heliothis armigera*. **J. Appl. Ent.**, 102: 123-30. 1986.
- SHAPIRO, M. In vivo production of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B.A., eds. **The Biology of Baculoviruses**. Vol II. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1986.p.31-62.

- SHAPIRO, M. & IGNOFFO, C.M. Nuclear-polyhedrosis of *Heliothis*: stability and relative infectivity of virions. *J. Invertebr. Pathol.*, 14: 130-34. 1969.
- SHAPIRO, M. & IGNOFFO, C.M. Nucleopolyhedrosis of *Heliothis*. Activity of isolates from *Heliothis zea*. *J. Invertebr. Pathol.*, 16: 107-11. 1970.
- SHAPIRO, M.; MARTIGNONI, M.E. & CUNNINGHAM, J.C. Potential use of the saltmarsh caterpillar as a production host for nucleopolyhedrosis viruses. *J. econ. Entomol.*, 75: 69-71. 1982.
- SHERMAN, K.E. Multiple virus interactions. In: MARAMOROSCH, K. & SHERMAN, K.E., eds. *Viral Insecticides for Biological Control*. New York, Academic Press, 1985a. p.736-49.
- SHERMAN, K.E. Considerations in the large-scale and commercial production of viral insecticides. In: MARAMOROSCH, K. & SHERMAN, K.E., eds. *Viral Insecticides for Biological Control*. New York, Academic Press, 1985b . p. 31-62.
- SHVETSOVA, O.I. & TSAI, H. Virus disease of *Agrotis segetum* and *Hadena sordida* under conditions of simultaneous infection with granulosis and polyhedral disease. *Entomol. Rev.*, 41: 486-9. 1962.
- SIDEN, I. Studies on bacteria resistant and susceptible to humoral immunity in insects. *Doctoral Thesis*, University of Stockholm,

1983, Sweden.

SMIRNOFF, W.A. Adaptation of a nuclear polyhedrosis virus of *Trichiocampus viminalis* to larvae of *Trichiocampus irregularis* Dyar. *J. Insect. Pathol.*, 5: 104-10. 1963.

SMITH, K.M. Virus Insect relationship. Logman, Londres, 1976. p.291.

SMITH, K.M. & SUMMERS, M.D. Analysis of baculoviruses genomes with restriction endonuclease. *Virology.*, 89: 517-27. 1978.

SMITH, K.M.; HILLS, G.J. & RIVERS, C.F. Studies on the cross inoculation of the *Tipula* Iridescent Virus. *Virology.*, 13: 233-41. 1961.

SOHI, S.S. & CUNNINGHAM, J.C. Replication of a nuclear polyhedrosis virus in serially transferred insect hemocyte cultures. *J. Invertebr. Pathol.*, 19: 51-61. 1972.

STAIRS, G.R. Inclusion-type insect viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 42: 1-43. 1968.

STAIRS, G.R. Effects of a wide range temperature on the development of *Galleria mellonella* and its specific baculovirus. *Environ. Entomol.*, 7: 297-99. 1978.

- STAIRS, G.R. & MILLIGAN, S.E. Effects of heat on nonoccluded nuclear polyhedrosis virus from *Galleria mellonella* larvae. *Environ. Entomol.*, 8: 756-9. 1979.
- STAIRS, G.R.; FRASER, T. & FRASER, M. Change in growth and virulence of a nuclear polyhedrosis virus from *Choristoneura fumiferana* after passage in *Trichoplusia ni* and *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.*, 38: 230-5. 1981.
- STEINHAUS, E.A. The duration of viability and infectivity of certain insect pathogens. *J. Insect. Pathol.*, 2: 225-9. 1960.
- STEINHAUS, E.A. & DINEEN, J.P. Observations on the role of stress in a granulosis of the variagated cutworm. *J. Insect. Pathol.*, 2: 55-65. 1960.
- STEINHAUS, E.A. & MARSH, G.A. Report of diagnosis of diseased insects. *Hilgardia.*, 33: 349-90. 1962.
- STUERMER, C.W. & BULLOCK, H.R. Thermal inactivation of *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* 12: 473-4. 1968.
- SUMMERS, M.D. & SMITH, G.E. Comparative studies of baculovirus granulins and polyhedrins. *Intervirology.*, 6: 168-80. 1976.
- SUMMERS, M.D. & SMITH, G.E. Baculovirus structural polypeptides. *Virology.*, 84: 390-402. 1978.

- TANADA, Y. Description and characteristics of a granulosis virus of the imported cabbage worm. *Proc. Hawaiian Entomol. Soc.*, 15: 235-60. 1953.
- TANADA, Y. Descriptions and characteristics of an nuclear polyhedrosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Insect. Pathol.*, 1: 197-214. 1959.
- TANADA, Y. Effect of high temperatures on the resistance of insects to infectious diseases. *J. Seric. Sci. Japan.*, 36: 333-40. 1967.
- TANADA, Y. & CHANG, G.Y. Resistance of the alfalfa caterpillar, *Colias eurytheme*, at high temperatures to a cytoplasmic-polyhedrosis virus and thermal inactivation point of the virus. *J. Invertebr. Pathol.*, 10: 79-83. 1968.
- TER MEULEN, V. & MARTIN, S.J. Genesis and maintenance of a persistent infection by canine distemper virus. *J. Gen. Virol.*, 32: 431-40. 1976.
- TOMPKINS, J.G.; VAUGHN, J.L.; ADAMS, J.R. & REICHELDERFER, C.P. Effects of propagating *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus and its *Trichoplusia ni* variant in different hosts. *Environ. Entomol.*, 10: 801-6. 1981.

- TOMPKINS, J.G.; DOUGHERTY, E.M.; ADAMS, J.R. & DIGGS, D. Changes in the virulence of nuclear polyhedrosis viruses when propagated in alternate Noctuid cell lines and host. *J.Econ. Entomol.*, 81: 1027-33. 1988.
- TREVAN, J.W. The error of determination of toxicity. *Proc.Res. Soc.*, 101: 433-514. 1927.
- TWEETEN, K.A.; BULLA, L.A. & CONSIGLI, R.A. Applied and molecular aspects of insect granulosis viruses. *Microbiol. Reviews.*, 45: 379-408. 1981.
- VAIL, P.V.; JAY, D.L. & HINK, W.F. Replication and infectivity of the nuclear polyhedrosis virus of the alfalfa looper, *Autographa californica* produced in cells grown in vitro. *J. Invertebr. Pathol.*, 23: 231-7. 1973.
- VAIL, P.V.; KNELL, J.D.; SUMMERS, M.D. & COWAN, D.K. In vivo infectivity of baculovirus isolates, variants, and natural recombinants in alternate hosts. *Environ. Entomol.*, 11: 1187-92. 1982.
- VEBER, J. Virulence of an insect virus increased by repeated passages. *Colloq. Int. Pathol.*, 2: 403-5. 1962.
- VLAK, J.M. & GRONER, A. Identification of two nuclear polyhedrosis viruses from the cabbage moth, *Mamestra brassicae*. *J.*

Invertebr. Pathol., 35: 269-78. 1980.

VOLKMAN, L.E. & KNUDSON, D.L. In vitro replication of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B.A., eds. **The Biology of Baculoviruses**. Vol I. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1986. p. 109-28.

WATANABE, H. & TANADA, Y. Infection of a nuclear polyhedrosis virus in armyworm *Pseudaletia unipuncta* reared at high temperature. **Appl. Entomol. Zool.**, 7: 43-6. 1972.

WATANABE, H. & MAEDA, S. Multiplication of a densovirus in the silkworm, *Bombyx mori* reared at high temperature. **J. Appl. Entomol. Zool.**, 23: 151-5. 1979.

WATANABE, H.; ARATAKE, Y. & KAYAMURA, T. Serial passage of a nuclear polyhedrosis virus of the silkworm, *Bombyx mori* in larvae of rice stem borer, *Chilo suppressalis*. **J. Invertebr. Pathol.**, 25: 11-27. 1975.

WEISS, S.A. & VAUGHN, J.L. Cell culture methods for large scale propagation of baculovirus. In: GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B. A., eds. **The Biology of Baculoviruses**. Vol II. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1986. p. 63-85.

WEISS S.A.; SMITH, G.C.; KALTER, S.S.; VAUGHN, J.L. & DOUGHERTY, E.

- Improved replication of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in roller bottles: characterization of the progeny virus. *Intervirology*, 15: 213-22. 1981.
- WITT, D.J. & STAIRS, G.R. Effects of different temperatures on Tipula Iridescent Virus infection in *Galleria mellonella* larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 28: 151-2. 1976.
- WOOD, H.A. Isolation and replication of an occlusion body-deficient mutant of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 105: 338-44. 1980.
- WOOD, H.A.; HUGHES, P.R.; JOHNSTON, L.B. & LANGRIDGE, W.H.R. Increased virulence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by mutagenesis. *J. Invertebr. Pathol.*, 38: 236-41. 1981.
- YADAVA, R.L. Studien über den einfluss von wasserglassund borsaure cels chemische stressoren für die kunstlich applizierte kern und die latente cytoplasmapolyedrose der nonne, nit einer ammerkung über die genenseitige beeinflussung beider krankheiten. *Z. Angew. Entomol.*, 65: 175-9. 1970.
- YAMADA, K.I.; SHERMAN, K.E. & MARAMOROSCH, K. Serial passage of *Heliothis zea* singly embedded nuclear polyhedrosis virus in a homologous cell line. *J. Invertebr. Pathol.*, 39: 185-91. 1982.

- YAMAGUCHI, K. Natural recovery of the fall webworm *Hypantria cunea*, to infection by a cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Invertebr. Pathol.*, 33: 126-8. 1979.
- YARCHOAN, R.; MITSUYA, H. & BRODER, R. Aids therapies. *Scientific American.*, 259: 88-98. 1988.
- YOUNG III, S.Y. & YEARIAN, W.C. Formulation and application of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B.A., eds. *The Biology of Baculoviruses*. Vol II. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1986. p.157-80.

9. ANEXOS

ANEXO 1 - Composição das soluções estoques para preparo dos géis de empacotamento e de corrida ou de resolução - gel simples - (poliacrilamida + SDS).

SOLUÇÃO A

Tris	36,3 g	
HCl 1M	48,0 ml	pH 8,9
H ₂ O q.s.p	100,0 ml	

SOLUÇÃO B

Tris	0,6 g	
HCl 1M	48,0 ml	pH 6,8
H ₂ O q.s.p	100,0 ml	

SOLUÇÃO C

Acrilamida	15,0 g	
Bis-Acrilamida	0,4 g	
H ₂ O q.s.p	50,0 ml	

SOLUÇÃO D

Acrilamida	7,2 g
Bis-Acrilamida	0,4 g
H ₂ O q.s.p	50,0 ml

SOLUÇÃO E

Persulfato de amônio	0,10 g
H ₂ O q.s.p	25,0 ml

SOLUÇÃO F

SDS	10,0 g
H ₂ O q.s.p	100,0 ml

SOLUÇÃO G

Temed	10 µl
-------	-------

ANEXO 2 - Composição das soluções estoques para preparo dos géis de empacotamento e resolução - gel gradiente - (poliacrilamida + SDS).

SOLUÇÃO A

Tris	36,3 g	
HCl 1M	48,0 ml	pH 8,9
H ₂ O q.s.p	100,0 ml	

SOLUÇÃO B

Tris	0,6 g	
HCl 1M	48,0 ml	pH 6,8
H ₂ O q.s.p	100,0 ml	

SOLUÇÃO C

Acrilamida	30,0 g	
Bis-Acrilamida	0,8 g	
H ₂ O q.s.p	100,0 ml	

SOLUÇÃO D

Acrilamida	30,0 g	
Bis-Acrilamida	0,8 g	
H ₂ O q.s.p	100,0 ml	

SOLUÇÃO E

SDS	10,0 g
H ₂ O q.s.p	100,0 ml

SOLUÇÃO F

Glicerol	1,25 ml
----------	---------

SOLUÇÃO G

Temed	0,29 ml
-------	---------

ANEXO 3 - Composição do tampão da cuba e da amostra.

TAMPÃO DA AMOSTRA

Mercaptoetanol	1,0 ml
SDS 20%	4,0 ml
Bromofenol azul	20,0 mg
Glicerol	2,0 ml
Tris-HCl	0,3 g
H ₂ O q.s.p	10,0 ml

TAMPÃO DA CUBA

SDS	10,0 g
Tris	12,0 g
Glicina	57,6 g
H ₂ O q.s.p	1000 ml

Esta solução estoque de tampão deve ser diluída 1:1 para ser utilizada. O tampão da cuba no reservatório inferior deve-se retirar o SDS, para melhor resolução da corrida da eletroforese.

ANEXO 4 - Composição e preparo do padrão de peso molecular.

Padrões para peso molecular - SDS/ Dalton VI / SIGMA

Albumina Bovina	66.000 daltons
Albumina de ovo	45.000 daltons
Pepsina	34.700 daltons
Tripsinogênio	24.000 daltons
B - Lactoglobulina	18.400 daltons
Lisozima	14.300 daltons

O padrão de peso molecular foi preparado utilizando-se 10 microlitros (μ l) de solução contendo essas 6 proteínas (1mg/ml) e adicionando-se o mesmo volume de tampão de amostra.

ANEXO 5 - Composição das soluções corante e descorante.

CORANTE

Comassie Blue	1,25 g
Ácido Acético	46,00 ml
Metanol 50%	4,54 ml
H ₂ O q.s.p	500,00 ml

DESCORANTE

Ácido Acético	70 ml
Metanol	300 ml
H ₂ O q.s.p	630 ml

**ANEXO 6 - Composição do gel simples para placa medindo (16,5
x 14,0 x 0,15 cm).**

GEL DE EMPACOTAMENTO

SOLUÇÃO	VOLUME
B	1,0 ml
D	1,0 ml
E	1,0 ml
F	0,08 ml
G	5,0 μ l
H ₂ O	4,95 ml

GEL DE RESOLUÇÃO OU DE CORRIDA

SOLUÇÃO	VOLUME
A	3,75 ml
B	11,7 ml
E	3,75 ml
F	0,3 ml
G	10,0 μ l
H ₂ O	10,5 ml

ANEXO 7 - Composição do gel de gradiente

GEL DE EMPACOTAMENTO

SOLUÇÃO	VOLUME
B	2,50 ml
C	1,25 ml
E	0,29 ml
F	0,10 ml
H	10,00 μ l
H ₂ O	5,65 ml

GEL DE RESOLUÇÃO OU DE CORRIDA

SOLUÇÃO	5%	20%
A	1,56 ml	1,56 ml
C	1,08 ml	8,33 ml
E	0,29 ml	0,29 ml
F	0,12 ml	0,12 ml
G	-----	1,25 ml
H	4,16 μ l	4,16 μ l
H ₂ O	12,5 ml	12,5 ml