

CAPÍTULO 8

Controle de artrópodes-praga com vírus entomopatogênicos

Maria Elita Batista de Castro
Bergmann Morais Ribeiro
Saluana Rocha Craveiro
Peter Ward Inglis
Fernando Hercos Valicente

Os animais invertebrados, que são desprovidos de coluna vertebral, constituem a grande maioria (97%) das espécies de animais distribuídas em todo o planeta, entre os quais os insetos representam o grupo de maior diversidade (Rafael et al., 2012; Stork, 2018). Como os seres vivos em geral, os invertebrados são suscetíveis a vírus, que podem causar doenças e resultar em morte precoce de seus hospedeiros.

Os vírus, que constituem um grupo de parasitas intracelulares obrigatórios, utilizam a estrutura de uma célula hospedeira para replicar seu material genético e apresentam grande capacidade de multiplicação, sendo provavelmente capazes de infectar todas as formas celulares de vida (Simmonds et al., 2017). Esses agentes infecciosos são microscópicos, não possuem estrutura celular nem metabolismo próprio, sendo formados, basicamente, de um só tipo de ácido nucléico, DNA ou RNA (podendo ser de fita simples ou dupla), e proteínas.

Alguns vírus são chamados de envelopados por possuírem seus nucleocapsídeos (ácido nucléico e capsídeo) envolvidos por uma membrana rica em lipídios, derivada da célula hospedeira, formando um envelope disposto em uma ou várias morfologias. Os vírus que não possuem essa membrana são chamados de não envelopados.

CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS E ECOLÓGICAS

Entre as famílias ou grupos de vírus de invertebrados descritos, os baculovírus são os mais documentados e reconhecidos como patogênicos para insetos (Harrison et al., 2018). O nome baculovírus é derivado da morfologia dos nucleocapsídeos em forma de bastão (báculo, do latim *baculum*, significa bastão, haste). Os baculovírus são genética e morfologicamente distintos de outras famílias de vírus de invertebrados e constituem o maior grupo de vírus conhecido que ataca insetos, predominantemente os da ordem Lepidoptera (borboletas e mariposas) (Federici, 1997). São considerados na história evolutiva tão antigos quanto os insetos holometábolos (apresentam metamorfose completa em seu desenvolvimento) (Thézé et al., 2011). Esses vírus foram descobertos desde o desenvolvimento da indústria da seda na China, no século 16, quando foram considerados responsáveis por uma doença do bicho-da-seda [*Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae)] chamada de amarelidão (*jaundice*), que causa a morte das lagartas (Rohrmann, 2019). Com o surgimento dos primeiros microscópios ópticos e mais tarde com a microscopia eletrônica, verificou-se que amostras provenientes de insetos doentes encontrados em criadores do bicho-da-seda comumente apresentavam corpos altamente refráteis de estrutura poliédrica. As doenças associadas a esse tipo de estrutura viral foram então denominadas de poliedroses, e sua transmissão pode ocorrer por meio desses corpos quando presentes nos alimentos do inseto, na superfície de seus ovos (transmissão horizontal) e dentro do óvulo de adultos infectados (transmissão vertical). Outras formas de transmissão viral são aquelas que ocorrem experimentalmente por injeção de partículas virais em hospedeiros saudáveis e infecção ou transfecção de DNA viral em células de insetos em cultura.

A tendência de que uma doença causada por baculovírus se torne uma epizootia (doença generalizada que ocorre em uma população animal, no caso insetos) depende da escala de dispersão e da persistência do vírus dentro e fora do hospedeiro, o que requer várias gerações do hospedeiro para se desenvolver. Larvas mortas representam relevante fonte de inóculo para ocorrência e manutenção de epizootia em populações endêmicas. Outros insetos e pássaros podem se alimentar desses insetos hospedeiros mortos e promover a dispersão de partículas virais no ambiente ou ainda para locais mais distantes. Um exemplo dessa forma de dispersão e/ou transmissão de vírus para novos hospedeiros é a interação passiva do vírus com outros insetos. Ao consumirem hospedeiros infectados por vírus, insetos predadores não dissolvem as partículas virais e, muitas vezes, essas partículas são liberadas pelas fezes durante vários dias e bem distantes do local da infecção. Outro exemplo é o caso das vespas parasitoides que podem atuar como vetores quando picam um inseto infectado, intro-

duzindo o vírus em hospedeiros susceptíveis durante subsequente oviposição. Essas partículas, corpos de oclusão, que se apresentam de forma ambientalmente estável, persistem no solo em estado dormente, porém viáveis, e permitem sua sobrevivência por décadas. O solo constitui um importante reservatório de vírus no meio ambiente (Fuxa, 2004). Dessa forma, a migração de insetos e as flutuações populacionais do hospedeiro são eventos que influenciam fortemente a persistência do vírus no campo, assumindo, portanto, um papel importante na ecologia dos baculovírus.

A dinâmica populacional de insetos tem sido pouco explorada quando se consideram, de forma mais ampla, os mecanismos de interações entre patógeno e hospedeiro ou ainda os impactos desses patógenos sobre as populações de insetos no campo. No entanto, a ação e as influências de parasitoides, predadores e patógenos na manutenção da densidade da praga abaixo do limiar de dano econômico ou na redução de seus surtos têm sido conhecidas e documentadas (Fleming-Davies et al., 2015; Kennedy; Dwyer, 2018).

Os baculovírus são bem conhecidos pela sua utilidade como agentes de controle biológico (Moscardi, 1999) e pela sua versatilidade como vetores de expressão em aplicações biotecnológicas (Kost et al., 2005). Na biotecnologia, esses vírus têm sido usados para produção de proteínas recombinantes, transdução de células de mamíferos, terapia gênica e produção de vacinas. No controle biológico, esses patógenos vêm atuando, historicamente, como reguladores de populações de pragas e, em vários casos, têm sido desenvolvidos para uso como inseticidas biológicos em sistemas de manejo integrado de pragas (MIP). Diante da importância cada vez mais crescente do uso de produtos mais saudáveis e sustentáveis, esses agentes de controle biológico têm se tornado uma atraente alternativa de uso quando comparados aos inseticidas químicos em vários sistemas agrícolas e florestais. Na maioria dos casos, os baculovírus são bastante eficientes por serem altamente virulentos e específicos para os hospedeiros, além de seguros para a saúde humana e o meio ambiente, pois não causam impactos negativos sobre plantas, mamíferos, pássaros, peixes ou mesmo insetos não alvos. Desde o início do uso comercial de baculovírus no controle biológico de pragas, testes de segurança têm sido feitos e nenhum problema de saúde ou ambiental foi documentado (Burgess et al., 1980a, 1980b; Lapointe et al., 2012). Diante disso, os baculovírus têm sido incluídos em listas de agentes de biocontrole de baixo risco, a exemplo do descrito em um documento da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) (Organisation for Economic Co-Operation and Development, 2002).

Os baculovírus possuem genoma de DNA circular de fita dupla com tamanho que, dependendo da espécie, varia de 80 kb a 180 kb e contém entre 89 a 183 fases abertas de leitura (ORFs – do inglês *open reading frames*) preditas (*Neodiprion lecontei*

NPV e *Pseudaletia unipuncta* GV, respectivamente) em ambas as fitas e orientações (sentido horário e anti-horário). O DNA associado a uma estrutura proteica forma os nucleocapsídeos, cujo comprimento varia de 250 nm a 300 nm e o diâmetro de 30 nm a 60 nm, os quais, quando envoltos em uma bicamada lipídica, constituem partículas infectivas completas chamadas de vírions. A variedade total de genes encontrados nos baculovírus é de, aproximadamente, 900 genes, entre os quais estão os genes conservados em todos os baculovírus (denominados *core genes*). Atualmente, já foram identificados 38 *core genes* presentes nos genomas de todos os baculovírus até então sequenciados (Garavaglia et al., 2012; Javed et al., 2017; Boogaard et al., 2018) (Tabela 1). Os *core genes* são genes ancestrais e altamente conservados, os quais representam 3% do conteúdo genético viral. Esses genes estão envolvidos nos diferentes estágios do ciclo viral (replicação do DNA, transcrição do RNA, composição proteica das partículas virais, interação com proteínas dos hospedeiros, infectividade oral, entre outros). Quando comparados aos outros, os *core genes* possuem menor tolerância às mutações, o que pode implicar a perda da viabilidade viral, já que estão envolvidos em processos essenciais para a infecção (Herniou et al., 2003; Miele et al., 2011; Ferrelli et al., 2012).

Além das mutações pontuais no genoma dos baculovírus, bem como nos outros vírus de DNA, a recombinação homóloga, a perda e duplicação de genes e a transferência lateral de genes, entre outros vírus, bactérias ou células eucarióticas, são os principais mecanismos responsáveis pela variação dos genomas (Shackelton; Holmes, 2004). Há vários estudos que relatam a aquisição dos baculovírus, por transferência horizontal, de genes provenientes do inseto hospedeiro, o que demonstra o alto nível de plasticidade do genoma desses vírus (Aragão-Silva et al., 2016; Harrison et al., 2016). Mutações pontuais, substituições, inserções e deleções ocorrem por todo genoma, mas se concentram em regiões específicas que representam *hot spots* de hipervariabilidade, que ocorrem, geralmente, nas regiões de repetição homóloga (*hrs* – do inglês *homologous repeat regions*) e nas ORFs repetidas dos baculovírus (*bro* – do inglês *baculovirus repeated orf*) (Hayakawa et al., 2000; de Jong et al., 2005). As *hrs* são regiões intergênicas formadas por sequências repetitivas que podem funcionar como ativadores de transcrição da RNA polimerase II ou origens de replicação do DNA viral (Guarino; Summers, 1986; Pearson et al., 1992; Hilton; Winstanley, 2007). Os genes *bro* constituem uma família de múltiplos genes encontrados nos baculovírus e em outros vírus de invertebrados de DNA de fita dupla (entomopoxvirus e iridovirus). Esses genes possuem funções diversas, mas pouco conhecidas, com relatos do seu envolvimento no processo de replicação de DNA e/ou regulação da transcrição do hospedeiro e atuação como fator de replicação viral na fase tardia (Bideshi et al., 2003).

Tabela 1. Genes conservados em todos os baculovírus (*core genes*) e sua posição no genoma de *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV).

Função	Gene	AcMNPV (ORF ⁽¹⁾)
Replicação/processamento de DNA	<i>lef-1</i>	14
	<i>lef-2</i>	6
	<i>DNA polymerase</i>	65
	<i>helicase</i>	95
	<i>alkaline nuclease</i>	133
Transcrição/RNA polimerase	<i>lef-4</i>	90
	<i>lef-5</i>	50
	<i>lef-8</i>	62
	<i>lef-9</i>	40
	<i>p47</i>	99
	<i>vlf-1</i>	77
Genes estruturais	<i>p6.9</i>	100
	<i>vp39</i>	89
	<i>vp1054</i>	54
	<i>vp91/p95</i>	83
	<i>gp41</i>	80
	<i>odv-ec43</i>	109
	<i>p49</i>	142
	<i>odv-e18</i>	143
	<i>desmoplakin</i>	66
	<i>odv-e27</i>	144
Fatores de infectividade oral	<i>pif-0/p74</i>	138
	<i>pif-1</i>	119
	<i>pif-2</i>	22
	<i>pif-3</i>	115
	<i>pif-4/19k/odv-e28</i>	96
	<i>pif-5/odv-e56</i>	148
	<i>pif-6</i>	68
	<i>pif-7</i>	110
Enzimas	<i>pif-8</i>	83
	<i>38k phosphatase</i>	98
	<i>p33</i>	92
Outras	<i>ubiquitin</i>	53
	<i>Ac78</i>	78
	<i>Ac81</i>	81
	<i>Ac93</i>	93
	<i>Ac101</i>	101
	<i>Ac103</i>	103

⁽¹⁾ *Open reading frame* (fase aberta de leitura).

Os genes de baculovírus não estão agrupados no genoma de acordo com sua função ou momento da transcrição. Entretanto, a expressão gênica ocorre em uma sequência temporal, e esse processo é altamente regulado pelos mecanismos da infecção e/ou por proteínas virais e do hospedeiro. Os genes são transcritos de forma gradual, ordenada e em cascata, assegurando a progressão da infecção para as fases seguintes. A expressão dos genes ocorre em três fases sucessivas que são denominadas precoce (*early*), tardia (*late*) e muito tardia (*very late*). Os genes transcritos no estágio precoce da infecção são precedidos por promotores com motivos TATA-box e/ou CAGT, que são reconhecidos e são transcritos pela RNA polimerase do inseto hospedeiro. Já os genes expressos nas fases tardias são transcritos pela RNA polimerase viral. Entretanto, muitos genes contêm promotores que são reconhecidos por ambos RNA polimerase II do inseto hospedeiro e RNA polimerase viral, sendo expressos durante toda a infecção.

A primeira sequência completa de genoma de baculovírus publicada foi a de *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) (Ayres et al., 1994). Desde então, particularmente com a adoção popular de tecnologia de sequenciamento de nova geração, a publicação de novos genomas de baculovírus foi bastante acelerada, o que tem proporcionado melhor entendimento acerca da biologia molecular desses vírus. Cerca de 83 espécies de baculovírus têm seus genomas sequenciados e depositados em um dos maiores bancos de dados, o GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

TAXONOMIA, DIVERSIDADE E EVOLUÇÃO

As regras que regem a classificação taxonômica e a nomenclatura dividem os vírus de invertebrados hierarquicamente em família, gênero e espécie. A definição formal para espécie viral foi modificada, e o termo passou a ser definido como “um grupo monofilético, cujas propriedades podem ser distinguidas entre uma espécie e outra por múltiplos critérios” tendo sido o termo “múltiplos critérios”, historicamente, interpretado e atribuído às diversas características relacionadas aos seguintes aspectos: replicação, faixa de hospedeiros, tropismo por células e tecidos, patogenicidade, modo de transmissão, antigenicidade e grau de parentesco de seus genomas ou genes (Peterson, 2014). Esse conceito foi formalizado pelo International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (Adams et al., 2017; Lefkowitz et al., 2018), que regulariza e organiza periodicamente a classificação taxonômica universal para os vírus.

A família *Baculoviridae* foi inicialmente dividida em *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV), com base nas diferenças morfológicas dos corpos de oclusão: *occlusion bodies* (OBs) e *occlusion derived viruses* (ODVs) (Figura 1). Com a realização de estudos filogenéticos e moleculares, uma nova classificação taxonômica foi dada aos baculovírus, e a família *Baculoviridae* foi dividida em quatro gêneros de acordo com a ordem de seus insetos hospedeiros (Jehle et al., 2006; Herniou et al., 2012; Harrison et al., 2018). O gênero *Alphabaculovirus* inclui NPVs específicos de lepidópteros, com OBs de forma poliédrica de 0,15 µm a 5,00 µm e genoma de 80 kpb a 180 kpb. O *Betabaculovirus* inclui os GVs específicos de lepidópteros, com OBs de forma ovocilíndrica de aproximadamente 0,12 µm x 0,50 µm de diâmetro e genoma de tamanho semelhante ao do gênero *Alphabaculovirus*. O *Gammabaculovirus* inclui os vírus específicos de himenópteros e atualmente é constituído por *N. lecontei* NPV (NeleSNPV), *Neodiprion sertifer* NPV (NeseSNPV) e *Neodiprion abietis* NPV (NeabNPV), com OBs de 0,4 µm a 1,1 µm e genoma menor que o dos outros baculovírus (82 kpb a 86 kpb) (Jehle et al., 2006). O *Deltabaculovirus* inclui os vírus específicos de dípteros atualmente representados pelo CuniNPV com OBs de 0,4 µm de diâmetro e genoma de 108,252 bp (Afonso et al., 2001). Os *Alphabaculovirus* foram divididos em dois grupos (Grupo I e Grupo II), com base em análises filogenéticas de baculovírus, inicialmente utilizando o gene *polh* (Zanotto et al., 1993) e, mais tarde, genomas completos. Posteriormente, o Grupo I foi subdividido em dois clados: “a” e “b” (Jehle et al., 2006). Esses dois grupos diferem no conteúdo de genes notadamente pelas suas proteínas de fusão de membranas (Monsma et al., 1996; Hefferon et al., 1999; Pearson et al., 2000; Westenberg et al., 2007). Os NPVs do Grupo I usam a GP64 como proteína de fusão, enquanto os NPVs do Grupo II utilizam-se da proteína F para a transmissão de partículas de vírus extracelulares (BVs, do inglês *budded viruses*) entre células do inseto hospedeiro (Ijkel et al., 2000; Pearson et al., 2000). Além disso, os grupos diferem pelo seu conteúdo de genes, pois 11 outros genes (ORFs de AcMNPV: Ac1 - *ptp*, Ac16 - BV-ODV26, Ac27 - *iap-1*, Ac30, Ac42 - *gta*, Ac72, Ac73, Ac114, Ac124, Ac132, Ac151 - *ie2*) podem ser encontrados apenas nos baculovírus do Grupo I (Rohrmann, 2019). No gênero *Gammabaculovirus*, não foram identificados os genes que codificam proteínas constituintes de BVs, proteína F ou GP64, o que sugere a ausência desse fenótipo nesse grupo (Jehle et al., 2006; Harrison et al., 2016). Cada gênero é constituído em torno de uma espécie-tipo, e os representantes para os respectivos gêneros são os seguintes: *A. californica multiple nucleopolyhedrovirus* (*Alphabaculovirus*), *Cydia pomonella granulovirus* (*Betabaculovirus*), *N. lecontei nucleopolyhedrovirus* (*Gammabaculovirus*) e *Culex nigripalpus nucleopolyhedrovirus* (*Deltabaculovirus*).

Os baculovírus têm suas partículas (OB/ODV e BV) de genótipos idênticos e fenótipos diferentes (Figura 1). Os fenótipos diferem quanto aos seguintes aspectos: morfologia e composição proteica, origem dos envelopes virais, modo de penetração na célula hospedeira e infectividade. Dependendo do número de nucleocapsídeos presentes nos ODVs, os NPVs (nucleopoliedrovírus) recebem a designação de *single nucleopolyhedrovirus* (SNPV), quando possuem apenas um nucleocapsídeo, e *multiple nucleopolyhedrovirus* (MNPV), quando possuem múltiplos nucleocapsídeos por envelope, enquanto os GVs (*granulovirus*), em geral, contêm um único nucleocapsídeo por oclusão. No caso do outro tipo de fenótipo (os BVs), essas partículas possuem um único nucleocapsídeo por envelope.

As diferentes espécies de baculovírus são nomeadas, por convenção, pelo nome científico da espécie hospedeira em que o vírus foi encontrado pela primeira vez, seguido pelo tipo de OB: poliedros (*nucleopolyhedrovirus* – NPV) ou grânulos (*granulovirus* – GV). A abreviatura é obtida pelas duas primeiras letras do gênero e do

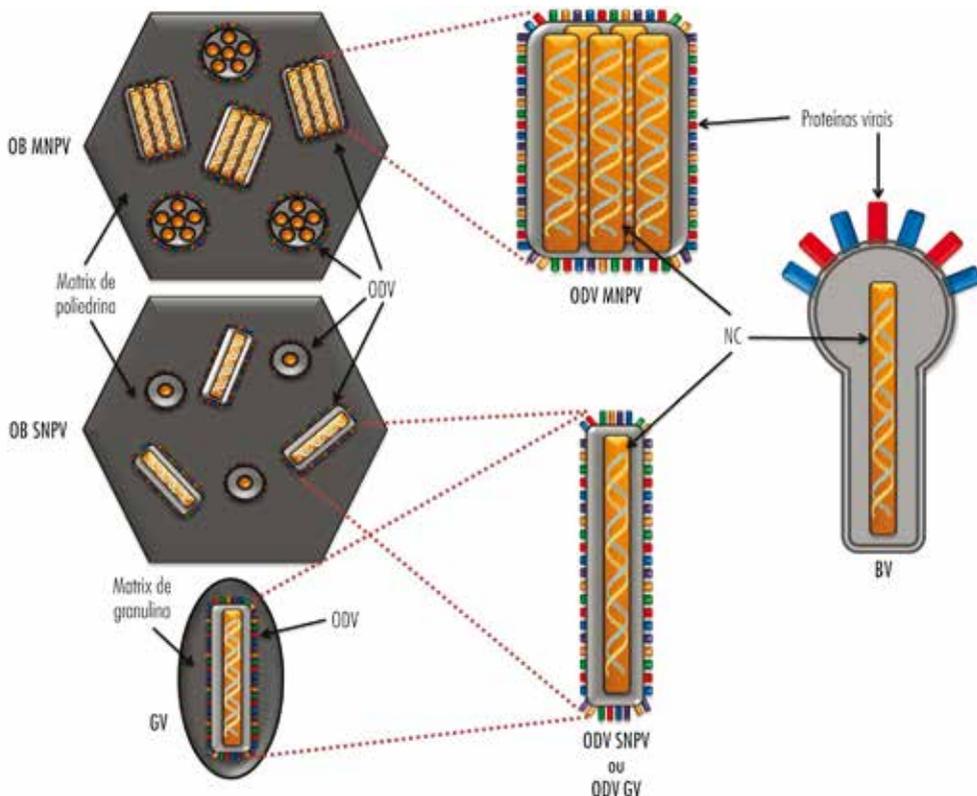


Figura 1. Fenótipos produzidos durante o ciclo de infecção dos Baculovírus. Corpo de oclusão (OB: poliedro ou grânulo); vírus derivado da oclusão (ODV); vírus brotado (BV), também chamado de vírus extracelular; *multiple nucleopolyhedrovirus* (MNPV); *single nucleopolyhedrovirus* (SNPV).

Ilustração: Marina Tagliari.

nome da espécie do inseto, seguidas do tipo do OB (NPV ou GV). Originalmente, os baculovírus foram nomeados pela primeira letra do gênero e da espécie de seu hospedeiro, porém essa designação foi alterada para a atual nomenclatura à medida que os vírus foram sendo descobertos, pois alguns deles infectavam insetos diferentes que tinham nomes com as mesmas primeiras letras, resultando em diferentes vírus com o mesmo descritor. Para maior clareza, seguem exemplos de como atribuir os nomes científicos às espécies de baculovírus com base nas seguintes informações:

- Identificação do inseto hospedeiro: nome científico do hospedeiro do qual o vírus foi isolado pela primeira vez.
- Morfologia da partícula viral (corpo de oclusão) observada por microscopia eletrônica de transmissão.

Exemplos:

Hospedeiro: *Chrysodeixis includens* (Walker)

Tipo de partícula viral: poliedros – *nucleopolyhedrovirus* (NPV)

Nome da espécie viral: *Chrysodeixis includens nucleopolyhedrovirus*

Abreviatura: ChinNPV

Hospedeiro: *Plutella xylostella* (L.)

Tipo de partícula viral: grânulos – *granulovirus* (GV)

Nome da espécie viral: *Plutella xylostella granulovirus*

Abreviatura: PlxyGV

Essa atual regra para abreviaturas não foi adotada para os primeiros baculovírus descritos na literatura, portanto a convenção histórica tem sido mantida para representantes dos vários vírus da família *Baculoviridae*, como, por exemplo, *A. californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) e *C. pomonella granulovirus* (CpGV).

Diversidade e evolução da família *Baculoviridae*

Uma grande diversidade de vírus de invertebrados tem sido documentada, e os mais estudados são os *ascovirus*, *iridovirus*, *polydnavirus*, *cypovirus*, *entomopoxvirus* e *baculovirus*. Entre esses, os baculovírus têm-se destacado como um dos principais vírus entomopatogênicos com grande potencial no manejo integrado de insetos-pragas.

Os baculovírus são vírus específicos de artrópodes e são os únicos que não possuem homologia com vírus encontrados em outros organismos, como animais, plantas, fungos e bactérias (Ikeda et al., 2015). Esses vírus possuem alta diversidade em relação ao tamanho, organização e conteúdo gênico entre seus genomas, e essa alta variação genômica reflete claramente na diversidade fenotípica observada entre os quatro gêneros da família *Baculoviridae* (Ikeda et al., 2015). Além da marcante diferença morfológica entre partículas OBs de *granulovirus* e *nucleopolyhedrovirus* encontrada nos baculovírus específicos de lepidópteros, variações fenotípicas são também observadas entre NPVs que infectam diferentes ordens de insetos. Nos *Alphabaculovirus*, a infecção celular ocorre em praticamente todos os tecidos do inseto hospedeiro, enquanto os *Gammabaculovirus* e os *Deltabaculovirus* apresentam infecção e replicação do vírus restritas às células do intestino médio do inseto (Katsuma et al., 2012). Outro exemplo é *C. nigripalpus* NPV (CuniNPV), que não contém genes homólogos às proteínas poliedrina/granulina e possui uma proteína de 90 kDa com formas globulares para as partículas OBs e não poliédricas como nos demais NPVs (Afonso et al., 2001).

Como já foi dito, há uma alta diversidade genética entre as diferentes espécies virais. Nos baculovírus, além dessa diversidade interespecífica, verifica-se grande variabilidade genética intraespecífica. Variações genéticas encontradas em uma mesma população são altamente frequentes e facilmente mantidas por causa da característica típica dos baculovírus de concentrar mais de um genótipo em uma única partícula viral, como o que ocorre nos NPVs que possuem vários nucleocapsídeos oclusos em um único poliedro (Herniou; Jehle, 2007; Clem; Passarelli, 2013). As variantes genotípicas, que são facilmente detectadas por análises de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), geralmente exibem variações no fenótipo, as quais estão principalmente relacionadas à patogenicidade, ao tempo de morte e à produção de partículas BVs e OBs (Cory et al., 2005; Ogembo et al., 2007; Harrison et al., 2008; Alexandre et al., 2010). A heterogeneidade de fenótipos é comumente mantida em populações de campo e, em razão disso, acredita-se que a diversidade genética traz vantagens quanto à adaptação, à evolução e ao tempo de sobrevivência do baculovírus no campo.

Além dos baculovírus, outros vírus de insetos como o *entomopoxvirus* (EPV) e o vírus da poliedrose citoplasmática (CPV) apresentam vírions oclusos em uma matriz proteica que formam corpos de oclusão que protegem as partículas virais livres no meio ambiente. Entretanto, os baculovírus se diferenciam dos EPVs e CPVs por apresentarem replicação no núcleo da célula infectada, enquanto os demais se replicam no citoplasma.

Vírus similares aos baculovírus quanto à patologia e à morfologia foram relatados como pertencentes à família *Nudiviridae*. Esses vírus também se replicam no núcleo da célula, mas não formam partículas virais oclusas, por isso foram, anteriormente, nomeados como baculovírus não oclusos. O conteúdo genômico dos nudivírus compartilha 20 genes descritos como *core genes* de baculovírus. Apesar da similaridade entre esses dois grupos, análises filogenéticas mostram que os nudivírus formam um grupo monofilético irmão do grupo dos baculovírus, e são os mais proximamente relacionados evolutivamente à família *Baculoviridae* (Thézé et al., 2011; Wang et al., 2011).

A origem evolutiva dos baculovírus pode ser explicada por diferentes hipóteses. Rohrmann (1986) propôs que os baculovírus se originaram com os insetos da ordem Lepidoptera e, por transferência horizontal, atingiram em seguida outras ordens de insetos. Posteriormente, Federici (1997) propôs que a origem dos baculovírus remonta à origem dos artrópodes, com a cladogênese (processo de especiação; ramificação filogenética) do vírus e de seu hospedeiro. Em 2004, Herniou e colaboradores sugeriram uma terceira hipótese, na qual ancestrais dos baculovírus, por transferência horizontal, infectaram diferentes ordens de insetos, e propuseram uma antiga coevolução do vírus com seu hospedeiro, que levou, em seguida, ao progresso da especiação das diferentes linhagens de baculovírus para as diferentes ordens de insetos hospedeiros (Herniou et al., 2004).

Com base em análises genômicas e evolutivas, tem-se admitido que o surgimento dos baculovírus no Carbonífero, período da era Paleozoica, provavelmente tenha ocorrido a partir de ancestrais dos baculovírus que evoluíram com os insetos holometábolos cerca de 310 milhões de anos atrás (Thézé et al., 2011). Tendo em vista que os ancestrais dos vírus já infectavam os primeiros insetos que surgiram no período Devoniano, esses dados sustentam e confirmam a terceira hipótese (Herniou et al., 2004), que sugere uma coevolução dos baculovírus com os insetos hospedeiros. Além disso, acredita-se que a grande diversificação dos vírus ocorreu durante a diversificação das diferentes ordens de insetos durante a era Mesozoica (Thézé et al., 2011), dados que também corroboram a terceira hipótese.

Importância da variabilidade genética e sua conservação

Os baculovírus consistem em uma das mais diversas famílias de vírus, e essa alta variabilidade pode ser decorrente, principalmente, da coevolução e codiversificação do vírus com seu inseto hospedeiro. A variabilidade genética é fundamental para manutenção e evolução de uma espécie em seu habitat natural, evitando sua extinção ao longo do tempo. Mutações favoráveis (benéficas ou vantajosas) podem

se acumular, mediante adaptações evolutivas, enquanto mutações desfavoráveis ou deleções podem levar à redução gradual de sua frequência e resultar até na perda de uma determinada característica ou mesmo de uma espécie na população. Portanto, a preservação da variabilidade genética e genotípica vegetal, animal (incluindo os invertebrados) e de microrganismos tem sido motivo de preocupação constante na conservação e no uso sustentável da biodiversidade.

No caso dos vírus de insetos, essa diversidade pode constituir fator importante para o controle biológico de insetos-praga, por permitir seleção de fenótipos com características específicas favoráveis para uso do vírus como princípio ativo na produção de bioinseticidas.

Nesse contexto, o interesse e a importância na realização de coleta, identificação, guarda e conservação em longo prazo desses recursos genéticos, em condições controladas de reservatórios, bancos genéticos ou coleções, têm sido cada vez mais crescentes no Brasil e no mundo, não sendo diferente para os vírus de invertebrados.

Acervos bastante representativos de isolados de diversas espécies de vírus são mantidos por instituições de pesquisa no Brasil, como, por exemplo, pela Empresa de Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Desde 1989, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia mantém a Coleção de Vírus de Invertebrados (CVI), na qual se encontram isolados de espécies de vírus de insetos de importância agrícola e florestal, caracterizados e armazenados em condições adequadas de conservação de longo prazo. Essa coleção constitui importante fonte de diversidade genética e dá suporte à pesquisa básica nas áreas de patologia de insetos, virologia fundamental, taxonomia e filogenia de vírus de insetos, bem como à pesquisa aplicada na área de controle biológico, criando oportunidades de seleção de vírus com potencial tecnológico e ambiental direcionados ao desenvolvimento de processos, bioinseticidas e outros produtos biotecnológicos. Além disso, o progressivo aumento do número de genomas virais sequenciados e analisados, utilizando-se de ferramentas da bioinformática e dos avanços da genética e genômica molecular, tem trazido inúmeras possibilidades de aplicação em diferentes áreas do conhecimento, gerando ativos de inovação tecnológica e a consequente valoração dos recursos genéticos depositados nas coleções.

MODO DE AÇÃO E CICLO BIOLÓGICO DOS BACULOVÍRUS

Os vírus utilizam as células hospedeiras para se replicarem e se desenvolverem. Ao serem ingeridos ou inoculados no inseto, a célula hospedeira disponibiliza sua maquinaria de autorreprodução celular para fornecer substratos e energia ne-

cessários para a síntese de proteínas virais e ácidos nucleicos virais. Uma série de mudanças comportamentais e morfológicas do inseto ocorre durante o processo de infecção, a começar pela perda de apetite seguida de retardamento do crescimento do inseto e letargia, descoloração e perda do brilho natural do tegumento do inseto por causa da dissolução dos tecidos e do acúmulo de partículas virais, culminando na morte do inseto. Nessa fase final, antes da lise larval, uma característica bastante comum da infecção por baculovírus é a migração do inseto infectado para uma posição mais elevada do galho da árvore ou planta, a fim de facilitar a dispersão dos corpos de oclusão. Esse comportamento do inseto (geotropismo negativo) tem sido atribuído como resultado de um “efeito zumbi” causado pela infecção viral no inseto.

Os baculovírus têm um ciclo biológico bifásico (também chamado ciclo de vida, ciclo de infecção ou replicação) bastante peculiar e que se diferencia de outros vírus por produzir durante a infecção duas formas geneticamente idênticas, porém estrutural e funcionalmente distintas – vírus derivados de corpos de oclusão (ODVs) e vírus extracelulares ou vírus brotados (BVs) –, como mostrado já na Figura 1. Os ODVs são responsáveis pela infecção primária do inseto hospedeiro, enquanto os BVs são liberados das células do hospedeiro e são responsáveis pela propagação da infecção célula a célula, causando infecção sistêmica, que também é chamada de infecção secundária. Os BVs são capazes de propagar a infecção de uma célula para outra dentro do inseto e em cultura de células, “brotando” da membrana basal das células do intestino médio, adquirindo assim um envelope distinto dos ODVs. *Budded viruses* são utilizados para infecções em cultivo de células de insetos e infecção intra-hemocélica por serem milhares de vezes mais infecciosos do que a forma ODV (Keddie; Volkman, 1985; Monsma et al., 1996).

Basicamente, o ciclo de infecção dos baculovírus se inicia quando OBs, que se encontram disseminados na natureza, são ingeridos por larvas de insetos suscetíveis e alcançam o sistema digestivo, onde a matriz protéica das partículas virais é dissolvida, liberando centenas de vírions ODVs que infectam as células epiteliais colunares do intestino do inseto e promovem a infecção primária. Na sequência, os vírions se replicam no núcleo das células, brotam na forma de BV e atingem o sistema traqueal e a hemolinfa, estabelecendo infecções secundárias, então a infecção é disseminada por todo inseto. No estágio final da infecção, a maioria dos nucleocapsídeos são mantidos no núcleo e ficam então oclusos em uma matriz proteica formando os OBs. Cerca de 6 a 8 dias após o início da infecção, a maioria das larvas infectadas morre por causa do acúmulo de OBs formados, seguido de liquefação e rompimento da cutícula larval, com liberação de grande quantidade de poliedros/ou grânulos no meio ambiente (Figura 2). Essas partículas virais liberadas poderão ser consumidas por outras larvas

hospedeiras e dar início a novos ciclos de infecção. Uma sequência de eventos detalhada do processo de infecção está descrita a seguir no tópico Patogênese.

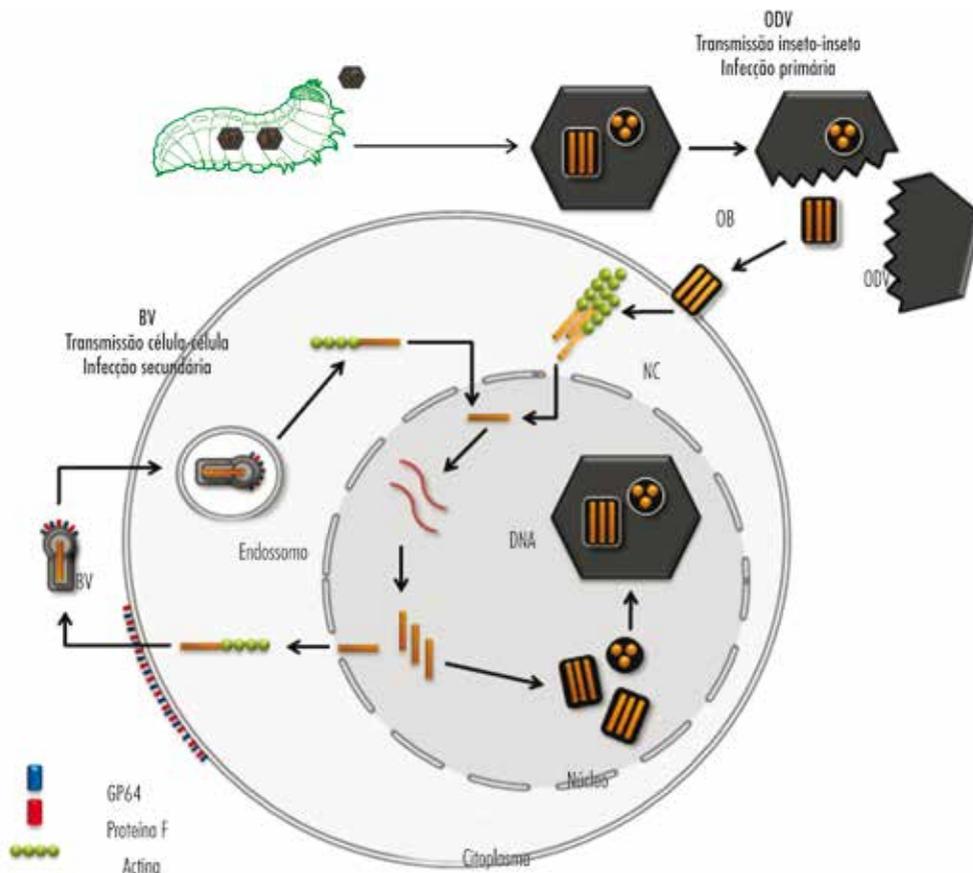


Figura 2. Esquema representativo do ciclo de infecção dos baculovírus: corpos de oclusão (OBs); vírus derivados da oclusão (ODVs); vírus brotados (BV), também chamados de vírus extracelulares.

Ilustração: Marina Tagliari.

PATOGÊNESE E INTERAÇÃO VÍRUS-HOSPEDEIRO

Os vírus são patógenos intracelulares específicos de determinados hospedeiros e podem causar diferentes sintomas, dependendo do tipo de célula que eles infectam. A identificação de vírus de insetos se dá normalmente em larvas infectadas, nas quais é possível identificar mudanças relacionadas à morfologia ou ao comportamento. Por sua vez, a identificação de uma infecção viral pode ser dificultada pela baixa taxa de replicação viral em infecções assintomáticas que não chegam a matar o hospedeiro, causando uma infecção crônica ou latente.

Os insetos da ordem Lepidoptera são, em sua grande maioria, importantes pragas na agricultura. Por essa razão, a maior parte dos estudos de patologia de doenças virais concentra-se nesses insetos. Há relatos de que mais de 700 espécies de insetos foram infectadas naturalmente por baculovírus e mais de 90% dos baculovírus foram isolados a partir de espécies de Lepidoptera, embora possam ser encontrados em outras ordens, como Diptera e Hymenoptera (Herniou; Jehle, 2007). Entre os vírus de insetos, os baculovírus são altamente específicos e virulentos contra seus hospedeiros. Essas características levaram ao desenvolvimento desses vírus como agentes de controle biológico. Por isso, a grande maioria das informações sobre patologia e genômica de vírus de inseto concentra-se nos dados da família *Baculoviridae*.

Os vírus podem ou não ter preferência por determinado tipo de célula. Os baculovírus, por exemplo, podem infectar diferentes tecidos do inseto (alphabaculovírus e betabaculovírus) ou tecidos específicos (alguns betabaculovírus e deltabaculovírus). Os alphabaculovirus infectam praticamente todos os tipos de célula da larva hospedeira, como células musculares, do tegumento, da hemolinfa, dos sistemas digestivo, traqueal e nervoso e do corpo gorduroso. Apenas alguns tecidos, como os túbulos de Malpighi, não apresentam infecção por alguns baculovírus (Cordeiro et al., 2008). Em uma célula suscetível, as alterações morfológicas induzidas pela infecção por baculovírus são as seguintes: arredondamento celular, hipertrofia do núcleo, formação do estroma virogênico, produção de partículas virais e oclusão de parte desses vírus em corpos de oclusão nas fases finais da infecção (Williams; Faulkner, 1997; Pombo et al., 1998).

Entrada dos vírus

A principal rota de entrada de vírus nos insetos é pela via oral (Figura 2). Os insetos adquirem partículas virais durante sua alimentação e, no intestino médio, ocorre o contato dos vírus com as células do inseto. No intestino, o OB ou poliedro é dissolvido pela ação de proteases intestinais e pelo ambiente alcalino ($\text{pH} > 11$) e, como consequência, os vírions são liberados. Entretanto, para chegar até às células colunares do intestino, essas partículas têm de atravessar uma barreira, a membrana peritrófica (MP). A MP é formada pela secreção de quitina e por outros polissacarídeos e proteínas (matriz extracelular) das células intestinais, que formam uma espécie de filtro que permite a passagem do alimento digerido no intestino, separa a camada de células do bolo alimentar e protege contra microrganismos. A MP é um obstáculo à infecção pelos baculovírus (Brandt et al., 1978; Wang; Granados, 1997; Matos et al., 1999), pois o nucleocapsídeo dos baculovírus mede por volta de $30 \text{ nm} - 35 \text{ nm} \times 250 \text{ nm} - 300 \text{ nm}$, enquanto os poros da MP de larvas de lepidópteros podem variar de $7,9 \text{ nm}$ em

Manduca sexta (L.) a 29 η m em *Malacosoma disstria* Hübner (Wolfersberger et al., 1986). Dessa forma, para que os baculovírus alcancem as células colunares, é necessário que a MP seja modificada, permitindo sua passagem. Alguns baculovírus possuem proteínas chamadas de *enhancers*, presentes nos OBs (Wang; Granados, 1997), que são metaloproteínas capazes de degradar glicoproteínas presentes na MP, o que acarretaria a formação de poros nessa membrana. Além disso, os OBs podem conter proteases alcalinas ou quitinases derivadas de bactérias durante a decomposição do corpo do inseto infectado, as quais também poderiam estar envolvidas na formação de poros na MP. Após passar a barreira da MP, os vírions se ligam às células colunares para iniciar a infecção viral. Entretanto, essas células descamam-se constantemente, o que dificulta ainda mais a entrada do vírus (Volkman; Keddie, 1990; Engelhard et al., 1994).

Para entrar nas células do intestino médio, os vírions (ODVs) se ligam às microvilosidades das células colunares do intestino e, com o auxílio das proteínas denominadas de PIFs (do inglês *per os infectivity factors*), ocorre a fusão entre a membrana do ODV e a membrana da célula. Essas proteínas são conservadas entre os baculovírus sequenciados até o momento e formam um complexo com pelo menos nove proteínas na membrana do ODV, o qual é essencial à ligação e à entrada do vírus na célula intestinal (Peng et al., 2010; Javed et al., 2017; Zheng et al., 2017; Rohrmann, 2019). Entretanto, ainda não se conhece o receptor para entrada dos ODVs nessas células. Após entrar na célula, o vírus pode se dirigir ao seu núcleo para iniciar a replicação ou atravessar o citoplasma para a porção basolateral e infectar outra célula (Granados; Lawler, 1981; Washburn et al., 1999) por um mecanismo que envolve a proteína do capsídeo viral P78/83 e o complexo celular Arp2/3, para polimerização de actina, que permite o movimento da partícula viral pelo citoplasma (Ohkawa et al., 2010; Mueller et al., 2014). Foi mostrado experimentalmente que o tegumento das larvas de lepidópteros pode também ser uma via de infecção (Kirkpatrick et al., 1994) após um ferimento ou por mudanças bruscas em temperatura e umidade que, de alguma forma, causem danos à superfície dos insetos e permitam a entrada do vírus pelos espiráculos (Kirkpatrick et al., 1994; Jinn et al., 2009).

Infecção sistêmica

Após a entrada nas células intestinais, o espalhamento da infecção pelo corpo do inseto ocorre com a chegada do vírus no sistema circulatório do inseto (hemolinfa) e/ou respiratório (traqueias), com ou sem prévia replicação viral nas células do intestino (Washburn et al., 1999; Soares; Ribeiro, 2005). Para que isso ocorra, os vírus devem atravessar a lâmina basal (LB) das células intestinais, que é um tipo de matriz extracelular que envolve praticamente todos os tipos de células no corpo dos inse-

tos, com exceção dos hemócitos (Sasaki et al., 2004). A LB é composta de proteínas e polissacarídeos secretados pelas próprias células do tecido e, no caso do intestino dos insetos, separa esse tecido das células da hemolinfa (hemócitos), da traqueia (traqueoblastos) e células musculares, que são os tipos de tecidos que possuem contato direto com esse órgão. Além disso, serve como suporte para a reposição de células mortas e barreira para a entrada de patógenos em outros tecidos do inseto, pois, como descrito para a membrana peritrófica, a LB possui poros menores do que as dimensões das partículas infectivas dos baculovírus (Reddy; Locke, 1990; Passarelli, 2011). Como os componentes da LB estão em constante renovação, essa estrutura é dinâmica e, durante a renovação de seus componentes, pode ocorrer a formação de poros transientes por onde os vírus podem atravessar.

Granados e Lawler (1981) mostraram, por microscopia eletrônica de transmissão, partículas virais de AcMNPV dentro da LB do intestino de larvas de *Trichoplusia ni* (Hübner), poucas horas após a infecção oral. Durante o desenvolvimento embrionário dos insetos, as traqueias são formadas em direção aos diferentes órgãos dos insetos, guiadas pela secreção da proteína FGF dos tecidos em formação (Sutherland et al., 1996). A proteína FGF, que é responsável pela modulação de diferentes processos durante o desenvolvimento dos tecidos em organismos multicelulares, liga-se ao seu receptor na superfície das células e ativa uma cascata de eventos, como proliferação, diferenciação e movimentação celular (Ornitz; Itoh, 2001). A maioria dos vírus dos gêneros *Alpha* e *Betabaculovirus* sequenciados até o momento possui o gene para uma proteína homóloga à FGF, que é denominado de *vfgf*. Interessantemente, a presença desse gene parece estar relacionada à infecção de mais de um tecido, pois os baculovírus (*Delta* e *Gammabaculovirus*), que não possuem esse gene, possuem infecção restrita ao intestino médio das larvas de insetos (Becnel et al., 2001). A VFGF de diferentes baculovírus, que é secretada durante a infecção de células de insetos, é uma proteína capaz de induzir quimiotaxia in vitro de células de inseto derivadas de *Spodoptera frugiperda* (Smith), *T. ni* e *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Detvisitsakun et al., 2005; Katsuma et al., 2006a; Li et al., 2008). A deleção do gene *vfgf* nos baculovírus AcMNPV e em *B. mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV) retarda o tempo de morte dos insetos infectados quando comparado com o tempo de morte induzida pela infecção do vírus selvagem, principalmente quando os vírus são administrados oralmente (Katsuma et al., 2006b; Detvisitsakun et al., 2007). Dessa forma, a ação dessa proteína está relacionada à velocidade de dispersão do vírus dentro do inseto (Detvisitsakun et al., 2007). Means e Passarelli (2010) mostraram que a presença do gene *vfgf* induz a degradação e a remodelagem da lâmina basal de célula da traqueia ligada ao intestino médio da larva infectada, com a participação de metaloproteases e caspases efetoras, enzimas presentes na LB para uma eficiente infecção sistêmica.

Os hemócitos e os traqueídeos são altamente susceptíveis à infecção pelos baculovírus, o que é importante para a patogenicidade desses vírus, pois são locais de amplificação viral (Engelhard et al., 1994). Além disso, o sistema circulatório dos insetos é do tipo aberto, por isso a hemolinfa circula livremente dentro do corpo em contato direto com os outros órgãos internos, o que facilita a dispersão dos vírus (Granados; Lawler, 1981; Washburn et al., 1995; Barrett et al., 1998). O sistema respiratório, por sua vez, leva oxigênio para todos os tecidos e também constitui uma via de dispersão da infecção viral (Engelhard et al., 1994; Soares; Ribeiro, 2005). A hemolinfa é responsável pela distribuição de nutrientes para o corpo do inseto e possui diferentes tipos celulares envolvidos na defesa do organismo contra patógenos. Essas células são responsáveis pela fagocitose, coagulação, encapsulamento e formação de nódulos em volta de patógenos ou corpos estranhos (Silveira et al., 2003, 2004).

Apesar de a maioria dos baculovírus possuir uma gama de hospedeiros restrita, alguns deles podem infectar mais de uma espécie de inseto. O *A. californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), por exemplo, é capaz de infectar 32 espécies de lepidópteros, entretanto a susceptibilidade desses insetos à infecção viral é diferente e depende de diversos fatores, como estágio de desenvolvimento, resposta imune do hospedeiro e tipo de alimentação (Engelhard; Volkman, 1995; Hoover et al., 2000; Zhang et al., 2002). Insetos totalmente permissíveis à infecção por baculovírus são incapazes de evitar o estabelecimento da infecção quando em contato com uma determinada dose mínima de vírus. Já insetos semipermissíveis possuem mecanismos de defesa mais eficientes para evitar o estabelecimento da infecção e, normalmente, é necessária uma quantidade de vírus muito alta para que o processo ocorra.

Apesar de o baculovírus AcMNPV ser capaz de infectar dezenas de espécies de lepidópteros, a replicação desse vírus nos diferentes tecidos dos insetos pode ser bem diferente. Para iniciar uma infecção em larvas de *S. frugiperda* (penúltimo estágio de desenvolvimento), é necessária uma dose aproximadamente mil vezes maior do que para larvas de *T. ni* no último estágio de desenvolvimento (Clark; Clem, 2002). Além disso, *S. frugiperda* leva mais que o dobro do tempo para morrer. Uma das causas dessa resistência pode estar na suscetibilidade dos hemócitos, pois apenas 5% deles são infectados após 24 horas de contato com o vírus, enquanto nos hemócitos de *T. ni* esse percentual é de 57% (Clark; Clem, 2002). Algo semelhante ocorre com a infecção de AcMNPV em larvas permissivas de *Heliothis virescens* (F.) e semipermissivas de *Helicoverpa zea* (Boddie) (Trudeau et al., 2001). Nesse caso, o mecanismo de resistência das larvas de *H. zea* também está relacionado com a baixa replicação viral nos hemócitos e a formação de focos de infecção nas traqueias encapsuladas e melanizadas (Trudeau et al., 2001).

Genes auxiliares da replicação e dispersão viral

As células possuem diferentes mecanismos de restrição à infecção e à replicação viral. Para que um determinado vírus consiga se replicar eficientemente em uma célula hospedeira, ele precisa superar esses mecanismos de defesa celular. Os *core genes*, conservados em todos os baculovírus (ver seção Diversidade e Evolução da Família *Baculoviridae*), desempenham papéis importantes no ciclo de infecção. Entretanto, existem outros genes que estão presentes em apenas alguns baculovírus e têm sido classificados como genes auxiliares. A aquisição ou perda de genes ao longo da evolução dos baculovírus é evidente a partir da análise dos genomas conhecidos, e a inserção desses genes no genoma viral está, muitas vezes, associada a uma eficiente infecção e/ou replicação viral (Miele et al., 2011; Ferrelli et al., 2012), como será mencionado nos exemplos que se seguem.

Genes inibidores de apoptose (*p35* e *iap*) – Os baculovírus possuem genes que codificam proteínas antiapoptóticas. A apoptose (morte celular programada) é um mecanismo de morte celular conservado em organismos invertebrados e vertebrados, sendo crucial para o desenvolvimento embrionário, com a eliminação de células desnecessárias e também de células infectadas por vírus ou defeituosas (Kam; Ferch, 2000; Clem, 2015). Os genes *p35* e *iap* (inibidor de apoptose) exercem papel importante em interações vírus-hospedeiro, pois inibem a apoptose em células hospedeiras (Clem et al., 1991; Castro; Ribeiro, 2001; Clem, 2007). De acordo com a homologia de suas sequências, as proteínas antiapoptóticas do tipo IAP são classificadas em seis grupos (IAP1-IAP6) e nem todas possuem atividade antiapoptótica (Mehrabadi et al., 2015; Fu et al., 2017). A deleção de genes antiapoptóticos do genoma viral resulta na diminuição da infectividade viral *in vitro* e *in vivo*, o que confirma o seu papel no estabelecimento de uma infecção produtiva (Clem et al., 1991; Silveira et al., 2007).

Gene inativador do hormônio ecdisona: ecdisteroide udp-glicosiltransferase (*egt*) – A maioria dos baculovírus possui um gene que codifica uma enzima capaz de inativar o hormônio ecdisona do inseto. Esse hormônio é responsável pelo controle da mudança de estágio larval e da metamorfose dos insetos (O'Reilly, 1995). A enzima viral ecdisteroide UDP-glicosiltransferase (EGT) catalisa a transferência de um monossacarídeo (UDP-glicose ou UDP-galactose) para o hormônio ecdisona, inativando-o (O'Reilly; Miller, 1989). Essa inativação durante a infecção faz com que as larvas não progridam para a próxima muda e continuem se alimentando, o que resulta em grande replicação viral. Foi demonstrado por diferentes pesquisadores que a inativação desse gene resulta em aumento na velocidade de morte dos insetos infectados (O'Reilly; Miller, 1991; Pinedo et al., 2003).

Genes quitinase (*chiA*) e catepsina (*v-cath*) – Uma das características da infecção do baculovírus AcMNPV em insetos suscetíveis é a degradação do corpo do inseto logo após sua morte. Essa degradação ou liquefação é resultado da expressão das enzimas virais catepsina (V-CATH) e quitinase (CHIA) nos estágios finais da infecção (Hawtin et al., 1997). A degradação da cutícula dos insetos infectados no final da infecção é considerada uma vantagem evolutiva, pois aumentaria a dispersão dos vírus no meio ambiente (Daimon et al., 2006). Entretanto, nem todos os baculovírus possuem, em seu genoma, os genes para essas enzimas, como, por exemplo, o baculovírus AgMNPV (Slack et al., 1995). Larvas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner infectadas pelo AgMNPV não sofrem liquefação logo após a morte, e a inserção dos genes *v-cath* e *chiA* de outro baculovírus filogeneticamente próximo ao AgMNPV (*Choristoneura fumiferana* DEF multiple nucleopolyhedrovirus, CfDEFNPV) no genoma do AgMNPV resultou na liquefação do corpo do inseto no final da infecção, confirmando o papel dessas enzimas nesse processo (Lima et al., 2013).

Gene da tirosina fosfatase (*ptp*) – O gene *ptp* (Sheng et al., 1993) codifica uma enzima denominada proteína tirosina fosfatase (PTP). Kamita et al. (2005) mostraram que o gene *ptp* estava envolvido no aumento da atividade de locomoção da larva de *B. mori* quando infectada pelo baculovírus BmNPV. Insetos infectados por um baculovírus com uma deleção nesse gene apresentam locomoção reduzida durante a infecção viral. Os autores especulam que esse aumento na locomoção da larva infectada pode estar relacionado a uma maior dispersão do vírus no meio ambiente, pois o inseto moribundo se movimentaria mais no final da infecção e espalharia vírus em uma área maior. Por sua vez, Katsuma (2015) construiu BmNPV recombinantes que expressavam PTP inativa e demonstrou que a atividade enzimática não era a responsável pelo aumento da atividade de locomoção da larva infectada, mas sim a presença da proteína na partícula viral (BV). Outro gene de baculovírus envolvido na mudança de comportamento do hospedeiro é o gene *egt* descrito anteriormente. Hoover et al. (2011) mostraram que o baculovírus *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus (LdMNPV) era capaz de induzir uma mudança de comportamento da larva infectada semelhante ao descrito para o gene *ptp*, em que as larvas infectadas procuravam lugares mais altos antes da morte. Quando utilizavam baculovírus recombinantes que continham o gene *egt* deletado, esse comportamento não acontecia. Dessa forma, concluíram que esse gene também possui um papel na dispersão do vírus na natureza.

Genes relacionados ao metabolismo de nucleotídeos (*dut*, *rnr* e/ou *tmk* e homólogos) – Alguns baculovírus possuem genes homólogos aos genes *dUTP* difosfatase (*dut*), ribonucleotideo-difosfato redutase (*rnr*) e/ou timidina monofosfato quinase (*tmk*). Entretanto, entre esses genes, apenas o gene híbrido *dut/tmk* presente nos baculovírus – *Perigonia lusca* single nucleopolyhedrovirus (PeluSNPV) e *Erinnyis ello* granulovirus (ErelGV) – foi alvo de análise funcional (Ardisson-Araújo, 2016).

A enzima dUTPase é responsável pela remoção de dUTP eventualmente incorporado na molécula de DNA durante a replicação pela DNA polimerase. As enzimas RNR e TMK participam, respectivamente, da síntese de dCTP (*desoxicitidina trifosfato*) e dTTP (*desoxitimidina trifosfato*), que são precursores de nucleotídeos (blocos que constituem a molécula de DNA). A introdução desses genes no genoma do AcMNPV foi capaz de acelerar a expressão de genes virais, a replicação do DNA viral e a produção de progênie viral, além de resultar em maior produção de poliedros. A presença desses genes no genoma de alguns baculovírus pode estar relacionada a uma maior proteção do genoma viral contra mutações deletérias (Ardisson-Araújo, 2016).

USO DOS BACULOVÍRUS E SUA IMPORTÂNCIA

O Brasil é um país essencialmente tropical, com dimensões continentais e várias fronteiras agrícolas. As altas temperaturas médias no País favorecem o aparecimento de insetos-pragas nas diversas culturas. Somando-se a isso, nas principais regiões produtoras, chega-se a cultivar até três ciclos anuais de algumas culturas, com sobreposição de plantios ao longo do ano, o que resulta em grande oferta sem interrupção de alimento para os insetos herbívoros. Como as grandes áreas de fronteiras agrícolas plantam essencialmente soja (*Glycine max*), algodão (*Gossypium hirsutum*), milho (*Zea mays*) e feijão (*Phaseolus vulgaris*), as lagartas desfolhadoras migram facilmente entre as culturas, como é o caso da lagarta-falsa-medideira-da-soja (*Chrysodeixis* sp.), que também é uma praga desfolhadora de algodão. A lagarta-do-cartucho (*S. frugiperda*) é praga do milho, mas pode atacar soja, algodão e feijão. De igual modo, a *H. armigera* ataca milho, soja e algodão. O controle dessas pragas agrícolas é feito essencialmente com o uso indiscriminado de inseticidas químicos, o que tem gerado poluição ambiental em todo o planeta, além de causar intoxicação de aplicadores, rios, nascentes e do produto final a ser vendido no mercado, tanto in natura como processado.

Entre os vários agentes de controle biológico, os vírus, principalmente os do grupo dos baculovírus, constituem uma alternativa viável para o controle de pragas de importância agrícola e uma ferramenta fundamental dentro do contexto do MIP.

Como mencionado anteriormente, o interesse pelo uso dos baculovírus como agentes de controle biológico iniciou-se no ano de 1527, quando os baculovírus foram encontrados em estudos da *jaundice disease* do bicho-da-seda *B. mori* (Benz, 1986). Mas os estudos da natureza dessa doença só foram estabelecidos em 1947, deixando claro que esses vírus estavam espalhados pela natureza, e sua ocorrência era entre pragas de importância econômica.

Os baculovírus são mais comuns nos insetos da ordem Lepidoptera e podem ser usados na agricultura em diversas estratégias, conforme explicado em detalhes no Capítulo 1. A primeira estratégia é o controle biológico clássico, no qual há introdução e colonização do patógeno. A introdução de um baculovírus é feita em uma região onde ele não ocorre naturalmente, com o objetivo de estabelecer esse patógeno no ambiente do hospedeiro (praga-alvo) e promover seu controle. Outra estratégia é a introdução inoculativa, em que o patógeno é aplicado, de modo que se multiplique e se dissemine eficientemente no ambiente, controlando o inseto hospedeiro por mais de uma geração e, se necessário, pode ser reaplicado no mesmo ambiente. Há ainda a estratégia do aumento do inóculo do vírus por intervenção do ser humano, por meio de práticas culturais que possam beneficiar o aumento do baculovírus em populações do inseto hospedeiro. Nesse caso, faz-se uma manipulação do ambiente onde há a ocorrência natural de um vírus. A estratégia inundativa, na qual o vírus é aplicado na forma de um inseticida microbiano, é muito utilizada. Nesse caso, o vírus é formulado e aplicado várias vezes, se necessário, da mesma maneira que um inseticida químico, para que se possa manter a praga hospedeira abaixo de níveis de dano econômico para a cultura atacada. Esta última é a estratégia mais utilizada para o controle de pragas em campo por meio de baculovírus, que, nesse caso, pode ser produzido em biofábricas e disponibilizado no mercado.

Segurança do uso de produtos biológicos à base de baculovírus

Estudos extensivos têm sido publicados, os quais confirmam a biossegurança do uso e da aplicação de produtos à base de baculovírus na agricultura (Summers; Kawanishi, 1978; Organisation for Economic Co-Operation and Development, 2002; Lapointe et al., 2012). Em 1980, Burges e colaboradores desenvolveram um trabalho sobre a segurança dos baculovírus, no qual afirmaram que os NPVs são inofensivos ou são incapazes de replicar em microrganismos, em culturas de células de invertebrados que não sejam insetos e em cultura de células de vertebrados, plantas e invertebrados não artrópodes. No final dos anos 1960, um isolado de NPV para o controle da *H. zea* foi submetido a uma série de testes tão rigorosos quanto para os inseticidas químicos recomendados pela OMS (Organização Mundial de Saúde) e pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. Testes foram realizados em primatas e no próprio Homem para efeitos carcinogênicos e teratogênicos. Foram testes extremamente rigorosos para se ter certeza da não infecção de animais vertebrados e humanos com vírus de insetos. Entre os organismos testados, foram incluídos pardais, ratos e outros organismos não alvo (insetos predadores, etc.). Nenhum efeito adverso foi detectado nos organismos testados.

Produção

O processo de desenvolvimento de bioinseticidas envolve muitas pesquisas anteriores à produção, que se inicia com os estudos de identificação e caracterização do agente causador da doença, seguidos, por exemplo, de testes de avaliações e análises de parâmetros, como concentração letal 50 (CL_{50} – concentração necessária para matar 50% da população de insetos), tempo letal 50 (TL_{50} – tempo necessário para matar 50% da população de insetos), produção de poliedros por lagarta, lagarta equivalente (LE/ha – quantidade de lagartas necessárias para se pulverizar 1 ha) e peso equivalente (quantidade de lagartas necessárias para pulverizar 1 ha, em peso). Os resultados desses parâmetros vão servir de orientação para as diversas etapas da produção.

A produção de biopesticidas à base de baculovírus envolve várias etapas, desde a criação do inseto hospedeiro até a formulação final do produto. A primeira etapa é a coleta e o armazenamento das lagartas infectadas com o baculovírus. Quando produzido em larga escala, a liquefação do tegumento da lagarta imediatamente após a sua morte pode ser o principal fator limitante dessa etapa. As larvas mortas se liquefazem, em razão do rompimento do tegumento, e isso faz com que todo o líquido interno se extravase, dificultando a coleta e armazenamento do material.

No caso da produção de bioinseticida para controle da lagarta-do-cartucho-do-milho (*S. frugiperda*), essa limitação foi superada com a descoberta de um isolado viral (*S. frugiperda* MNPV-6NR) que não causa liquefação do tegumento do inseto logo após a sua morte (Macedo et al., 2012). Essa característica é muito importante por reduzir a mão de obra e o custo de produção durante o processo de coleta do material infectado, não havendo necessidade de congelamento imediato das lagartas coletadas.

Nesse ponto do sistema de produção, as lagartas mortas podem ir para as etapas de processamento e formulação ou podem ser congeladas para posterior uso. Esse procedimento depende da disponibilidade de tempo, do pessoal de apoio e do fluxo de produção da biofábrica. As lagartas mortas infectadas com baculovírus permanecem viáveis por mais de um ano quando congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Principais programas de controle biológico de pragas com baculovírus no Brasil

Há vários programas de controle biológico no Brasil e no mundo, nos quais o baculovírus é comercializado como bioinseticida para uso no controle de diversas pragas agrícolas e florestais (Moscardi, 1999; Sosa-Gómez et al., 2008; Hasse et al., 2015).

Porém, é reconhecido também que o sucesso do controle de pragas desses programas, no que diz respeito a reduzir o número de aplicações de inseticidas químicos e minimizar o impacto ambiental, depende da associação de diferentes táticas e procedimentos de ambos os controles químico e biológico aplicados em sistemas de MIP (Moscardi et al., 2011). Essa tecnologia promove o controle racional de pragas e busca manter o equilíbrio dos ecossistemas, garantindo mais qualidade e produtividade no campo.

Lagarta-da-soja – *Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV)

Esse foi o maior programa de controle biológico usando vírus entomopatogênicos no Brasil (Moscardi, 1999, 2007; Moscardi et al., 2011). A lagarta-da-soja (*A. gemmatalis*) é uma das principais pragas da cultura da soja no Brasil e ocorre da Argentina até o sudeste dos Estados Unidos. A aplicação do AgMNPV, produzido pela empresa Coodetec com o apoio de pesquisadores da Embrapa, chegou a quase 2 milhões de hectares de soja no País (Moscardi, 1989, 1999; Moscardi et al., 2011). No entanto, em razão das mudanças nas práticas dos produtores de soja, houve um declínio no uso do AgMNPV o que reduziu drasticamente a produção desse bioinseticida para uma área de aproximadamente 300 mil hectares por ano (Moscardi, 2007). Ainda assim, no que se refere ao uso de vírus de insetos no controle biológico, o AgMNPV é considerado o exemplo de sucesso dos baculovírus pela sua importância tanto na pesquisa básica como aplicada. Extensivos estudos têm sido realizados quanto à identificação morfológica, caracterização genética e molecular, patologia e atividade biológica de diferentes isolados desse vírus. O genoma completo do clone purificado AgMNPV-2D foi publicado em 2006 (Oliveira et al., 2006).

Lagarta-do-cartucho-do-milho – *Spodoptera frugiperda nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV)

A pesquisa sobre o uso do baculovírus SfMNPV para o controle da lagarta-do-cartucho teve início em 1984 na Embrapa, quando, durante um levantamento (1984-1989) de inimigos naturais de *S. frugiperda*, foram encontradas várias lagartas mortas por vírus (Valicente, 1989). Esses vírus foram purificados e depositados em uma coleção de SfMNPV que atualmente conta com 22 isolados amostrados em diversas regiões do Brasil. Esses isolados foram estudados, caracterizados, e sua eficiência foi avaliada em relação à lagarta-do-cartucho (Barreto et al., 2005). Entre os isolados mais estudados e eficientes no controle dessa praga, o SfMNPV-19 foi selecionado e seu genoma totalmente sequenciado (Wolff et al., 2008).

No processo de produção de baculovírus para aplicação nas lavouras, o objetivo é que as lagartas inoculadas em laboratório produzam mais poliedros por lagarta e, conseqüentemente, haja a redução do número de lagartas equivalentes (LE), isto é, o número de lagartas necessárias para pulverizar 1 ha. Para o SfMNPV, Valicente et al. (2013) relatam que entre 12 e 14 lagartas produzem o suficiente para a aplicação em 1 ha de milho. A primeira empresa brasileira a registrar o *Baculovirus spodoptera* foi a Vitae Rural, e o nome comercial do produto é Cartuchovit. Em seguida, a Simbiose, também uma empresa brasileira, registrou produto denominado Vircontrol. Espera-se que o produto seja mantido no mercado, pois, além dessas, três grandes empresas firmaram acordo de parcerias também para a produção desse vírus.

Lagarta-mandarová-da-mandioca – *Erinnyis ello granulovirus* (ErelGV)

O programa do controle do mandarová-da-mandioca com *E. ello granulovirus* (ErelGV) foi implantado pela primeira vez no Brasil em propriedades agrícolas, pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri), na região de Itajaí, SC, com um vírus de granulose (um betabaculovirus), isolado na década de 1980 no estado de Santa Catarina (Schmitt, 1985). Há relatos de emprego do vírus na forma de extrato de lagartas infectadas em cultivos de mandioca em Santa Catarina, Paraná e no Nordeste do Brasil. A produção do vírus era realizada em laboratório, com a coleta de lagartas mortas infectadas pelo vírus; e, posteriormente, era feita a distribuição aos agricultores. Por alguns anos, esse vírus passou a ser produzido também pelo Instituto Agrônômico do Paraná (Iapar), porém não se têm relatos da expansão desse projeto-piloto. Um isolado viral de *E. ello* (L.) *ello*, proveniente de larvas infectadas naturalmente no campo, coletadas, em 1986, em plantações de mandioca no Sul do Brasil, foi caracterizado e seu genoma sequenciado (Ardisson-Araújo et al., 2014).

Lagarta-do-álamo – *Condylorrhiza vestigialis nucleopolyhedrovirus* (CoveNPV)

Outro programa importante e com grande potencial de controle da lagarta-do-álamo [*Condylorrhiza vestigialis* (Guenée)] é o do baculovírus CoveNPV. Esse vírus foi isolado de larvas *C. vestigialis* infectadas naturalmente, identificado, classificado e caracterizado; e seu genoma completo foi sequenciado (Castro et al., 2003, 2009, 2011, 2017). O bioinseticida, registrado em 2013 sob o nome comercial de Baculovirus Álamo (formulação em pó molhável), está sendo usado para combate à praga *C. vestigialis*, em plantações de álamo (*Populus*) no Sul do Brasil. O álamo é plantado em regiões de várzea (cerca de 5,5 mil hectares) nos estados do Paraná e de Santa Catarina. A madeira é usada na indústria de palitos de fósforos, porém a

lagarta-do-álamo causa uma grande desfolha dessas árvores. Na fase inicial desse programa, em 2002, foi possível tratar cerca de 1,0 ha/dia com baculovírus.

Lagarta-falsa-medideira – *Chrysodeixis includens nucleopolyhedrovirus* (ChinNPV)

Mais de 40 isolados de baculovírus para *Chrysodeixis* sp., cuja lagarta é praga de milho, foram testados em laboratórios da Embrapa e há projetos com empresas parceiras para o desenvolvimento de produtos comerciais. Estudos complementares de caracterização biológica e molecular, além de avaliação de patogenicidade de 14 isolados de *Pseudoplusia includens* NPV, espécie reclassificada no gênero *Chrysodeixis*, já foram realizados (Alexandre et al., 2010; Craveiro et al., 2013, 2015, 2016; Costa et al., 2017), e outros estão em desenvolvimento (Costa et al., 2017), visando dar suporte ao uso de baculovírus mais eficazes em sistemas de manejo integrado da praga *C. includens*. A empresa AgBiTech Brasil teve o registro concedido recentemente pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) para produzir um inseticida biológico para o controle das lagartas *C. includens* e *H. armigera*.

Lagarta-do-algodão – *Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus* (HearNPV)

Recentemente identificada no Brasil, a lagarta *H. armigera* foi considerada, até 2013, uma praga quarentenária (Tay et al., 2013). Lagartas foram coletadas em algumas regiões do Brasil assim que o surto dessa praga ocorreu (2012–2013) e foram trazidas para o laboratório. Vários isolados foram descobertos e testados em lagartas sadias, e o mesmo sintoma inicial foi obtido. Para o desenvolvimento de um bioinseticida, foram selecionados isolados de maior virulência e patogenicidade em seus insetos-hospedeiro. Alguns bioinseticidas produzidos a partir do ingrediente ativo à base de baculovírus (VPN-HzSNPV) foram autorizados pelo Mapa e estão sendo testados e usados no controle da praga *H. armigera*.

DESAFIOS E PERSPECTIVAS

A grande vantagem dos baculovírus, que são agentes de controle natural, é que não causam danos à saúde dos aplicadores, não matam inimigos naturais dos insetos-praga, não desestabilizam o meio ambiente e não poluem florestas, rios e nascentes. Esses fatores, aliados à especificidade e à facilidade de manuseio dos baculovírus em relação ao inseto-alvo, fazem desses patógenos um atraente agente de controle biológico. A especificidade dos baculovírus é uma grande vantagem, porém

pode ser considerada uma desvantagem quando se tem um vírus infectando apenas uma espécie de inseto de cada vez.

Outra grande vantagem dos produtos biológicos à base de baculovírus é que eles podem ser aplicados com os mesmos equipamentos usados para aplicação de produtos químicos, porém deve-se respeitar o volume de calda. Esse é um fator que contribui para um baixo custo de aplicação dos baculovírus, uma vez que não necessita de equipamentos especiais. A maioria dos produtos químicos possui compatibilidade com os baculovírus. Dessa forma, o uso dos mesmos equipamentos não é um fator limitante, o que facilita o manejo dentro das propriedades rurais.

Uma das desvantagens do uso do baculovírus é sua ação mais lenta que a dos inseticidas químicos, demorando mais tempo para matar o inseto-alvo. Apesar de uma lagarta contaminada com baculovírus poder reduzir sua alimentação, esse inseto pode levar em torno de 4 dias após a aplicação do bioinseticida para perder sua capacidade de se alimentar. Esse fator pode fazer com que alguns agricultores não vejam o efeito imediato do controle das lagartas pelo baculovírus, por isso, por vezes, demoram a incorporar esse agente de controle dentro do sistema de manejo integrado. De um modo geral, os baculovírus infectam insetos hospedeiros e causam sua morte quando eles se encontram nos estágios iniciais de sua fase larval (até o terceiro/quarto instar). Assim, o estágio de desenvolvimento mais avançado do inseto pode ser um fator limitante no controle da praga. Esse fator se torna mais acentuado, quando se trata de larvas que se alojam em regiões da planta de difícil alcance para a aplicação do inseticida biológico ou mesmo químico, como no caso da lagarta-do-cartucho-do-milho, em que as larvas crescem e se alojam nos cartuchos das plantas.

Vale ressaltar que todo processo de produção de um biopesticida à base de baculovírus é feito em laboratório e que são usadas lagartas sadias provenientes de criação artificial. Nem sempre é fácil completar o ciclo da lagarta em laboratório, quando há fatores limitantes como dieta artificial e temperatura de incubação do inseto após a infecção com baculovírus. Essas dificuldades, aliadas à falta de formulações adequadas, têm tornado os bioinseticidas produzidos relativamente mais caros.

As restrições e as oportunidades de uso de baculovírus na proteção de culturas de importância econômica em sistemas agrícolas e florestais fortalecem o crescente interesse direcionado ao desenvolvimento de pesquisas, desde a taxonomia e a morfologia, passando pela patologia, ecologia e evolução dos baculovírus, até as mais atuais pesquisas genômicas com uso de novas ferramentas e técnicas da bioinformática. Esses avanços têm proporcionado grande aplicabilidade dos baculovírus nas áreas da biotecnologia agrícola, médica, farmacêutica e industrial. As barreiras existentes para o uso mais amplo de baculovírus diante das diversas limitações para

a produção de bioinseticidas mais eficazes são desafios a serem enfrentados e que devem ser tratados como prioridades de pesquisa, uma vez que o panorama atual no Brasil e no mundo é altamente favorável ao controle biológico.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. J.; LEFKOWITZ, E. J.; KING, A. M.; HARRACH, B.; HARRISON, R. L.; KNOWLES, N. J.; KROPINSKI, A. M.; KRUPOVIC, M.; KUHN, J. H.; MUSHEGIAN, A. R. 50 years of the International Committee on Taxonomy of Viruses: progress and prospects. **Archives of Virology**, v. 162, p. 1441-1446, 2017.
- AFONSO, C.; TULMAN, E.; LU, Z.; BALINSKY, C.; MOSER, B.; BECNEL, J.; ROCK, D.; KUTISH, G. Genome sequence of a baculovirus pathogenic for *Culex nigripalpus*. **Journal of Virology**, v. 75, p. 11157-11165, 2001. DOI: 10.1128/JVI.75.22.11157-11165.2001.
- ALEXANDRE, T. M.; RIBEIRO, Z. M. A.; CRAVEIRO, S. R.; CUNHA, F.; FONSECA, I. C.; MOSCARDI, F.; CASTRO, M. E. B. Evaluation of seven viral isolates as potential biocontrol agents against *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) caterpillars. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 105, n. 1, p. 98-104, Sept. 2010. DOI: 10.1016/j.jip.2010.05.015.
- ARAGÃO-SILVA, C. W.; ANDRADE, M. S.; ARDISSON-ARAÚJO, D. M. P.; FERNANDES, J. E. A.; MORGADO, F. S.; BÃO, S. N.; MORAES, R. H. P.; WOLFF, J. L. C.; MELO, F. L.; RIBEIRO, B. M. The complete genome of a baculovirus isolated from an insect of medical interest: *Lonomia obliqua* (Lepidoptera: Saturniidae). **Scientific Reports**, v. 6, art. number 23127, 2016.
- ARDISSON-ARAÚJO, D. M. P.; LIMA, R. N.; MELO, F. L.; CLEM, R. J.; HUANG, N.; BÃO, S. N.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; RIBEIRO, B. M. Genome sequence of *Perigonia lusca single nucleopolyhedrovirus*: insights into the evolution of a nucleotide metabolism enzyme in the family *Baculoviridae*. **Scientific Reports**, v. 6, art. number 24612, June 2016.
- ARDISSON-ARAÚJO, D. M. P.; MELO, F. L.; ANDRADE, M. S.; SIHLER, W.; BÃO, S. N.; RIBEIRO, B. M.; SOUZA, M. L. Genome sequence of *Erinnyis ello granulovirus* (ErelGV), a natural cassava hornworm pesticide and the first sequenced sphingid-infecting betabaculovirus. **BMC Genomics**, v. 15, art. number 856, 2014.
- AYRES, M. D.; HOWARD, S. C.; KUZIO, J.; LOPEZ-FERBER, M.; POSSEE, R. D. The complete DNA sequence of *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. **Virology**, v. 202, n. 2, p. 586-605, 1994. DOI: 10.1006/viro.1994.1380.
- BARRETO, M. R.; GUIMARAES, C. T.; TEIXEIRA, F. F.; PAIVA, E.; VALICENTE, F. H. Effect of *Baculovirus spodoptera* isolates in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and their characterization by RAPD. **Neotropical Entomology**, n. 34, n. 1, p. 67-75, Jan./Feb. 2005. DOI: 10.1590/S1519-566X2005000100010.
- BARRETT, J. W.; BROWNRIGHT, A. J.; PRIMAVERA, M. J.; PALLI, S. R. Studies of the nucleopolyhedrovirus infection process in insects by using the green fluorescence protein as a reporter. **Journal of Virology**, v. 72, n. 4, p. 3377-3382, Apr. 1998.
- BECNEL, J. J.; WHITE, S. E.; MOSER, B. A.; FUKUDA, T.; ROTSTEIN, M. J.; UNDEEN, A. H.; COCKBURN, A. Epizootiology and transmission of a newly discovered baculovirus from the mosquitoes *Culex nigripalpus* and *C. quinquefasciatus*. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 275-282, 2001. DOI: 10.1099/0022-1317-82-2-275.

BENZ, G.A. Introduction: historical perspectives. In: GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. (Ed.). **The biology of baculoviruses**, p.1-35. Boca Raton: CRC, 1986. p. 35.

BIDESI, D. K.; RENAULT, S.; STASIAK, K.; FEDERICI, B. A.; BIGOT, Y. Phylogenetic analysis and possible function of bro-like genes, a multigene family widespread among large double-stranded DNA viruses of invertebrates and bacteria. **Journal of General Virology**, p. v. 84, p. 2531-2544, 2003. DOI: 10.1099/vir.0.19256-0.

BOOGAARD, B.; OERS, M. M. van; LENT, J. W. M. van. An advanced view on baculovirus *per Os* infectivity factors. **Insects**, v. 9, n. 3, p. 1-16, July 2018. DOI: 10.3390/insects9030084.

BRANDT, C. R.; ADANG, M. J.; SPENCE, K. D. S. The peritrophic membrane: Ultrastructural analysis and function as a mechanical barrier to microbial infection in *Orgyia pseudotsugata*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 32, n. 1, p. 12-24, July 1978. DOI: 10.1016/0022-2011(78)90169-6.

BURGES, H. D.; CROIZIER, G.; HUBER, J. A review of safety tests on baculoviruses. **Entomophaga**, v. 25, n. 4, p. 329-340, 1980a.

BURGES, H. D.; HUBER, J.; CROIZIER, G. Guidelines for safety tests on insect viruses. **Entomophaga**, v. 25, n. 4, p. 341-348, 1980b. DOI: 10.1007/BF02374694.

CASTRO M. E. B.; RIBEIRO Z. M. A.; SANTOS A. C. B.; SOUZA, M. L.; MACHADO, E. B.; SOUSA, N. J.; MOSCARDI, F. Identification of a new nucleopolyhedrovirus from naturally-infected *Condylorrhiza vestigialis* (Guenée) (Lepidoptera: Crambidae) larvae on poplar plantations in South Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 102, n. 2, p. 149-154, 2009. DOI: 10.1016/j.jip.2009.07.011.

CASTRO, M. E. B.; PAULA, D. P.; ALMEIDA, G. F.; RIBEIRO, Z. M. A.; SOUZA, M. L.; INGLIS, P. W.; RIBEIRO, B. M. Identification and sequence analysis of the *Condylorrhiza vestigialis* MNPV p74 gene. **Virus Genes**, v. 43, n. 3, p. 471-475, 2011.

CASTRO, M. E. B.; RIBEIRO, B. M. Production of viral progeny in insect cells undergoing apoptosis induced by a mutant *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. **Microbiological Research**, v. 156, n. 4, p. 369-376, 2001. DOI: 10.1078/0944-5013-00122.

CASTRO, M. E. B.; TAGLIARI, M.; MELO, F. L.; INGLIS, P. W.; CRAVEIRO, S. R.; RIBEIRO, Z. M. A.; RIBEIRO, B. M.; BÃO S. N. The genome sequence of *Condylorrhiza vestigialis* NPV, a novel baculovirus for the control of the alamo moth on *Populus* spp. in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 148, p. 152-161, Sept. 2017. DOI: 10.1016/j.jip.2017.06.013.

CLARK, T. E.; CLEM, R. J. Lack of involvement of haemocytes in the establishment and spread of infection in *Spodoptera frugiperda* larvae infected with the baculovirus *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus by intrahaemocoelic injection. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 1565-1572, July 2002. DOI: 10.1099/0022-1317-83-7-1565.

CLEM, R. J. Baculoviruses and apoptosis: a diversity of genes and responses. **Current Drug Targets**, v. 8, n. 10, p. 1069-1074, 2007.

CLEM, R. J.; FECHHEIMER, M.; MILLER, L. K. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. **Science**, v. 254, n. 5036, p. 1388-1390, 1991. DOI: 10.1126/science.1962198.

CLEM, R. J.; PASSARELLI, A. L. Baculoviruses: sophisticated pathogens of insects. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 11e1003729, Nov. 2013. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003729.

CLEM, R. J. Viral IAPs, then and now. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 39, p. 72-79, Mar. 2015. DOI: 10.1016/j.semcd.2015.01.011.

CORDEIRO, B. A.; TIBURCIO, V. H. S.; HALLWASS, M.; PAES, H. C.; RIBEIRO, B. M.; BÃO, S. N. Structural and ultrastructural alterations of Malpighian tubules of *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae infected with different *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus

(AgMNPV) recombinant viruses. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, n. 1, p. 7-19, May 2008. DOI: 0.1016/j.jip.2008.01.001.

CORY, J. S.; GREEN, B. M.; PAUL, R. K.; HUNTER-FUJITA, F. Genotypic and phenotypic diversity of a baculovirus population within an individual insect host. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 89, n. 2, p. 101-111, June 2005. DOI:10.1016/j.jip.2005.03.008.

COSTA, R. A.; SANTOS, L. A. V. M.; RIBEIRO, Z. M. A.; GOMES, A. C. M. M.; SOARES, C. M. S.; CASTRO, M. E. B. **Identificação morfológica e avaliação de infectividade de isolados virais patogênicos à lagarta *Chrysodeixis includens* e em cultivos de células de insetos**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2017. 27 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 328).

CRAVEIRO, S. R.; INGLIS, P. W.; TOGAWA, R. C.; GRYNBERG, P.; MELO, F. L.; RIBEIRO, Z. M.; RIBEIRO, B. M.; BAO, S. N.; CASTRO, M. E. B. The genome sequence of *Pseudoplusia includens* single nucleopolyhedrovirus and an analysis of *p26* gene evolution in the baculoviruses. **BMC Genomics**, v. 16, art. number, 127, 2015.

CRAVEIRO, S. R.; MELO, F. L.; RIBEIRO, Z. M.; RIBEIRO, B. M.; BAO, S. N.; INGLIS, P. W.; CASTRO, M. E. B. *Pseudoplusia includens* single nucleopolyhedrovirus: genetic diversity, phylogeny and hypervariability of the *pif-2* gene. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 114, n. 3, p. 258-267, Nov. 2013. DOI: 10.1016/j.jip.2013.08.005.

CRAVEIRO, S. R.; SANTOS, L. A. V. M.; TOGAWA, R. C.; INGLIS, P. W.; GRYNBERG, P.; RIBEIRO, Z. M. A.; RIBEIRO, B. M.; CASTRO, M. E. B. Complete genome sequences of six *Chrysodeixis includens* nucleopolyhedrovirus isolates from Brazil and Guatemala. **Genome Announcements**, v. 4, n. 6e011, p. 92-16, 2016. DOI: 10.1128/genomeA.01192-16.

DAIMON, T.; SUSUMU, K.; KANG, W.; SHIMADA, T. Comparative studies of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus chitinase and its host ortholog, BmChi-h. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 345, n. 2, p. 825-833, June 2006. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.04.112.

de JONG, J. G.; LAUZON, H. A.; DOMINY, C.; POLOUMIENKO, A.; CARSTENS, E. B.; ARIF, B. M.; KRELL, P. J. Analysis of the *Choristoneura fumiferana* nucleopolyhedrovirus genome. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 929-943, Apr. 2005. DOI: 10.1099/vir.0.80490-0.

DETVISITSKUN, C.; BERRETTA, M. F.; LEHIY, C.; PASSARELLI, A. L. Stimulation of cell motility by a viral fibroblast growth factor homolog: proposal for a role in viral pathogenesis. **Virology**, v. 336, p. 308-317, 2005. DOI: 10.1016/j.virol.2005.03.013.

DETVISITSKUN, C.; CAIN, E. L.; PASSARELLI, A. L. The *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus fibroblast growth factor accelerates host mortality. **Virology**, v. 365, p. 70-78, Aug. 2007. DOI: 10.1016/j.virol.2007.03.027.

ENGELHARD, E. K.; KAM-MORGAN, L. N. W.; WASHBURN, J. O.; VOLKMAN, L. E. The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyedrosis virus. **Microbiology**, v. 91, n. 8, p. 3224-3227, 1994. DOI: 10.1073/pnas.91.8.3224.

ENGELHARD, E. K.; VOLKMAN, L. E. Developmental resistance in fourth instar *Trichoplusia ni* orally inoculated with *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. **Virology**, v. 209, n. 1, p. 384-389, 1995. DOI: 10.1006/viro.1995.1270

FEDERICI, B. A. Baculovirus pathogenesis. In: MILLER, L. K. **The baculoviruses**. California: Springer, 1997. p. 33-59.

FERRELLI, M. L.; BERRETTA, M. F.; BELAICH, M. N.; GHIRINGHELLI, P. D.; SCIOCCO-CAP, A.; ROMANOWSKI, V. The baculoviral genome. In: GARCIA, M. L.; ROMANOWSKI, V. **Viral genomes: molecular structure, diversity, gene expression mechanisms and host-virus interactions**. **InTech**, p. 3-32, Feb. 2012. DOI: 10.5772/32209.

- FLEMING-DAVIES, A. E.; DUKIC, V.; ANDREASEN, V.; DWYER, R. G. Effects of host heterogeneity on pathogen diversity and evolution. **Ecology Letters**, v. 18, p. 1252-1261, Sept. 2015. DOI: 10.1111/ele.12506.
- FU, Y.; CAO, L.; WUB, S.; LIANGA, A. Function analysis and application of IAP1/2 of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus. **RSC Advances**, v. 7, p. 22424, 2017. DOI: 10.1039/C7RA03711B.
- FUXA, J. R. Ecology of insect nucleopolyhedroviruses. **Agriculture Ecosystems and Environment**, v. 103, p. 27-43, June 2004. DOI: 10.1016/j.agee.2003.10.013.
- GARAVAGLIA, M. J.; MIELE, S. A. B.; ISERTE, J. A.; BELAICH, M. N.; GHIRINGHELLI, P. D. The *ac53*, *ac78*, *ac101*, and *ac103* genes are newly discovered core genes in the family *Baculoviridae*. **Journal of Virology**, v. 86, p. 12069-12079, Aug. 2012. DOI: 10.1128/JVI.01873-12.
- GRANADOS R. R.; LAWLER, K. A. In vivo pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. **Virology**, v. 108, n. 2, p. 297-308, Jan. 1981. DOI: 10.1016/0042-6822(81)90438-4.
- GUARINO, L. A.; SUMMERS, M. D. Interspersed homologous DNA of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus enhances delayed-early gene expression. **Journal of Virology**, v. 60, n. 1, p. 215-223, Oct. 1986.
- HAASE, S.; SCIOCCO-CAP, A.; ROMANOWSKI, V. Baculovirus Insecticides in Latin America: historical overview, current status and future perspectives. **Viruses**, v. 7, n. 5, p. 2230-2267, Apr. 2015.
- HARRISON, R. L.; HERNIOU, E. A.; JEHLE, J. A.; THEILMANN, D. A.; BURAND, J. P.; BECNEL, J. J.; KRELL, P. J. M.; OERS, M. van; MOWERY, J. D.; BAUCHAN, G. R. ICTV virus taxonomy profile: *Baculoviridae*. **Journal of General Virology**, v. 99, p. 1185-1186, 2018. DOI: 10.1099/jgv.0.001107.
- HARRISON, R. L.; PUTTLER, B.; POPHAM, H. J. R. Genomic sequence analysis of a fast-killing isolate of *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 775-790, 2008. DOI: 10.1099/vir.0.83566-0.
- HARRISON, R. L.; ROWLEY, D. L.; FUNK C. J. The complete genome sequence of *Plodia interpunctella* granulovirus: evidence for horizontal gene transfer and discovery of an unusual inhibitor-of-apoptosis gene. **Plos One**, v. 11, n. 7e0160389, July 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0160389.
- HAWTIN, R. E.; ZARKOWSKA, T.; ARNOLD, K.; THOMAS, C. J.; GOODAY, G. W.; KING, L. A.; KUZIO, J. A.; POSSEE, R. D. Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. **Virology**, v. 238, n. 2, p. 243-253, Nov. 1997. DOI: 10.1006/viro.1997.8816.
- HAYAKAWA, T.; ROHRMANN, G. F.; HASHIMOTO, Y. Patterns of genome organization and content in lepidopteran baculoviruses. **Virology**, v. 278, n. 5, p.1-12, Dec. 2000.
- HEFFERON, K. L.; OOMENS, A. G. P.; MONSMA, S. A.; FINNERTY, C. M.; BLISSARD, G. W. Host cell receptor binding by baculovirus GP64 and kinetics of virion entry. **Virology**, 258, p. 455-468, June 1999. DOI:10.1006/viro.1999.9758.
- HERNIOU, E. A.; ARIF, B. M.; BECNEL, J. J.; BLISSARD, G. W.; BONNING, B.; HARRISON, R.; JEHLE, J. A.; THEILMANN, D. A.; VLAK, J. M. *Baculoviridae*. In: KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. **Virus taxonomy**: ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Oxford: Elsevier, 2012. p. 163-174.
- HERNIOU, E. A.; JEHLE, J. A. Baculovirus phylogeny and evolution. **Current Drug Targets**, v. 8, n. 10, p. 1043-1050, 2007. DOI: 10.2174/138945007782151306.
- HERNIOU, E. A.; OLSZEWSKI, J. A.; CORY, J. S.; O'REILLY, D. R. The genome sequence and evolution of baculoviruses. **Annual Review of Entomology**, v. 48, p. 211-234, 2003.

- HERNIOU, E. A.; OLSZEWSKI, J. A.; O'REILLY, D. R.; CORY, J. S. Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts. **Journal of Virology**, v. 78, p. 3244-3251, 2004. DOI: 10.1128/JVI.78.7.3244-3251.2004.
- HILTON, S.; WINSTANLEY, D. Identification and functional analysis of the origins of DNA replication in the *Cydia pomonella* granulovirus genome. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 1496-1504, May 2007. DOI:10.1099/vir.0.82760-0.
- HOOVER, K.; GROVE, M.; GARDNER, M.; HUGHES, D. P.; MCNEIL, J.; SLAVICEK, J. A gene for an extended phenotype. **Science**, v. 333, n. 6048, p. 1401, 2011. DOI: 10.1126/science.1209199.
- HOOVER, K.; WASHBURN, J. O.; VOLKMAN, L. E. Midgut-based resistance of *Heliothis virescens* to baculovirus infection mediated by phytochemicals in cotton. **Journal of Insect Physiology**, v. 46, n. 6, p. 999-1007, 2004. DOI: 10.1016/S0022-1910(99)00211-5.
- IJKEL, W. F.; WESTENBERG, M.; GOLDBACH, R. W.; BLISSARD, G. W.; VLAK, J. M.; ZUIDEMA, D. A novel baculovirus envelope fusion protein with a proprotein convertase cleavage site. **Virology**, n. 275, p. 30-41, May 2000. DOI: 10.1006/viro.2000.0483.
- IKEDA, M.; HAMAJIMA, R.; KOBAYASHI, M. Baculoviruses: diversity, evolution and manipulation of insects. **Entomological Science**, v. 18, p. 1-20, 2015. DOI: 10.1111/ens.12105.
- JAVED, M. A.; BISWAS, S.; WILLIS, L. G.; HARRIS, S.; PRITCHARD, C.; OERS, M. M. van; DONLY, B. C.; ERLANDSON, M. A.; HEGEDUS, D. D.; THEILMANN, D. A. Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus AC83 is a *Per Os* infectivity factor (PIF) protein required for occlusion-derived virus (ODV) and budded virus nucleocapsid assembly as well as assembly of the PIF complex in ODV envelopes. **Journal of Virology**, v. 91, n. 5e02115-16, 2007. DOI: 10.1128/JVI.02115-16.
- JEHLE, J. A.; BLISSARD, G. W.; BONNING, B. C.; CORY, J. S.; HERNIOU, E. A.; ROHRMANN, G. F.; THEILMANN, D. A.; THIEM, S. M.; VLAK, J. M. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. **Archives of Virology**, v. 151, n. 7, p. 1257-1266, May 2006.
- JINN T. R.; KAO S. S.; TSENG Y. C.; CHEN Y.J. ; WU T. Y. Aerosol infectivity of a baculovirus to *Trichoplusia ni* larvae: an alternative larval inoculation strategy for recombinant protein production. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 2, p. 384-389, Mar. 2009. DOI:10.1002/btpr.148.
- KAM, P. C.; FERCH, N. I. Apoptosis: mechanisms and clinical implications. **Anaesthesia**, v. 55, p. 1081-1093, Aug. 2000. DOI:10.1046/j.1365-2044.2000.01554.x.
- KAMITA, S. G.; NAGASAKA, K.; CHUA, J. W.; SHIMADA, T.; MITA, K.; KOBAYASHI, M.; MAEDA, S.; HAMMOCK, B. D. A baculovirus-encoded protein tyrosine phosphatase gene induces enhanced locomotory activity in a lepidopteran host. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 2584-2589, Feb. 2005. DOI:10.1073/pnas.0409457102.
- KATSUMA, S. Baculovirus controls host caterpillars by manipulating host physiology and behavior. **AGri-Bioscience Monographs**, v.5, p. 1-27. Jan. 2015. DOI:/10.5047/agbm.2015.00501.0001.
- KATSUMA, S.; DAIMON, T.; MITA, K.; SHIMADA, T., 2006a. Lepidopteran ortholog of *Drosophila* Breathless is a receptor for the baculovirus fibroblast growth factor. **Journal of Virology**, v. 80, n. 1, p. 5474-5481. DOI: 10.1128/JVI.00248-06.
- KATSUMA, S.; HORIE, S.; DAIMON, T.; IWANAGA, M.; SHIMADA, T. In vivo and in vitro analyses of a *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus mutant lacking functional *vfgf*. **Virology**, v. 355, n. 1, p. 62-70, 2006b. DOI: 10.1016/j.virol.2006.07.008.
- KATSUMA, S.; KOBAYASHI, J.; KOYANO, Y.; MATSUDA-IMAI, N.; KANG, W.; SHIMADA, T. Baculovirus-encoded protein BV/ODV-E26 determines tissue tropism and virulence in lepidopteran insects. **Journal of Virology**, v. 86, p. 2545-2555, 2012. DOI: 10.1128/JVI.06308-11.

- KEDDIE, B. A.; VOLKMAN, L. E. Infectivity difference between the two phenotypes of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus: Importance of the 64K envelope glycoprotein. **Journal of General Virology**, v. 66, p. 1195-1200, May 1985. DOI: 10.1099/0022-1317-66-5-1195.
- KENNEDY, D. A.; DWYER, G. Effects of multiple sources of genetic drift on pathogen variation within hosts. **PLoS Biology**, v. 16, n. 3e2004444, Mar. 2018. DOI: 10.1371/journal.pbio.2004444.
- KIRKPATRICK, B. A.; WASHBURN, J. O.; ENGELHARD, E. K.; VOLKMAN, L. E. Primary infection of insect tracheae by *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. **Virology**, v. 203, n. 1, p. 184-186, 1994. DOI: 10.1006/viro.1994.1472.
- KOST, T. A., CONDREAY, J. P.; JARVIS, D. L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v. 23, p. 567-575, May 2005. DOI:10.1038/nbt1095.
- LAPOINTE, R.; THUMBI, D.; LUCAROTTI, C. J. Recent advances in our knowledge of baculovirus molecular biology and its relevance for the registration of baculovirus-based products for insect pest population control. **Integrated Pest Management and Pest Control - Current and Future Tactics**, 2012. Disponível em: <<http://cdn.intechweb.org/pdfs/29618.pdf>>. Acesso em: 29 jul. 2019.
- LEFKOWITZ, E. J.; DEMPSEY, D. M.; HENDRICKSON, R. C.; ORTON, R. J.; SIDDELL, S. G.; SMITH, D. B. 2018. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D708-D717 Oct. 2017. DOI: 10.1093/nar/gkx932.
- LI, X.; LIANG, C. Y.; SONG, J-H.; CHEN, X-W. The ORF 113 of *Helicoverpa armigera* single nucleopolyhedrovirus encodes a functional fibroblast growth factor. **Virologica Sinica**, v. 23, n. 5, p. 321-329, Oct. 2008.
- LIMA, A. A.; ARAGAO, C. W. S.; CASTRO, M.E.B.; OLIVEIRA, J. V. C.; SOSA-GOMEZ, D. R.; RIBEIRO, B. M. A Recombinant *Anticarsia gemmatalis* MNPV harboring *chiA* and *v-cath* genes from *Choristoneura fumiferana* defective NPV induce host liquefaction and increased insecticidal activity. **Plos One**, v. 8, n. 9, e74592, Sept. 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0074592.
- MACEDO, C. V.; TUELHER, E. S.; WOLFF, J. L. C.; VALICENTE, F. H. Characterization of a *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus isolate that does not liquefy the integument of infected larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 111, n. 2, p. 189-192, Oct. 2012. DOI: 10.1016/j.jip.2012.07.010.
- MATOS, T. G. T.; GIUGLIANO, L. G.; RIBEIRO, B. M.; BÁO, S. N. Structural and ultrastructural studies of *Anticarsia gemmatalis* midgut cells infected with the baculovirus *A. gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 28, n. 3, p. 193-199, July 1999.
- MEANS, J. C.; PASSARELLI, A. L. Viral fibroblast growth factor, matrix metalloproteases, and caspases are associated with enhancing infection by baculoviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 21, p. 9825-9830, 2010. DOI: /10.1073/pnas.0913582107.
- MEHRABADI, M.; HUSSAIN, M.; MATINDOOST, L.; ASGARI, S. The baculovirus antiapoptotic p35 protein functions as an inhibitor of the host RNA interference antiviral response. **Journal of Virology**. v. 89, n. 16, p. 8182-8192, Mar. 2015. DOI: 10.1128/JVI.00802-15.
- MIELE, S. A.; GARAVAGLIA, M. J.; BELAICH, M. N.; GHIRINGHELLI, P. D. 2011. Baculovirus: molecular insights on their diversity and conservation. **International Journal of Evolutionary Biology**, p. 379-424, Feb. 2011. DOI: 10.4061/2011/379424.
- MONSMA, S. A.; OOMENS, A. G.; BLISSARD, G. W. The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. **Journal of Virology**, v. 70, n. 7, p. 4607-4616, July 1996.

- MOSCARDI, F. A nucleopolyhedrovirus for control of the velvetbean caterpillar in Brazilian soybeans. In: VINCENT, C.; GOETHEL, M. S.; LAZAROVITS, G. (Ed.). **Biological Control: a global perspective**. Oxfordshire: CAB International, 2007. p. 344-352.
- MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for the control of Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, v. 44, p. 257-289, Jan. 1999. DOI: 10.1146/annurev.ento.44.1.257.
- Moscardi, F. Use of viruses for pest control in Brazil: the case of the nuclear polyhedrosis virus of the soybean caterpillar. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, Supl. III, p. 51-56, 1989.
- MOSCARDI, F.; SOUZA, M. L.; CASTRO, M. E. B.; MOSCARDI, M.; SZEWCZYK, B. Baculovirus pesticides: present state and future perspectives. In: AHMAD, I.; AHMAD, F.; PICHTEL, P. (Ed.). **Microbes and microbial technology**. New York: Springer, 2011. p. 415-445.
- MUELLER, J.; PFANZELTER, J.; WINKLER, C.; NARITA, A. LECLAINCHE, C.; NEMETHOVA, M.; CARLIER, M. F.; MAEDA, Y.; WELCH, M. D.; OHKAWA, T.; SCHMEISER, C.; RESCH, G. P.; SMALL, J. V. In: AHMAD I., AHMAD F., PICHTEL P. (Ed.). Electron tomography and simulation of baculovirus actin comet tails support a tethered filament model of pathogen propulsion. **PLoS Biology**, v. 12, n. 1e1001765, Jan. 2014. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001765.
- O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K. A baculovirus blocks insect molting by producing *ecdysteroid UDP-glucosyl transferase*. **Science**, v. 245, n. 4922, p. 1110-1112, 1989. DOI: 10.1126/science.2505387.
- OGEMBO, J. G.; CHAEYCHOMSRI, S.; KAMIYA, K.; ISHIKAWA, H.; KATOU, Y.; IKEDA, M.; KOBAYASHI, M. Cloning and comparative characterization of nucleopolyhedroviruses isolated from African bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in different geographic regions. **Journal of Insect Biotechnology and Sericology**, v. 76, n. 1, p. 39-49, 2007. DOI: 10.11416/jibs.76.1_39.
- OHKAWA, T.; VOLKMAN, L. E.; WELCH, M. D. Actin-based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface. **Journal of Cell Biology**, v. 190, n. 2, p. 187-195, 2010. DOI: 10.1083/jcb.201001162.
- OLIVEIRA, J. V. C.; WOLFF, J. L. C.; GARCIA-MARUNIAK, A.; RIBEIRO, B. M.; CASTRO, M. E. B.; SOUZA, M. L.; MOSCARDI, F.; MARUNIAK, J. E.; ZANOTTO, P. M. Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 3233-3250, 2006. DOI: 10.1099/vir.0.82161-0.
- O'REILLY, D. R. Baculovirus-encoded Ecdysteroid UDP-glucosyltransferases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 25, p. 541-550, 1995.
- O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K. Improvement of a baculovirus pesticide by deletion of the *EGT* Gene. **Biotechnology**, v. 9, p. 1086-1089, 1991.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Consensus document on information used in the assessment of environmental applications involving baculoviruses**. Paris, 2002. (Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology, 20).
- ORNITZ, D. M.; ITOH, N. Fibroblast growth factors. **Genome Biology**, n. 2, art. number 3005.1, 2001.
- PASSARELLI, A. L. Barriers to success: how baculoviruses establish efficient systemic infections. **Virology**, v. 411, n. 2, p. 383-392, 2011. DOI: 10.1016/j.virol.2011.01.009.
- PEARSON, M. N.; GROTEN, C.; ROHRMANN, G. F. Identification of the *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus envelope fusion protein provides evidence for a phylogenetic division of the Baculoviridae. **Journal of Virology**, v. 74, n. 3, p. 6126-6131, 2000.
- PEARSON, M.; BJORNSON, R.; PEARSON, G.; ROHRMANN, G. The *Autographa californica* baculovirus genome: evidence for multiple replication origins. **Science**, v. 257, n. 5075, p. 1382-1384, 1992. DOI: 10.1126/science.1529337.

PENG, K.; VAN OERS, M. M.; HU, Z. H.; VAN LENT, J. W. M.; VLAK, J. M. Baculovirus *per Os* infectivity factors form a complex on the surface of occlusion-derived virus. **Journal of Virology**, v. 84, n. 18, p. 9497-9504, Sept. 2010. DOI: 10.1128/JVI.00812-10.

PETERSON, A. T. Defining viral species: making taxonomy useful. **Virology Journal**, v. 11, art. number 131, 2014.

PINEDO, F. J. R.; MOSCARDI, F.; LUQUE, T.; OLSZEWSKI, J. A.; RIBEIRO, B. M. Inactivation of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (*egt*) gene of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) improves its virulence towards its insect host. **Biological Control**, v. 27, n. 3, p. 336-344, July 2003. DOI: 10.1016/S1049-9644(03)00026-4.

POMBO, V.; VELLOSO, L. M.; RIBEIRO, B. M.; BÁO, S. N. Structural and ultrastructural changes during the infection of UFL-AG-286 cells with the baculovirus AgMNPV. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 72, n. 3, p. 239-245, 1998. DOI: 10.1006/jipa.1998.4788.

RAFAEL, J. A.; MELO, G. A.; CASARI, S. A.; CONSTANTINO, R. **Insetos do Brasil, diversidade e taxonomia**. Ribeirão Preto: Holos, 2012. 795 p.

REDDY, J. T.; LOCKE, M. The size limited penetration of gold particles through insect basal laminae. **Journal of Insect Physiology**, v. 36, n. 6, p. 397-408, 1990. DOI: 10.1016/0022-1910(90)90057-M.

ROHRMANN, G. F. **Baculovirus molecular biology**. 4th edition. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2019.

ROHRMANN, G. F. Polyhedrin structure. **Journal of General Virology**, v. 67, p. 1499-1513, 1986. DOI: 10.1099/0022-1317-67-8-1499

SANTOS, L. A. V. M.; RIBEIRO, Z. M. A.; FERNANDES, L. S. P.; FERREIRA, A. C. Q.; MOTA, I. S.; GOMES, A. C. M. M.; CRAVEIRO, S. R.; CASTRO, M. E. B. **Análise de patogenicidade de isolados *Chrysodeixis includens* NPV para uso na produção de bioinseticidas**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2019. 22 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 349).

SASAKI, T.; FASSLER, R.; HOHENESTER, E. Laminin: the crux of basement membrane assembly. **Journal of Cell Biology**, v. 164, p. 959-963, Mar. 2004. DOI: 10.1083/jcb.200401058.

SCHMITT, A. T. **Eficiência da aplicação de Baculovirus erinnyis no controle do mandaróvã da mandioca**. Florianópolis: Empasc, 1985. 7 p. (EMPASC. Comunicado técnico, 88).

SHACKELTON, L. A.; HOLMES, E. C. The evolution of large DNA viruses: combining genomic information of viruses and their hosts. **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 10, p. 458-465, Oct. 2004. DOI: 10.1016/j.tim.2004.08.005.

SHENG, Z.; CHARBONNEAU, H. The baculovirus *Autographa californica* encodes a protein tyrosine phosphatase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 4728-4733, 1993.

SILVEIRA, E. B.; CORDEIRO, B. A.; RIBEIRO, B. M.; BÁO, S. N. Morphological characterization of *Anticarsia gemmatalis* M nucleopolyhedrovirus infection in haemocytes from its natural larval host, the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Tissue & Cell**, n. 36, p. 171-180, 2004.

SILVEIRA, E. B.; CORDEIRO, B. A.; RIBEIRO, B. M.; CASTRO, M. E. B.; SOARES, E. F.; BÁO, S. N. An *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus mutant, vApAg, induces hemocytes apoptosis in vivo and displays reduced infectivity in larvae of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Virus Research**, v. 130, n. 1-2, p. 182-192, Dec. 2007. DOI: 10.1016/j.virusres.2007.06.010.

SILVEIRA, E. B.; RIBEIRO, B. M.; BÁO, S. N. Characterization of larval haemocytes from the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 35, n. 2, p. 129-139, 2003.

SIMMONDS, P.; ADAMS, M. J.; BENKO, M.; BREITBART, M.; BRISTER, J. R. Consensus statement: virus taxonomy in the age of metagenomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, p. 161-168, 2017. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.177.

SLACK, J. M.; KUZIO, J.; FAULKNER, P. Characterization of v-cath, a cathepsin L-like proteinase expressed by the baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 1091-1098, 1995. DOI: 10.1099/0022-1317-76-5-1091.

SOARES, J. S.; RIBEIRO, B. M. Pathology of *Anticarsia gemmatalis* larvae infected by to recombinant *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedroviruses. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 2, p. 263-269, 2005. DOI: 10.1016/j.resmic.2004.09.015.

SOSA-GOMEZ, D. R.; MOSCARDI, F.; SANTOS, B. Produção e uso de vírus para o controle de pragas na América Latina. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. (Ed.). **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: Fealq, 2008. v. 14, p. 49-68.

STORK, N. E. How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on earth? **Annual Review of Entomology**, v. 63, p. 31-45, Jan. 2018. DOI: 10.1146/annurev-ento-020117-043348.

SUMMERS, M. D.; KAWANISHI, C. Y. **Viral pesticides**: present knowledge and potential effects on public and environmental health: symposium proceedings. [S.l.]: Environmental Protection Agency, 1978.

SUTHERLAND, D.; SAMAKOVLIS, C.; KRASNOW, M. A. *Branchless* encodes a *Drosophila* FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching. **Cell**, v. 87, n. 6, p. 871091-1101, Dec. 1996. DOI: /10.1016/S0092-8674(00)81803-6.

TAY, W. T.; SORIA, M. F.; WALSH, T.; THOMAZONI, D.; SILVIE, P.; BEHERE, G. T.; ANDERSON, C.; DOWNES, S. A brave new world for an old world pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **PLoS One**, n. 8, n. 11e80134, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0080134.

THÉZÉ, J.; BÉZIER, A.; PERIQUET, G.; DREZEN, J.M.; HERNIOU, E. A. Paleozoic origin of insect large dsDNA viruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 3, p. 15931-15935, 2011. DOI: 10.1073/pnas.1105580108.

TRUDEAU, D.; WASHBURN, J. O.; VOLKMAN, L. E. Central role of hemocytes in *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus pathogenesis in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea*. **Journal of Virology**, v. 75, p. 996-1003, 2001.

VALICENTE, F. H. Levantamento dos inimigos naturais de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes regiões do estado de Minas Gerais. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 18, n. 1, p.119-127, 1989.

VALICENTE, F. H.; TUELHER, E. S.; PENA, R. C.; ANDREAZZA, R.; GUIMARÃES, M. R. F. Cannibalism and virus production in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae fed with two leaf substrates inoculated with *Baculovirus spodoptera*. **Neotropical Entomology**, v. 42, p. 191, 2013.

VOLKMAN, L. E.; KEDDIE, B. A. Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis. **Seminars in Virology**, v. 1, p. 249-256, 1990.

WANG, P.; GRANADOS, R. R. An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 6977-6982, June 1997. DOI: 10.1073/pnas.94.13.6977.

WANG, Y.; BININDA-EMONDS, O. R. P.; OERS, M. M. van; VLAK, J. M.; JEHLE, J. A. The genome of *Oryctes rhinoceros* nudivirus provides novel insight into the evolution of nuclear arthropod-specific large circular double-stranded DNA viruses. **Virus Genes**, v. 42, n. 3, p. 444-456, Mar. 2011.

WASHBURN, J. O.; KIRKPATRICK, B. A.; HYRIEN, O.; VOLKMAN L. E. Comparative pathogenesis of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus in larvae of *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens*. **Virology**, v. 209, n. 2, p. 561-568, June 1995. DOI: 10.1006/viro.1995.1288.

WASHBURN, J. O.; LYONS, E. H.; HAAS-STAPLETON, E. J.; VOLKMAN, L. E. Multiple nucleocapsid packaging of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus accelerates the onset of systemic infection in *Trichoplusia ni*. **Journal of Virology**, v. 73, p. 411-416, Jan. 1999.

WESTENBERG, M.; UIJTDEWILLIGEN, P.; VLAK, J. M. Baculovirus envelope fusion proteins F and GP64 exploit distinct receptors to gain entry into cultured insect cells. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 3302-3306, 2007. DOI: 10.1099/vir.0.83240-0.

WILLIAMS, G. V.; FAULKNER, P. Cytological changes and viral morphogenesis during baculovirus infection. In: MILLER, L. K. (Ed.). **The baculoviruses**. New York: Plenum Press, 1997. p. 61-108.

WOLFERSBERG, M. G.; SPAERTH, D. D.; DOW, J. A. T. Observation of the interaction of baculoviruses with the peritrophic membrane of lepidopteran. **American Zoologist**, v. 26, p.74, 1996.

WOLFF, J. L. C.; VALICENTE, F. H.; MARTINS, R.; OLIVEIRA, J. V. D. C.; ZANOTTO, P. M. D. A. Analysis of the genome of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SfMNPV-19) and of the high genomic heterogeneity in group II nucleopolyhedroviruses. **Journal of General Virology**, v. 89, p.1202-1211, 2008.

ZANOTTO, P. M.; KESSING, B. D.; MARUNIAK, J. E. Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 62, n. 2, p. 147-164, Sept. 1993. DOI: 10.1006/jjpa.1993.1090

ZHANG, H.; YU, X. K.; LU, X. Y.; ZHANG, J. Q.; ZHOU, Z. H. Molecular interactions and viral stability revealed by structural analysis of chemically treated cypovirus. **Virology**, v. 298, p. 45-52, 2002. DOI: 10.1006/viro.2002.1473.

ZHENG, Q.; SHEN, Y.; KON, X.; ZHANG, J.; FENG, M.; WU, X. Protein-protein interactions of the baculovirus *per Os* infectivity factors (PIFs) in the PIF complex. **Journal of General Virology**, v. 98, p. 853-861, 2007. DOI: 10.1099/jgv.0.000730.