



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

*Análise Citopatológica de Células de Inseto
Infectadas com Baculovírus Mutantes*

Cláudia Natércia Lima Acácio

**Brasília
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



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

Cláudia Natércia Lima Acácio

*Análise Citopatológica de Células de Inseto
Infectadas com Baculovírus Mutantes*

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sônia Nair Bão

Co-orientador: Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro

**Brasília
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA

Acácio, Cláudia Natércia Lima

Análise citopatológica de células de insetos infectadas com baculovírus mutantes / Cláudia Natércia Lima Acácio. – Brasília, DF: [s.n.], 2008.

Orientadora: Sônia Nair Bão

Co-orientador: Bergmann Morais Ribeiro

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília.

Instituto de Ciências Biológicas.

1. Baculovírus. 2. Poliedrina. 3. Apoptose.

I. Bão, Sônia Nair. II. Ribeiro, Bergmann Morais.

III. Universidade de Brasília. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

Cláudia Natércia Lima Acácio

**Análise Citopatológica de Células de Inseto
Infectadas com Baculovírus Mutantes**

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

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Sônia Nair Bão - UnB

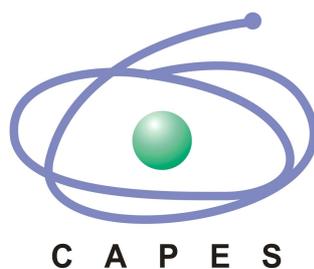
Dr^a. Eni Braga da Silveira - Rede Sarah de Hospitais

Prof^a. Dr^a. Silene de Paulino Lozzi - UnB

Dr. Francisco José Rivera Pinedo - Embrapa

*“Tu, Senhor e Deus nosso,
és digno de receber
a glória, a honra e o poder,
porque criaste todas as coisas,
e por tua vontade elas existem
e foram criadas” (Ap 4.11).*

Trabalho realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia Molecular da Universidade de Brasília, com o apoio financeiro das seguintes instituições:



AGRADECIMENTOS

Ao **povo brasileiro**, gente humilde e digna, por financiar, indiretamente, toda minha formação escolar e acadêmica;

À **Universidade de Brasília**, pelas grandes oportunidades de crescimento, não só acadêmico, como pessoal, ao longo desses sete anos;

Aos meus prezados e queridos orientadores, **Prof^a. Dr^a. Sônia Nair Bão** e **Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro**, por me abrirem as portas do **Laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia – UnB** e me concederem a preciosa oportunidade de cursar um mestrado. O que fica de mais importante não é somente o conhecimento científico, mas a vivência com pessoas tão competentes e humanas;

Aos **professores da pós-graduação em Biologia Molecular – UnB**, por terem me fornecido o embasamento teórico necessário para a realização do mestrado.

À **Prof^a. Dr.^a Cláudia Renata (*in memoriam*)**, pelo seu exemplo de vida;

Ao querido **Prof. Dr. Renato Resende**, coordenador da pós-graduação, por ser sempre atencioso e solícito;

À **Ana**, secretária da pós-graduação, por ser tão prestativa e solidária;

Aos **meus pais**, meus primeiros professores, pelo amor eterno e incondicional que me trouxe suporte para vencer os desafios da vida;

A **todos os meus familiares e amigos**, pelo carinho e incentivo de sempre;

Ao meu amado, **Leonardo**. A ele, mais que palavras... ;

Aos **meus amados filhinhos**... Meu primogênito **Calel**, por ter sido um rapazinho tão compreensivo e carinhoso, por ter me surpreendido e incentivado com frases como: “Mamãe, você não vai desistir!”. E ao meu companheirinho inseparável dos últimos nove meses de mestrado, **Maximus**.

A **todos os meus queridos e inesquecíveis amigos de Laboratório**, sem os quais este trabalho não teria sido possível...

A **todo o grupo de pesquisa da Prof^a. Sônia**, pelo acolhimento e imprescindível suporte, em especial: à talentosa **Khesller**, por sua indispensável ajuda no MET, por ter feito verdadeiros milagres, tirando resultados de onde parecia não haver nada; ao **Bruno A.**, pelos valiosos conselhos e dicas; ao **Bruno F.**, pela ajuda na montagem das pranchas e pela enorme paciência; ao **João Victor**, por ter gentilmente me ajudado no processamento para MEV; ao **Phúblio e Victor Tibúrcio** pela essencial ajuda no MEV e no Axiophot; à **Larissa**, pelo grande auxílio na imunocitoquímica, à **Mayarina**, por ter me auxiliado em vários momentos com tão boa vontade; às colegas **Elaine, Ju e Juliana**, pela ajuda mútua; e às amigas **Shélida, Leonora e Marcela**, pelo companheirismo e apóio moral.

Aos **bacutecos: Glaucinha, Anabele, Aline, Michele, Maria, Tatiane, Greice, Kênia, jú, Juliana, Camila, Paulinho, Breninho, Roberto, Hugo, Davi, Ramon, Marcelo, Márcio Hedil, André e Fabrício.doc**, pela ajuda de todo o tipo, por terem tornado meus dias de mestrado mais fáceis e felizes; em especial, à **minha grande amiga Gigi**, por, literalmente, ter chorado comigo nos momentos difíceis, por ser uma pessoa tão maravilhosa.

Aos **saudosos bacutecos: Thatinha, Nayara, Susane, Myrce, Dany, Raimundo, Pinedo, Zezinho e Miguel**, por terem me ensinado, na prática, as primeiras técnicas básicas em virologia molecular e microscopia, pela amizade; em especial, à **Ana Paula Generino**, por ter identificado e pré-analisado os vírus mutantes com os quais trabalhei;

E aos funcionários **Wellington** (técnico) e **D^a. Iraci** (limpeza) pela ótima manutenção do laboratório;

Minha mais sincera gratidão!

RESUMO

Avanços nas técnicas de cultura de células têm possibilitado o isolamento e precisa caracterização de baculovírus mutantes. A maioria desses mutantes é derivada do vírus AcMNPV (*Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*), principalmente pela sua facilidade de propagação e estabilidade em cultura de células. Durante a rotina de purificação de um baculovírus recombinante, dois vírus mutantes derivados de AcMNPV, o vSynlitx1B12P (MutPolh) e o vSynlitx1G4 (MutApo) foram isolados (dados não publicados). A infecção pelo MutPolh não resultava na produção de poliedros e diferia da infecção tipo selvagem pela presença de massas protéicas dispersas no citoplasma. Para explicar esse fenótipo, o vírus MutPolh foi previamente investigado e análises moleculares revelaram uma mutação pontual no gene da poliedrina. Esse gene é altamente conservado entre os baculovírus e mudanças em sua seqüência nucleotídica podem levar à formação de poliedros mutantes, morfologicamente distintos do tipo-selvagem. O outro vírus mutante, o MutApo, mostrou induzir rápida e massiva morte nas células por ele infectadas. Esse mutante também foi investigado através de técnicas moleculares e foi encontrada uma inserção de DNA interrompendo um gene inibidor de apoptose (*p35*). Neste trabalho analisaram-se os efeitos citopatológicos desses dois mutantes em células de inseto das linhagens Sf-21 e Tn-5B. Estudos estruturais e ultra-estruturais confirmaram os resultados das análises moleculares prévias feitas para esses mutantes. As observações ultra-estruturais feitas em células infectadas pelo MutPolh submetidas a imunomarcação mostraram que os agregados protéicos encontrados no citoplasma dessas células eram, de fato, acúmulo de poliedrina não cristalizada. Ainda, o mutante MutApo mostrou induzir eventos característicos da apoptose nas células dessas linhagens.

Palavras-chave: Baculovírus. Poliedrina. Apoptose.

ABSTRACT

Advances in cell culture techniques allowed the isolation and precise characterization of baculoviruses mutants. The majority of these mutants is derived from the virus AcMNPV, mainly due to its facility of propagation and stability in cell culture. During the purification routine of a recombinant baculovirus, two mutants derived from AcMNPV, vSynlitx1B12P (MutPolh) and vSynlitx1G4 (MutApo) were isolated (unpublished). The insect cell by the MutPolh did not result in polyhedra production and differed from wild-type infection by the presence of proteinaceous masses dispersed in the cytoplasm. To explain this phenotype, the virus MutPolh was previously investigated and molecular analysis revealed a point mutation in the polyhedrin gene. This gene is highly conserved among baculoviruses and changes in its nucleotide sequence may lead to mutant polyhedra, morphologically different from the wild-type. The other mutant virus, MutApo, was show to induce quick and massive cell death in infected cells. This mutant was also investigated and was found a DNA insertion interrupting an inhibitor of apoptosis gene (*p35*). In this work, the cytopathologic effects induced by these two mutants in Sf-21 and Tn-5B insect cell lines were analyzed. Structural and ultrastructural studies confirmed the findings of the molecular analysis previously done for these mutants. The observation of MutPolh-infected cells revealed that the proteinaceous aggregates found in the cytoplasm were, actually, accumulation of uncrystalized polyhedrin. Observations of cells infected by the MutApo mutant also confirmed previous information, showing that this mutant induces characteristic apoptosis events in these insect cell lines.

Key-words: Baculovirus. Polyhedrin. Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

1.	Árvore filogenética baseada no alinhamento de 29 genes comuns identificados nos 29 genomas de baculovírus já seqüenciados	19
2.	Representação esquemática da estrutura dos baculovírus	21
3.	Esquema da infecção de um lepidóptero por um baculovírus	23
4.	Ciclo citopatológico dos baculovírus	26
5.	Modelo de poliedro de cypovirus.....	29
6.	A Ativação de pró-caspases e a cascata de caspases envolvida na apoptose	32
7.	Vias de apoptose induzidas por baculovírus em células SF-21.....	33
8.	Posições relativas dos domínios BIR e RING de IAP	37
9.	Efeitos dos genes anti-apoptóticos <i>p35</i> e <i>iap</i> na patogênese dos baculovírus	39
10.	Representação esquemática de recombinação homóloga entre o vetor de transferência pSynlitx1 e o vírus parental vSynVI-gal, por recombinação homóloga	43
11.	Representação esquemática da estrutura gênica dos vírus utilizados.....	46
12.	Micrografias de cultura de células Tn-5B não infectadas ou infectadas por AcMNPV tipo-selvagem, vSynlitx1 ou PolhRev, a 72h p.i., ou por MutPolh a 48 e 72h p.i.	55
13.	Micrografias de cultura de células Sf-21 não infectadas ou infectadas por AcMNPV tipo-selvagem, vSynlitx1 ou PolhRev, a 72h p.i., ou MutPolh a 48 e 72h p.i.	57
14.	Micrografias eletrônicas de célula Tn-5B não infectada ou infectada por AcMNPV tipo-selvagem, a 72h p.i., ou por MutPolh a 48h p.i.	60
15.	Micrografias eletrônicas de células Tn-5B infectadas por MutPolh a 72h p.i. e a 96h p.i.	61
16.	Micrografias eletrônicas de célula Sf-21 não infectada ou infectada por vSynlitx1, a 72h p.i., ou por MutPolh, a 48 e a 72h p.i.	63
17.	Micrografias eletrônicas de transmissão mostrando o resultado da imunomarcção contra poliedrina feita em células Tn-5B infectadas com o vírus MutPolh ou com Acwt, a 72h p.i.	66

18. Gel SDS-PAGE contendo amostras de extratos de células Tn-5B não infectadas ou infectadas com Acwt, VSynlitx1, MutPolh ou PolhRev, a 72h p.i.	68
19. Micrografias de cultura de células Tn-5B e Sf-21 infectadas pelo vírus mutante MutApo, a 24h p.i. e 48h p.i.	70
20. Micrografias eletrônicas de células Tn-5B e Sf-21 infectadas pelo vírus mutante MutApo, a 24h p.i. e 48h p.i.	73
21. Micrografias eletrônicas de varredura de células Tn-5B não infectadas ou infectadas com o vírus mutante MutApo, a 24h p.i.	75
22. Micrografias eletrônicas de varredura de células Sf-21 não infectadas ou infectadas com o vírus mutante MutApo, a 24h p.i.	76

LISTA DE QUADROS

1. Relação dos vírus utilizados neste trabalho e suas características 46
2. Tipos de microscopia x tempos x vírus utilizados para células Tn-5B 51
3. Tipos de microscopia x tempos x vírus utilizados para células Sf-21 51
4. Esquema comparativo mostrando fenótipos de vírus mutantes
expressando poliedros morfologicamente anormais 79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

h	hora
min	minuto
s	segundo
p.i.	pós-infecção
h p.i.	horas pós-infecção
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kb	quilobase = 1000 pares de base
kDa	quilodalton
L	litro
mL	mililitro
μ L	microlitro= 10^{-6} litro
M	molar: mol/L
mM	milimolar
kV	quilovolt
pH	potencial de hidrogênio
rpm	rotação por minuto
°C	grau Celsius
U	unidade enzimática
pfu	unidade formadora de placa
pb	pares de base
PCR	reação de polimerase em cadeia
Ppolh	promotor do gene da poliedrina
PSyn	promotor sintético derivado do promotor do gene da poliedrina
PXIV	promotor derivado do promotor do gene da poliedrina
cDNA	DNA complementar
DNA	ácido desoxiribonucléico
RNA	ácido ribonucléico
SDS	dodecilsulfato de sódio
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético

CO ₂	dióxido de Carbono
PBS	solução salina tamponada com fosfato
BSA	albumina bovina sérica
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliácridamida desnaturante em SDS
Tris	N,N,N',N'-tetrametil etilenodiamina
Polh	poliedrina
MO	Microscopia Ótica
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo
vSynVI-gal	vírus -galactosidase no locus do gene da poliedrina
Tn-5B	linhagem celular derivada de <i>Trichoplusia</i> ni
Sf-21	linhagem celular derivada de <i>Spodoptera frugiperda</i>
NPV	Nucleopolyhedrovirus
MNPV	Multiple Nucleopolyhedrovirus
SNPV	Single Nucleopolyhedrovirus
GV	Granulovirus
AcMNPV	<i>Autographa californica</i> MNPV
AgMNPV	<i>Anticarsia gemmatalis</i> MNPV
CfMNPV	<i>Choristoneura fumiferana</i> MNPV
CfDEFNPV	<i>Choristoneura fumiferana</i> DEF NPV
RoMNPV	<i>Rachiplusia ou</i> MNPV
BmNPV	<i>Bombyx mori</i> NPV
EppoNPV	<i>Epiphyas postvittana</i> NPV
OpMNPV	<i>Orgyia pseudotsugata</i> MNPV
AdhoNPV	<i>Adoxophyes honmai</i> NPV
AgseNPV	<i>Agrotis segetum</i> MNPV
ChChNPV	<i>Chrysodeixis chalcites</i> NPV
HearNPV (G4)	<i>Helicoverpa armigera</i> NPV (G4)
HearNPV (C1)	<i>Helicoverpa armigera</i> NPV (C1)
HzSNPV	<i>Helicoverpa zea</i> SNPV
MacoNPV (A)	<i>Mamestra configurata</i> NPV (A)

MacoNPV (B)	<i>Mamestra configurata</i> NPV (B)
LdMNPV	<i>Lymantria dispar</i> MNPV
SeMNPV	<i>Spodoptera exigua</i> MNPV
SpltNPV	<i>Spodoptera litura</i> NPV
TnSNPV	<i>Trichoplusia ni</i> SNPV
CrleGV	<i>Cryptophlebia leucotreta</i> GV
CpGV	<i>Cydia pomonella</i> GV
PhopGV	<i>Phthorimea operculella</i> GV
PlxyGV	<i>Plutella xylostella</i> GV
AdorGV	<i>Adoxophyes orana</i> GV
XecnGV	<i>Xestia c-nigrum</i> GV
AgseGV	<i>Agrotis segetum</i> GV
NeleNPV	<i>Neodiprion lecontei</i> NPV
NeseNPV	<i>Neodiprion sertifer</i> NPV
CuniNPV	<i>Culex nigripalpus</i> NPV

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
1.1.	BACULOVÍRUS	17
1.1.1.	Aspectos gerais e importância biotecnológica	17
1.1.2.	Estrutura e modo de infecção	21
1.1.3.	Citopatologia da infecção	24
1.1.4.	Regulação da expressão gênica	26
1.2.	POLIEDRINA	27
1.2.1.	Trânsito de poliedrina e formação de poliedros	30
1.3.	APOPTOSE	31
1.4.	APOPTOSE E BACULOVÍRUS	32
1.4.1.	P35	35
1.4.2.	IAP	36
1.4.3.	Influência da apoptose na patogênese viral	38
1.5.	CONTEXTO E OBJETIVO	40
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	42
2.1.	LINHAGENS CELULARES	42
2.2.	VÍRUS	42
2.2.1.	vSynlitx1	42
2.2.2.	vSynlitx1G4 (MutApo)	44
2.2.3.	vSynlitx1B12P (MutPolh)	44
2.2.4.	vSynpolhrevC7 (PolhRev)	45
2.3.	INFECÇÕES	47
2.4.	ANÁLISE ESTRUTURAL DE CÉLULAS INFECTADAS	47
2.4.1.	Microscopia de luz invertida	47
2.4.2.	Microscopia de contraste interferencial diferencial (DIC)	47
2.5.	ANÁLISE ULTRA-ESTRUTURAL DE CÉLULAS INFECTADAS	48
2.5.1.	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	48
2.5.2.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	49
2.5.3.	Imunocitoquímica	49
2.6.	ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE POLIEDRINA POR SDS-PAGE	52

3.	RESULTADOS	53
3.1.	ANÁLISE ESTRUTURAL, ULTRA-ESTRUTURAL E BIOQUÍMICA DA INFECCÃO PELO BACULOVÍRUS MUTANTE MutPolh	53
3.1.1.	Microscopia de luz	53
3.1.1.1.	Células Tn-5B	53
3.1.1.2.	Células Sf-21	56
3.1.2.	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	58
3.1.2.1.	Células Tn-5B	58
3.1.2.2.	Células Sf-21	62
3.1.3.	Imunocitoquímica	65
3.1.4.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	67
3.2.	ANÁLISE ESTRUTURAL E ULTRA-ESTRUTURAL DA INFECCÃO PELO BACULOVÍRUS MUTANTE MutApo	69
3.2.1.	Microscopia de luz	69
3.2.2.	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	71
3.2.3.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	74
4.	DISCUSSÃO	77
4.1.	ANÁLISE DA INFECCÃO PELO BACULOVÍRUS MUTANTE MutPolh EM CÉLULAS DE INSETO	77
4.2.	ANÁLISE DA INFECCÃO PELO BACULOVÍRUS MUTANTE MutApo EM CÉLULAS DE INSETO	82
5.	CONCLUSÃO	86
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

1. INTRODUÇÃO

1.1. BACULOVÍRUS

1.1.1. Aspectos gerais e importância biotecnológica

Os baculovírus constituem o maior e mais estudado grupo dentre os vírus que infectam insetos. Esses vírus estão onipresentes no ambiente e as várias centenas de seus representantes já descritas são específicas para grupos fortemente relacionados de insetos (MILLER, 1997). Mais de 600 espécies já foram confirmadas como sendo hospedeiras, a maioria delas, mais que 90%, pertencente à ordem Lepidoptera (JEHLE, 2006).

O genoma dos baculovírus é constituído por um DNA fita-dupla, circular, *supercoiled*, contendo entre 80 e 180 pares de quilobases (pkb) (BLISSARD *et al.*, 2000), sendo provável que esses vírus representem a maior e mais diversa família de vírus de DNA (MARTIGNONI; IWAI, 1981).

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, a família *Baculoviridae*, caracterizada principalmente por apresentar vírus oclusos, é composta de dois gêneros, diferenciados pelo tamanho de seus corpos de oclusão: *Nucleopolyhedrovirus* e *Granulovirus* (BLISSARD *et al.*, 2000). Os Nucleopoliedrovírus (NPV) produzem estruturas maiores (0,15 a 1,5 μ m) de formato poliédrico, denominadas poliedros, as quais contêm múltiplos *virions*, enquanto que os Granulovírus (GV) têm um corpo de oclusão menor (chamado grânulo, que contém normalmente um único *virion*) (FUNK; ROHRMANN, 1997).

A especialização de linhagens distintas de baculovírus em infectar ordens de insetos específicas sugere a existência de antigas interações co-evolutivas entre baculovírus e seus hospedeiros. Tradicionalmente, duas hipóteses evolucionárias competem para explicar tal fato: a primeira diz que os baculovírus poderiam ter evoluído dentro de um grupo específico de artrópodes, como a ordem Lepidoptera, e, posteriormente, migrado para outros grupos de insetos; e a segunda propõe que a associação entre baculovírus e seus hospedeiros vem desde a origem dos insetos, ou ainda, dos artrópodes, e que eles co-evoluíram de modo que ordens particulares

de insetos passavam a ser colonizadas por baculovírus à medida que surgiam (HERNIOU *et al.*, 2004).

Quanto à filogenia, análises comparativas baseadas na seqüência de genes conservados nos 29 genomas de baculovírus até então seqüenciados revelaram uma árvore filogenética com três grupos principais: o gênero *Granulovirus* (GV) e os grupos I e II de nucleopoliedrovírus (NPV) de lepidópteros. Além desses grupos, os NPV de himenópteros e o NPV de díptero, *Culex nigripalpus nucleopolyhedrovirus* (CuniNPV), foram incluídos na raiz da árvore representando grupos antigos que são filogeneticamente separados dos NPV e GV de lepidópteros (JEHLE, 2006).

Essas análises colocaram em questão a validade filogenética da atual divisão da família *Baculoviridae* e, por essa razão, recentemente foi proposta uma nova classificação e nomenclatura para gênero dentro dessa família. De acordo com essa proposta, a atual classificação poderia incluir quatro gêneros: os Alphabaculovírus, com NPV específicos para lepidópteros, os Betabaculovírus, com granulovírus específicos para lepidópteros, os Gamabaculovírus, com NPV específicos para himenópteros, e os Deltabaculovírus, com NPV específicos para dípteros (JEHLE, 2006) (Fig. 1).

No caso dos NPV, a poliedrina é a principal proteína de oclusão, constituindo aproximadamente 95% do conteúdo protéico dos corpos de oclusão ou poliedros. Alguns NPV apresentam em seus poliedros múltiplos nucleocapsídeos envolvidos por uma membrana comum, sendo, desta forma, chamados de *multiple* NPV ou MNPV. Outros englobam partículas contendo somente um nucleocapsídeo por envelope, sendo chamados de *single* NPV ou SNPV (CHEN *et al.*, 2000). Levando em conta o alto grau de conservação dos genes da poliedrina em baculovírus, relações filogenéticas baseadas na seqüência desses genes também foram investigadas. Essas análises confirmam que os NPV de lepidópteros estão agrupados em pelo menos dois grupos com caminhos evolucionários distintos: o grupo I e o grupo II (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

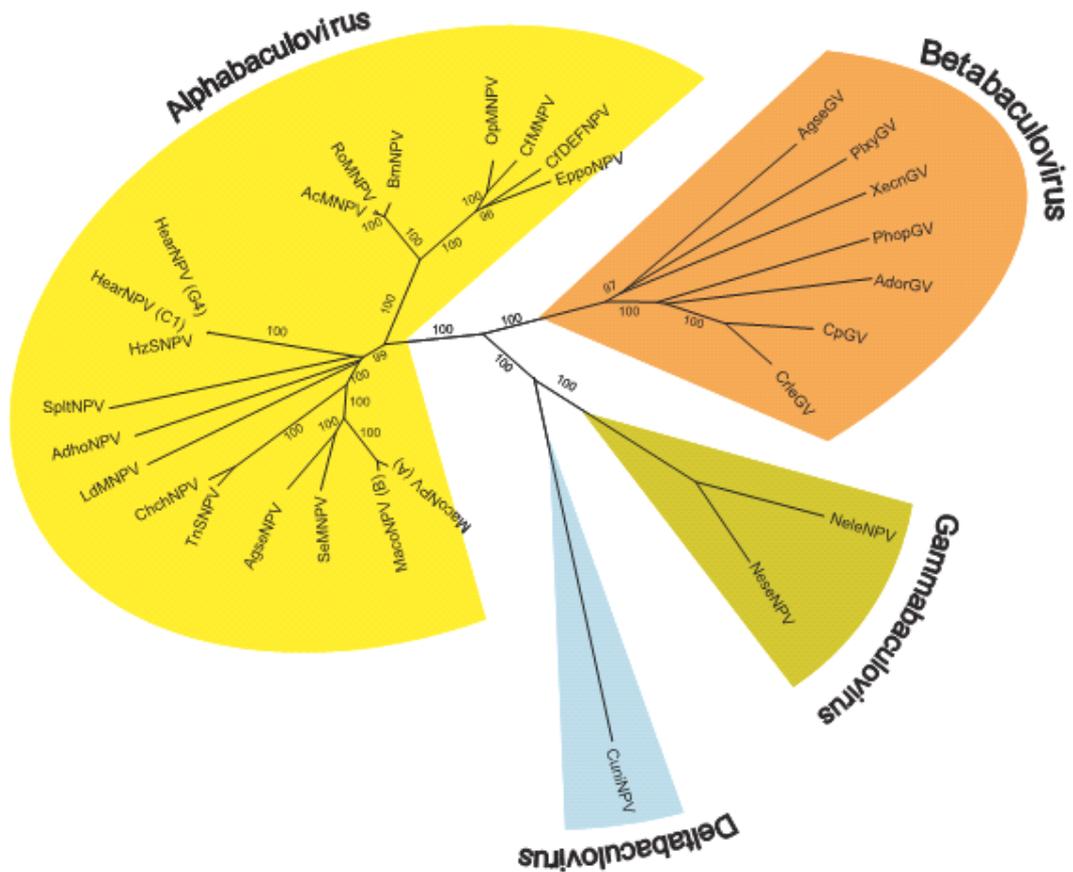


Figura 1. Árvore filogenética baseada no alinhamento de 29 genes comuns identificados nos 29 genomas de baculovírus já seqüenciados. Valores de *bootstrap* >95% são dados ao longo dos ramos. (JEHLE, 2006, modificado).

Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV), pertencente ao grupo I dos NPV, é o baculovírus mais estudado até o momento, sendo o vírus modelo da família *Baculoviridae* (MILLER, 1997). Mais de 32 espécies de insetos, incluídas em 15 famílias de lepidópteros, são susceptíveis a esse vírus (CORY; MYERS, 2003).

Na visão antropocêntrica, os baculovírus são os vírus mais benéficos de que se tem conhecimento, sendo considerados úteis à humanidade. Sua gama restrita de hospedeiros e sua eficiência em matar insetos tornaram possível seu uso no controle biológico de pragas de insetos, havendo grande interesse na melhoria desses vírus para este fim (MILLER, 1997). No Brasil, o *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) é utilizado no controle da principal praga da cultura de soja, a *Anticarsia gemmatalis*, no maior programa mundial de uso de vírus para controle biológico. Esse programa vem sendo executado desde 1982 e,

atualmente, abrange uma área de mais de 2 milhões de hectares por safra de soja (MOSCARDI, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

No campo da pesquisa biomédica, os baculovírus fornecem uma eficiente ferramenta para a expressão de proteínas de interesse em altos níveis, sendo um dos melhores e mais amplamente utilizados sistemas eucarióticos de expressão da atualidade (MILLER, 1997). Isso porque eles oferecem características atrativas durante o seu ciclo de infecção, entre elas, a presença de promotores fortes comandando a expressão, em grandes quantidades, de algumas proteínas estruturais, como a poliedrina e a p10. Além disso, células de inseto proporcionam um ambiente eucariótico adequado para o correto processamento de proteínas complexas, incluindo glicosilação e uma variedade de outras modificações pós traducionais (LANFORD *et al.*, 1989). Essas proteínas, em sua maioria, são ativas biologicamente e imunologicamente similares às proteínas naturais (RIBEIRO; SOUZA; KITAJIMA, 1998). Baculovírus como vetores de expressão consistem, portanto, em um sistema em que baculovírus recombinantes são modificados geneticamente para introdução de um gene heterólogo, o qual estará sob o controle transcricional de um promotor viral e será expresso em um hospedeiro eucariótico (JARVIS, 1997).

Além de sua utilidade como vetores de expressão de genes heterólogos em células de inseto, o fato de esses vírus entrarem em uma variedade de células de mamíferos, expressando genes de interesse sob o controle de promotores mamíferos, mas sem replicação de seu genoma viral, despertou grande interesse em seu uso como vetores de entrega gênica (KITAGAWA *et al.*, 2005).

Finalmente, o estudo dos baculovírus e seus genes tem auxiliado também na elucidação de questões fundamentais em biologia. A habilidade desses vírus em controlar a apoptose em suas células hospedeiras, por exemplo, constitui uma valiosa ferramenta para o esclarecimento das vias apoptóticas, sua regulação e função na imunidade de insetos contra vírus (CLEM, 2001; SILVEIRA, *et al.*, 2007).

1.1.2. Estrutura e modo de infecção

A estrutura dos baculovírus é fator determinante para a sua infecção e replicação em insetos. Eles possuem nucleocapsídeo em forma de bastão (30-35 nm de diâmetro e 250-300 nm de comprimento) e acham-se envoltos por uma membrana lipoprotéica (RIBEIRO; SOUZA; KITAJIMA, 1998).

Esses vírus estão presentes em duas formas fenotípicas durante um único ciclo de infecção. Os vírus oclusos ou *occlusion-derived virus* (ODV) são encapsulados em cristais protéicos denominados corpos de oclusão ou *occlusion bodies* (OB), enquanto os vírus extracelulares ou *budded virus* (BV), não são oclusos (FUNK; ROHMANN, 1997) (Fig. 2).

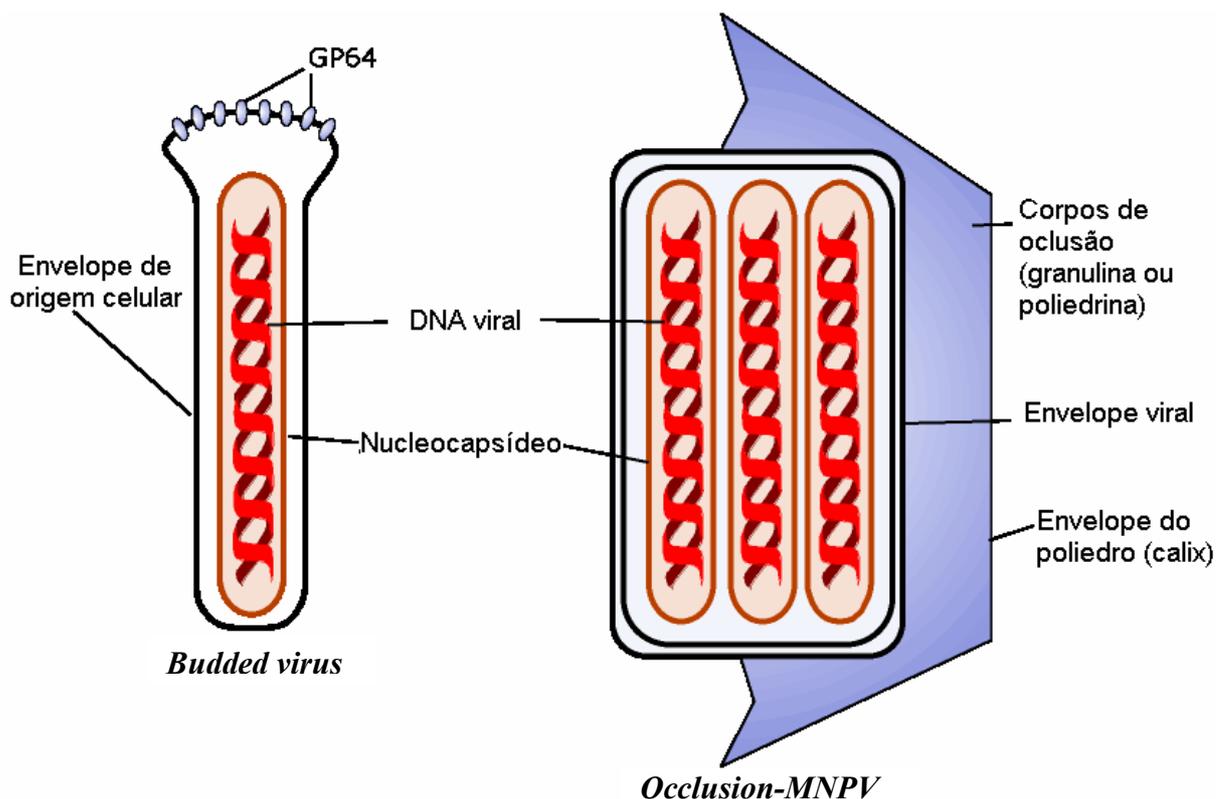


Figura 2. Representação esquemática da estrutura dos baculovírus. À direita, *occlusion-derived virus* (ODV) e, à esquerda, *budded virus* (BV). Tanto os ODV quanto os BV apresentam nucleocapsídeos em forma de bastão e DNA fita-dupla *supercoiled*. O envelope do ODV pode envolver um ou vários nucleocapsídeos. O envelope do BV envolve um único nucleocapsídeo e é adquirido no momento em que o vírus brota da célula hospedeira, quando leva consigo a proteína viral GP64. Os vírus oclusos encontram-se embebidos em um corpo de oclusão protegido por uma estrutura rica em carboidrato chamada “calix”. (KALMAKOFF; WARD, 2007, modificado).

Os ODV podem conter um único ou muitos nucleocapsídeos e são envelopados por uma bicamada lipídica que se assemelha, em composição, à membrana nuclear interna da célula hospedeira, contendo uma variedade de proteínas virais integrais e associadas. Já os BV, possuem somente um único nucleocapsídeo e são envolvidos por uma membrana lipoprotéica originada na membrana plasmática da célula hospedeira, contendo proteínas virais de fusão de membrana que permanecem concentradas, principalmente, em pequenas projeções presentes na zona apical do envelope, denominadas peplómeros (SLACK; ARIF, 2007).

A confirmação da existência de duas formas virais distintas durante a infecção, a forma oclusa e a forma não oclusa, foi importante para a compreensão do comportamento dos baculovírus em cultura de células e da patologia causada em insetos. Os ODV permitem a infecção de um hospedeiro para outro e os BV servem para espalhar a infecção dentro de um hospedeiro infectado (FEDERICI, 1997).

A infecção começa quando o alimento contaminado com OB é ingerido por um hospedeiro susceptível (Fig. 3). Os poliedros ou grânulos são então rapidamente dissolvidos devido ao pH altamente alcalino do intestino médio do inseto e os ODV são liberados. Após penetrarem a membrana peritrófica, uma rede de quitina, proteoglicanos e proteínas que protege o epitélio intestinal, os ODV entram em contato com as microvilosidades das células colunares para estabelecer a infecção (FEDERICI, 1997).

A infecção primária inicia-se com a fusão do envelope do ODV com uma microvilosidade da membrana apical de uma célula colunar. Essa fusão tem sido claramente documentada por microscopia eletrônica e é o único modo descrito de entrada dos nucleocapsídeos nas células do intestino (HAAS-STAPLETON; WASHBURN; VOLKMAN, 2004; HORTON; BURAND, 1993; SUMMERS, 1971).

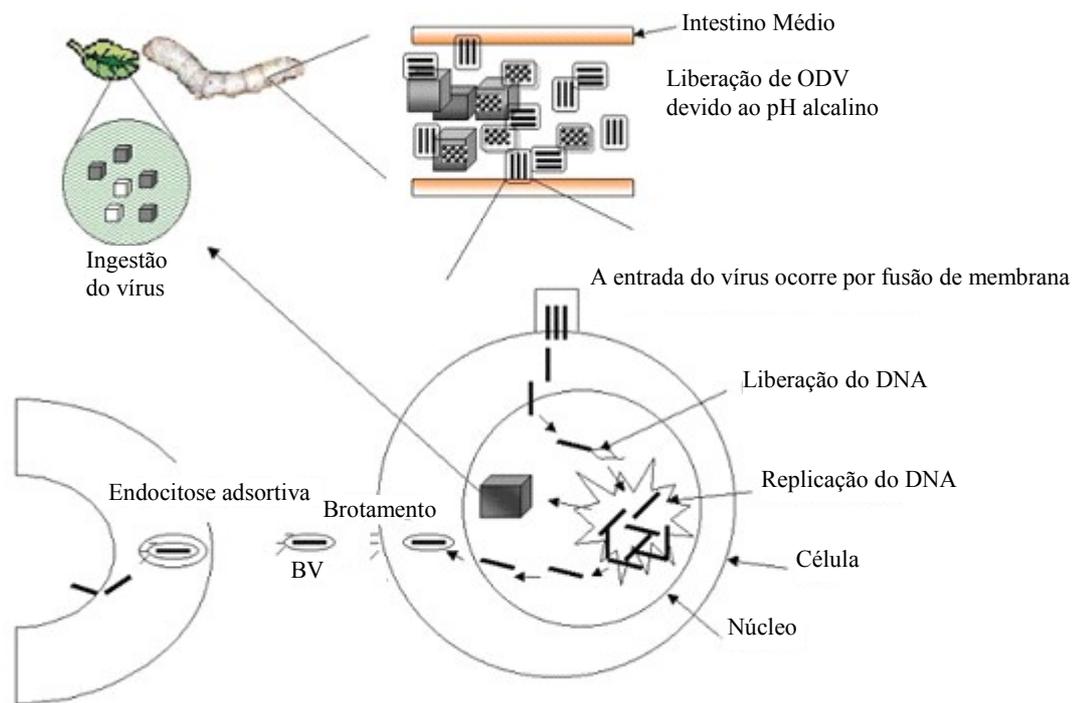


Figura 3. Esquema da infecção de um lepidóptero por um baculovírus. O inseto ingere a folhagem contaminada com poliedros e estes são dissolvidos no ambiente alcalino do intestino do inseto. Os vírus entram nas células epiteliais do intestino por fusão de membrana e a partícula viral é encaminhada ao núcleo. O DNA viral é liberado no núcleo, onde é replicado, e os nucleocapsídeos são montados. Os nucleocapsídeos brotam da membrana plasmática, formando os BV, que levam um envelope lipoprotéico de origem celular e com proteínas virais específicas que medeiam à entrada desses vírus em outras células por endocitose. Numa fase tardia da infecção, os poliedros são formados e liberados no ambiente. ([BACULOVIRUS], [200-?], modificado).

Após a infecção primária pelos ODV, os BV são rapidamente produzidos e disseminam a infecção célula-a-célula. Os nucleocapsídeos que irão se tornar BV são transportados do núcleo para o citoplasma através de vesículas originadas no envelope nuclear, e, em seguida, brotam da célula adquirindo um envelope originado da membrana plasmática, a qual foi modificada por uma glicoproteína viral chamada GP64 (FUNK; ROHMANN, 1997). Esta proteína é requerida para a entrada e saída dos vírus nas células e está envolvida inicialmente com a ligação do *virion* à superfície celular. Assim, os BV entram nas células por endocitose mediada por receptor. A GP64 medeia um evento de fusão de membranas dependente de pH ácido e o capsídeo é liberado dentro do citoplasma, ocasionando, desta forma, a infecção secundária (BLISSARD; WENZ, 1992).

No estágio tardio da infecção, os vírus que permanecem dentro dos núcleos das células do inseto são envelopados e oclusos pela proteína poliedrina ou granulina formando os OB. Esses OB são liberados com a desintegração do inseto morto e contaminam a folhagem, que é depois ingerida por outros insetos (FUNK; ROHMANN, 1997).

O envelope do ODV, portanto, é adaptado para interagir com estruturas do poliedro no processo de oclusão e para facilitar a infecção do epitélio no intestino do inseto, enquanto que o envelope do BV é adaptado para movimentação e estabelecimento da infecção sistêmica (FUNK; ROHMANN, 1997).

1.1.3. Citopatologia da infecção

A susceptibilidade de uma determinada linhagem celular a uma infecção viral resulta de interações altamente específicas entre célula e vírus (MORRIS; MILLER, 1992). A linhagem celular é considerada permissiva quando o DNA viral é replicado e todas as etapas da infecção são executadas; é considerada semi-permissiva quando não permite a replicação total da progênie viral devido a restrições em diversas etapas da infecção (BILIMORIA, *et al.* 1992); e é considerada abortiva quando o vírus induz ou não efeitos citopáticos, porém não há produção de partículas infecciosas (CARPENTER; BILIMORIA, 1983).

O modelo citopatológico de infecção por baculovírus mais bem caracterizado até o momento é a infecção de cultura de células derivadas de *Spodoptera frugiperda* ou *Trichoplusia ni* pelo vírus AcMNPV (WILLIAMS; FAULKNER, 1997).

Já nas primeiras 6 horas pós-infecção (h p.i.) é possível observar mudanças estruturais, como hipertrofia nuclear e arredondamento celular, e, ultra-estruturais, como alterações no citoesqueleto e dispersão da cromatina, o que provoca o aumento do volume do núcleo (O'REILLY; MILLER; LUCKOW, 1994) (Fig. 4).

Entre 6 e 12 h p.i. é formada uma estrutura elétron-densa, granular e de formato irregular na porção central do núcleo, denominada estroma virogênico, que serve como ambiente de montagem dos nucleocapsídeos (BILIMORIA, 1991; SLACK; ARIF, 2007). Em torno de 12 h p.i., os primeiros nucleocapsídeos formados começam a brotar da célula, sendo envelopados e tornando-se BV. Por volta de 16 h

p.i., o estroma virogênico aparece mais amadurecido, com um aspecto mais condensado e subcompartimentalizado, produzindo grandes quantidades de nucleocapsídeos (SUMMERS, 1971). Ao mesmo tempo, inicia-se a produção de poliedrina e P10 no citoplasma, sendo a poliedrina acumulada no núcleo e a P10 organizada em estruturas fibrilares no núcleo e citoplasma (WILLIANS *et al.*, 1989).

Cerca de 20 h p.i., a produção de BV cessa e há um aumento na produção de poliedrina para a montagem de OB (VOLKMAN; SUMMERS; HSIEH, 1976). Ao mesmo tempo, aparece uma região distinta, próxima à membrana nuclear interna, denominada *ring zone*, onde os nucleocapsídeos envelopados são incorporados à matriz de poliedrina, formando os OB (VAUGHN; DOGHERTY, 1985). Por volta de 24 h p.i., os primeiros poliedros já podem ser observados por microscopia de luz e as primeiras células infectadas começam a perder a aderência à superfície da placa de cultura, ficando soltas no sobrenadante.

Após 48 h p.i., os acúmulos das proteínas poliedrina e P10 tornam-se maiores. A proteína P10 interage com os microtúbulos da célula hospedeira, ajudando a promover a lise celular e o conteúdo celular é extravasado, juntamente com os poliedros, para o meio extracelular (SLACK; ARIF, 2007).

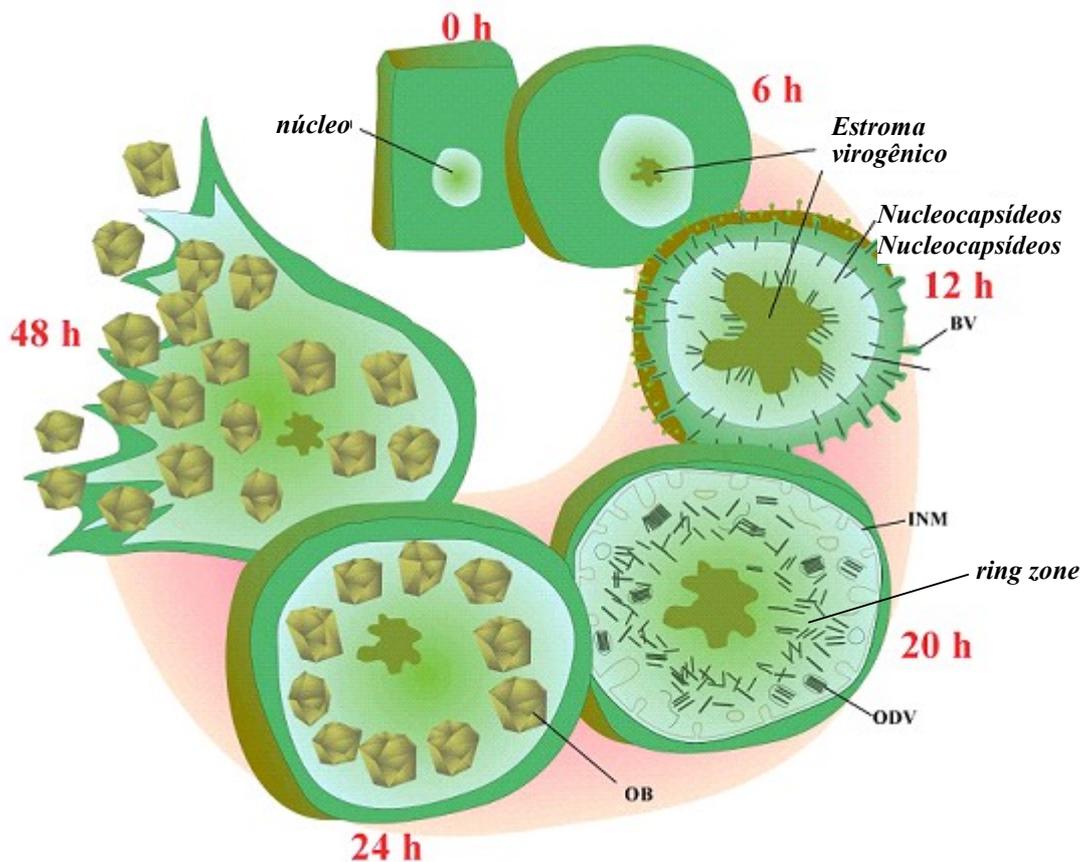


Figura 4. Ciclo citopatológico dos baculovírus. Várias fases de replicação viral estão ilustradas, começando com células no início do ciclo infeccioso e terminando, com a liberação dos OB. Os tempos indicados são relativos ao ciclo de infecção do AcMNPV. A figura mostra a progressão entre as fases de produção de BV e ODV. Nucleocapsídeos são inicialmente translocados à membrana celular para a produção de BV e mais tarde ficam retidos na região nuclear *ring zone* para a produção de ODV. INM é uma referência à membrana nuclear interna, a qual confere o envelope lipoprotéico ao ODV. (SLACK; ARIF, 2007, modificado).

1.1.4. Regulação da expressão gênica

Análises transcricionais mostram evidências de que a regulação da expressão gênica em baculovírus é um processo complexo que envolve a expressão seqüencial e coordenada de duas classes de genes: os genes precoces, que são expressos antes da replicação do DNA viral, e os genes tardios, que são expressos a partir do começo da replicação. Estes genes estão distribuídos pelo genoma do

baculovírus sem nenhuma associação física aparentemente relacionada com sua expressão temporal (FRIESEN, 1997).

A apropriada expressão e regulação dos genes da fase precoce é crítica para o sucesso replicativo dos baculovírus. Esta fase pode ser subdividida em duas: fase precoce de expressão imediata (2 a 4 h p.i.), com polipeptídeos que não requerem síntese prévia de proteínas virais e fase precoce de expressão retardada (5 a 7 h p.i.), que é dependente da síntese de polipeptídeos da fase anterior (FRIESEN, 1997).

Assim como a fase precoce, a fase tardia é subdividida em duas: fase tardia (8 a 18 h p.i.) e fase muito tardia (a partir de 18 h p.i.). Tanto a fase tardia quanto a muito tardia são caracterizadas pela natureza dos genes ativamente transcritos durante cada fase (LU; MILLER, 1997). Durante a fase tardia, que coincide com a replicação do DNA viral, com a produção de BV e com o “desligamento” da expressão gênica da célula hospedeira, genes codificando proteínas estruturais do nucleocapsídeo são abundantemente transcritos. Já na fase muito tardia, são transcritos genes codificando proteínas relacionadas ao processo de oclusão de partículas virais, como a poliedrina (FRIESEN, 1997).

Além da poliedrina, outra proteína altamente expressa na fase tardia do ciclo de infecção é a P10. O gene p10 pode ter um papel na estabilidade dos poliedros, assim como na eficiência da disseminação destes no ambiente (FUNK; ROHRMANN, 1997).

1.2. POLIEDRINA

A estratégia de sobrevivência de muitos vírus é persistir em estado de latência em hospedeiros vivos ou infectar uma espécie hospedeira reservatória. Entretanto, vírus de insetos não podem depender de estratégias de latência ou reservatórias por muitas razões. Insetos têm um curto período de vida se comparados a outras classes de animais, limitando assim as chances de transmissão de vírus latentes entre seus hospedeiros. Mudanças fisiológicas dramáticas ocorridas durante seu ciclo de vida também criam complicações no nível celular que não permitem a persistência desses vírus. Contudo, o fator mais

importante é, talvez, o fato de as populações de insetos serem sazonais e cíclicas. Essas populações passam longos períodos de tempo sem densidades significativas para a transmissão de vírus e estes devem, portanto, permanecer longos períodos no ambiente esperando o surgimento de populações hospedeiras (SLACK; ARIF, 2007).

Muitos vírus de insetos, como os cypovírus (*cytoplasmic polyhedrosis virus*, CPV), membros da família Reoviridae, e os baculovírus, sobrevivem por longos períodos em ambientes hostis devido à sua oclusão em cristais poliédricos compostos principalmente por uma única proteína viral denominada poliedrina. A extraordinária estabilidade que essa proteína confere a esses vírus é comparável à de esporos de bactérias e permite que eles permaneçam viáveis durante anos no solo. No ambiente extracelular, partículas virais embebidas em poliedros sobrevivem a duras condições como desidratação, congelamento e degradação enzimática, e, em laboratório, toleram tratamentos químicos como incubação com ácidos, uréia ou detergentes concentrados mantendo, ainda, sua organização cristalina (COULIBALY *et al.*, 2007). *In vivo*, os ODV são especializados em explorar o intestino médio do inseto, que é um dos mais extremos ambientes biológicos, onde os vírus são sujeitos a um pH cáustico e a proteases digestivas (SLACK & ARIF, 2007).

Essa matriz cristalina tem sido preservada durante a evolução porque é bem adaptada às funções de empacotamento e proteção desses vírus que, agrupados em pacotes e embebidos no poliedro, são capazes de infectar seus hospedeiros por via oral (ANDULEIT *et al.*, 2005).

Ainda que poliedrinas de diferentes famílias de vírus não apresentem similaridades detectáveis de seqüências de aminoácidos, essas proteínas, surpreendentemente, apresentam o mesmo padrão básico ordenado e constante de cristalização, organizando-se em blocos triméricos de uma única proteína de aproximadamente 28 kDa (COULIBALY *et al.*, 2007) (Fig. 5).

Os corpos de oclusão de baculovírus são uma estrutura peculiar em virologia, atingindo um nível de complexidade ainda maior do que em outras famílias. Essa oclusão permite a permanência desses vírus em estado de dormência, porém viáveis por décadas e, talvez, por séculos. Essas oclusões podem conter múltiplos *virions*, os quais podem ser constituídos por múltiplos nucleocapsídeos. Um único OB de algumas espécies de baculovírus pode entregar, portanto, dúzias de *virions*

em um tecido e assim promover a infecção de uma célula com múltiplas cópias de genoma viral (SLACK; ARIF, 2007).

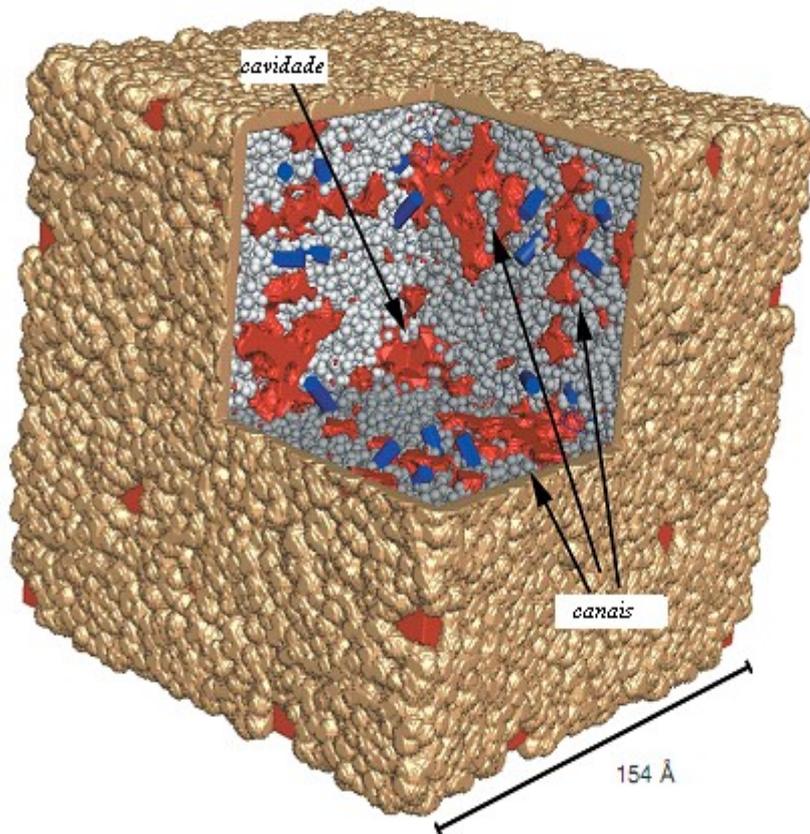


Figura 5. Modelo de poliedro de cypovirus. Poliedros são microcristais densos e selados contendo nucleocapsídeos. Aqui a contínua matrix de poliedrina é representada por uma superfície marrom e esferas cinzas. O denso pacote contém somente estreitos canais e cavidades centrais (superfície vermelha) bloqueadas por regiões de α -hélice (cilindros azuis). Esses blocos são repetidos ao longo do cristal e interrompidos pela presença de partículas virais. (COULIBALY *et al.*, 2007, modificado).

Os *virions* de baculovírus possuem uma bicamada lipídica que normalmente os tornam susceptíveis a dessecação e perda de viabilidade fora do hospedeiro. Para persistir no ambiente, os baculovírus, assim como outros vírus de insetos, evoluíram no sentido de ter seus *virions* envolvidos por proteínas protetoras. Em essência, eles adquiriram características de vírus não-envelopados sem alterar significativamente sua biologia de entrada e ligação às células hospedeiras (SLACK; ARIF, 2007).

1.2.1. Trânsito de poliedrina e formação de poliedros

Teoricamente, a poliedrina recém sintetizada é pequena o bastante para se difundir para dentro do núcleo através de complexos de poros nucleares. Contudo, tem sido demonstrado que a poliedrina contém um sinal de localização nuclear, que inclui a seqüência KRKK, localizada dos aminoácidos 32 a 35 na cadeia polipeptídica. É provável que o sinal de localização nuclear da poliedrina seja reconhecido por um receptor citoplasmático que tenha um papel funcional no processo de localização nuclear (JARVIS; BOHLMAYER; GARCIA, 1992).

Uma vez dentro do núcleo, a poliedrina forma uma matrix cristalina que envolve os nucleocapsídeos envelopados, resultando na produção de poliedros. Pouco é conhecido sobre a montagem supramolecular de poliedrina e produção de oclusões virais no núcleo de células de inseto infectadas. Contudo, tem sido demonstrado que a poliedrina requer o domínio entre os aminoácidos 19 e 110 para a montagem de corpos de oclusão detectáveis por microscopia de luz (JARVIS; BOHLMAYER; GARCIA, 1992).

O progresso da fase de oclusão depende do aumento na taxa de biossíntese e localização nuclear da poliedrina. A proteína *few polyhedra* 25K ou FP25K está direta ou indiretamente relacionada com a eficiência desses processos, sendo necessária para assegurar a produção normal de oclusões virais durante a infecção (JARVIS; BOHLMAYER; GARCIA, 1992; FUNK; ROHRMANN, 1997). A falta dessa proteína implica na diminuição da transcrição do gene da poliedrina, inapropriada localização de poliedrina e, conseqüentemente, pouca produção de poliedros (SLACK; ARIF, 2007).

Outra proteína, a P10, é comumente encontrada associada a poliedros. Essa proteína é um componente de estruturas fibrilares extensivas localizadas tanto no núcleo como no citoplasma de células infectadas. Essas estruturas fibrilares mostram uma forte associação com a formação do envelope do poliedro ou calix e podem estar integralmente envolvidas na aplicação desse envelope na superfície do poliedro. A falta da P10 leva à formação de poliedros mais frágeis indicando que essa proteína pode ter importância na estabilidade dos poliedros (FUNK; ROHRMANN, 1997).

1.3. APOPTOSE

A apoptose é um tipo de morte celular geneticamente programada, altamente conservada entre organismos multicelulares, em que células danificadas, desnecessárias ou potencialmente perigosas são eliminadas durante o desenvolvimento e homeostase tecidual ou doenças (ASHE; BERRY, 2003).

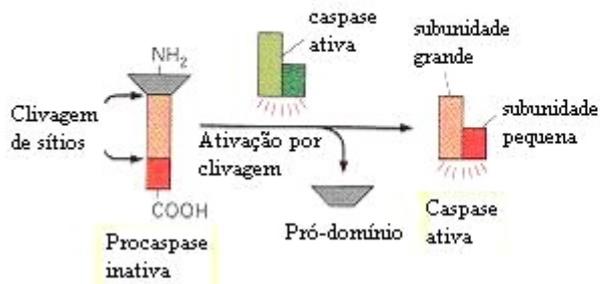
Esse mecanismo ocorre em resposta a uma ampla variedade de estímulos, os quais resultam na ativação de cisteíno proteases conhecidas como caspases. Essas proteases são inicialmente pró-enzimas inativas (pró-caspases), as quais são ativadas por outros membros da família caspase por clivagem proteolítica. Dois fragmentos resultantes de clivagem se associam para formar a caspase ativada (ALBERTS *et al.*, 2002) (Fig. 6A).

Cada molécula de caspase ativada pode clivar muitas moléculas de pró-caspases, e estas, podem clivar ainda mais moléculas. Desse modo, a ativação inicial de um pequeno número de moléculas pró-caspases (chamadas caspases iniciadoras) pode levar, via reação em cadeia de amplificação (cascata), à ativação de um alto número de moléculas pró-caspases. Algumas das caspases ativadas (chamadas caspases efetoras) clivam, então, uma variedade de proteínas-chave na célula, incluindo proteínas citosólicas específicas e da lâmina nuclear (ALBERTS *et al.*, 2002) (Fig. 6B).

O DNA celular é fragmentado por endonucleases ativadas por caspases e o conteúdo celular é, então, empacotado dentro de vesículas conhecidas como corpos apoptóticos, os quais podem ser fagocitados por células vizinhas, resultando em uma morte celular controlada e imunologicamente limpa (HENGARTNER, 2000).

Assim, a célula em apoptose apresenta algumas mudanças morfológicas típicas já bem caracterizadas, entre elas, marginação e condensação da cromatina, condensação do citoplasma, encolhimento celular, blebbing de membrana, desarranjo nuclear, desorganização do citoesqueleto e fragmentação da célula em corpos apoptóticos (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972).

(A) Ativação de pró-caspases



(B) Cascata de caspases

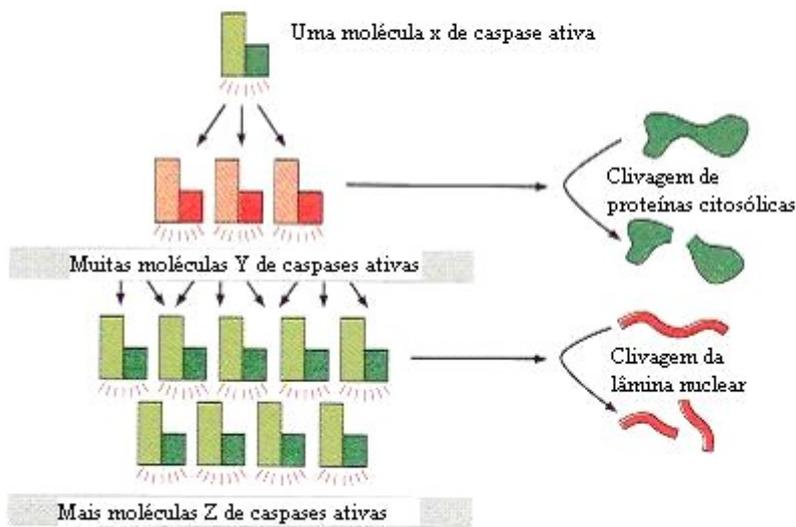


Figura 6. (A) A Ativação de pró-caspases. **(B)** A cascata de caspases envolvida na apoptose. (ALBERTS *et al.*, 2002, modificado).

1.4. APOPTOSE E BACULOVÍRUS

Desde a descoberta de que um baculovírus poderia inibir apoptose em células de inseto hospedeiras em 1991, os genes anti-apoptóticos que esses vírus codificam têm sido intensamente estudados. Até hoje dois tipos diferentes de genes anti-apoptóticos de baculovírus foram identificadas, *p35* e *iap*, e a importância desses genes foi confirmada pelo fato de que os genomas de vários baculovírus seqüenciados contém pelo menos um homólogo de um gene anti-apoptótico (CLEM, 2001).

A capacidade das células de inseto hospedeiras de detectar a infecção antes da replicação viral e cometer suicídio com o acionamento da apoptose é vantajosa sob a perspectiva do hospedeiro, porque a morte de um pequeno número de células inicialmente infectadas pode impedir a infecção sistêmica. Por outro lado, a habilidade que os vírus possuem em bloquear a tentativa de suicídio das células hospedeiras é prejudicial para o hospedeiro porque contribui para o sucesso da infecção e pode resultar na morte do mesmo (CLEM, 2001).

O entendimento dos mecanismos pelos quais os baculovírus acionam a resposta apoptótica ainda não está bem estabelecido, apesar do significativo progresso no entendimento de como esses vírus bloqueiam a apoptose. Possivelmente, mais de um evento pode contribuir para a indução de apoptose durante a infecção por baculovírus. Como existem vários processos inter-relacionados ocorrendo nesse momento crucial, é difícil determinar precisamente qual deles é responsável pela indução de apoptose. Esses processos incluem: o início da síntese de DNA viral, o término da síntese de RNA e proteínas celulares juntamente com a síntese de produtos de genes virais precoces, como o *ie-1* e o *pe38*, e o início da expressão de genes virais tardios (CLEM, 2001) (Fig. 7).

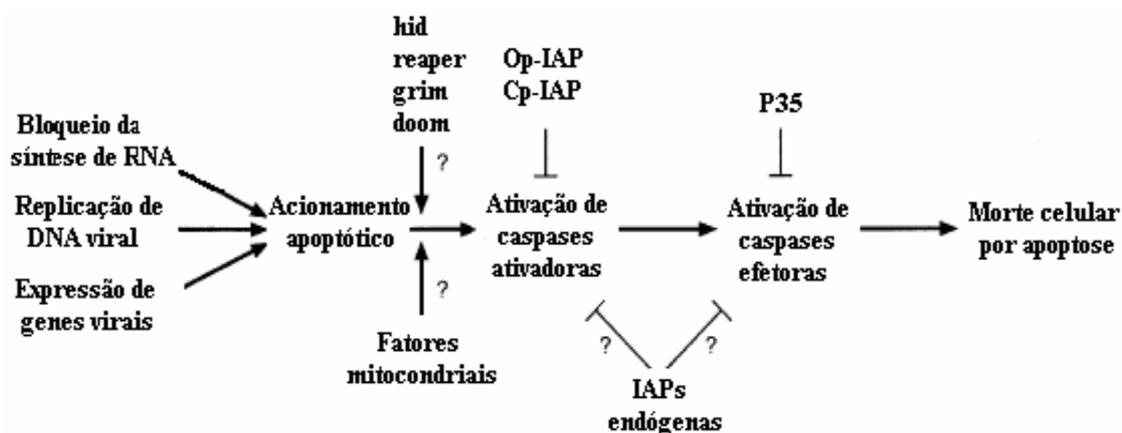


Figura 7. Vias de apoptose induzidas por baculovírus em células SF-21. Pelo menos três diferentes estímulos induzidos por baculovírus podem contribuir para o engatilhamento da apoptose em células Sf-21: o bloqueio da síntese de RNA celular, a expressão de genes virais pró-apoptóticos, como *ie-1* e *pe38*, e a replicação do DNA viral. Homólogos em lepidópteros de proteínas pró-morte de *Drosophila* (*hid*, *reaper*, *grim* e *doom*), podem estar envolvidos na apoptose induzida por baculovírus. Fatores mitocondriais, como o citocromo c, também podem estar envolvidos. As proteínas de baculovírus OpIAP e CpiAP parecem agir ou na prevenção da ativação de caspases tipo ativadoras ou inibindo diretamente essas caspases, enquanto a P35 previne a ativação de caspases tipo efetoras. (CLEM, 2001, modificado).

A ligação do vírus a receptores celulares, por si só, não é suficiente para a indução de apoptose, uma vez que o bloqueio da entrada de um vírus AcMNPV mutante, com o gene *p35* deletado, não resulta em apoptose. Portanto, o acionamento da morte envolve alguns passos subseqüentes à ligação do vírus (LACOUNT; FRIESEN, 1997).

Algumas evidências sugerem que a expressão gênica dos baculovírus, que pode ser dividida nas fases precoce e tardia, é bastante relevante para a indução de apoptose (CLEM; ROBSON; MILLER, 1994).

Um dos genes requeridos para a replicação de DNA viral é o *ie-1*. A expressão de *ie-1*, por si só, tem mostrado induzir apoptose e essa habilidade é aumentada por outro gene de baculovírus, o *pe38*. Tanto o *ie-1* quanto o *pe38* são expressos durante a infecção por AcMNPV, de imediatamente após a infecção até a fase tardia, e ambos codificam fatores de transcrição. Existem evidências de que o gene *ie-1* induz apoptose no início da síntese de DNA viral (PRIKHOD'KO; MILLER, 1996, 1999).

O evento chave que regula a passagem da fase precoce para a fase tardia é o início da replicação do DNA viral. O tratamento com um inibidor de síntese de DNA bloqueia a transição para a fase tardia e também bloqueia a apoptose de células Sf-21 infectadas com um mutante *p35*⁻. Esses resultados sugerem que o início da apoptose é dependente ou de produtos de genes virais tardios ou de algum outro processo relacionado à transição do estágio precoce para o estágio tardio da infecção (CLEM; ROBSON; MILLER, 1994) (Fig. 7).

O simples bloqueio da síntese de RNA celular é suficiente para induzir apoptose em células Sf-21. O tratamento com vários inibidores diferentes de síntese de RNA induz rapidamente apoptose nessas células. Assim, a interrupção da síntese de mRNA do hospedeiro, vista em tempos tardios na infecção por AcMNPV, poderia ser responsável pela indução de apoptose, presumivelmente, pela falta da síntese de uma proteína inibitória que é requerida para prevenir o início da morte nessas células (CLEM; ROBSON; MILLER, 1994) (Fig. 7).

Recentemente, foi mostrado que o citocromo C também tem um papel na indução de apoptose por baculovírus, podendo ser requerido para a ativação de caspases durante a indução, visto que há uma significativa inibição de apoptose por ciclosporina A, a qual bloqueia a translocação do citocromo C da mitocôndria para o citosol (LIU *et al.*, 2007).

1.4.1. P35

Os baculovírus desenvolveram uma variedade de mecanismos essenciais ao sucesso da infecção de seus insetos hospedeiros durante a evolução. Um desses mecanismos é a habilidade de regular a apoptose durante a infecção pela expressão de proteínas anti-apoptóticas que podem inibir a ativação de caspases e/ou sua atividade, incluindo proteínas inibidoras de caspase como a P35 e suas homólogas, e as inibidoras de apoptose (IAP). Progressos têm sido alcançados na determinação de como as proteínas virais P35, IAP e seus equivalentes celulares funcionam em nível bioquímico no bloqueio da apoptose (CLEM, 2005).

A primeira proteína inibidora de apoptose (P35) foi descoberta como um produto de um gene baculoviral derivado do AcMNPV. Esse gene foi primeiramente identificado em 1987 pela análise da seqüência de uma região do genoma de AcMNPV adjacente à inserção de um elemento transponível (FRIESEN ; MILLER, 1987). A função do produto desse gene permaneceu desconhecida até o mapeamento de uma mutação espontânea encontrada no mutante indutor de apoptose conhecido como “Aniquilador”, em 1991. Essa mutação consistia em uma deleção no gene *p35*, indicando que o mesmo era capaz de prevenir a resposta apoptótica normalmente induzida pela infecção por AcMNPV em células Sf-21 (CLEM; FECHHEIMER; MILLER, 1991).

Além do AcMNPV (CLEM; FECHHEIMER; MILLER, 1991), pelo menos mais cinco espécies de baculovírus apresentam genes homólogos ao *p35*: *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV) (KAMITA; MAJIMA; MAEDA, 1993), *Spodoptera littoralis nucleopolyhedrovirus* (SpliNPV) (DU *et al.*, 1999), *Trichoplusia ni single nucleopolyhedrovirus* (TnSNPV) (DAI *et al.*, 1999), *Spodoptera litura nucleopolyhedrovirus* (SpltNPV) (PANG *et al.*, 2001) e *Hyphantria cunea nucleopolyhedrovirus* (HycuNPV) (CAO *et al.*, 2002).

A proteína codificada pelo gene *p35* de BmNPV é 90% idêntica à P35 do AcMNPV em nível de aminoácido e também tem papel na prevenção da apoptose induzida por BmNPV em células de *B. mori* (KAMITA; MAJIMA; MAEDA, 1993). O homólogo ao *p35* de *Spodoptera littoralis* NPV (SpliNPV), *p49*, é mais divergente, codificando uma proteína com 49% de identidade com os aminoácidos da P35 de AcMNPV e com um tamanho predito de 49 KDa (DU *et al.*, 1999).

Recentemente, foi reportado o primeiro relato de um homólogo do *p35* presente fora da família dos baculovírus. O gene *AMVp33* de *Amsacta moorei entomopoxvirus* tem baixa, mas significativa, homologia aos genes *p35* de baculovírus. A expressão desse gene bloqueou a apoptose em várias linhagens celulares diferentes de insetos e humanos, codificando um inibidor de caspase similar ao P35 de baculovírus, com uma preferência para a inibição de caspases efetoras (MEANS; PENABAZ; CLEM, 2007).

A despeito de ainda não ter sido encontrado nenhum homólogo celular para o *p35*, ele é o único gene conhecido que tem atividade anti-apoptótica nos três principais sistemas genéticos utilizados no estudo da morte celular: nematóides, moscas e camundongos (CLEM, 2001). Assim, P35 é a mais abrangente proteína inibidora de caspases conhecida (CALLUS; VAUX, 2007).

Diversos trabalhos mostram que a proteína P35 é uma inibidora direta de caspases (BUMP *et al.*, 1995; XUE; HORVITZ, 1995), agindo de modo estequiométrico, inativando-as e formando um complexo estável com as mesmas, sendo, desta forma, considerada uma inibidora suicida (BUMP *et al.*, 1995).

Em 1999, a estrutura cristalina da proteína P35 de AcMNPV foi descrita revelando uma nova e altamente interessante estrutura inibidora de protease. A estrutura da P35 contém uma alça flexível com um sítio de clivagem acessível à caspases. Estudos mostram que a conformação dessa alça é essencial para a inibição de caspase pela P35 (CALLUS; VAUX, 2007). A clivagem dessa alça pela caspase ocorre após um resíduo de aspartato, produzindo produtos de clivagem de 10 e 25 KDa que permanecem estavelmente associados a ela (FISHER *et al.*, 1999) (Fig. 6).

1.4.2. IAP

Os genes *iap* (inibidor de apoptose) formam uma extensa família de genes evolutivamente conservados presentes em baculovírus, nematóides, insetos, mamíferos e leveduras (UREN; COULSON; VAUX, 1998), tendo importantes funções na regulação de apoptose e citocinese (CLEM, 2007).

O primeiro gene *iap*, *Cp-iap*, foi descoberto no baculovírus *Cydia pomonella* granulovírus através de uma experimento visando à recuperação do mutante *p35*

Aniquilador. Desde então, todos os baculovírus mostraram conter um ou mais genes homólogos de *iap*, embora somente alguns, entre eles, o *Cp-iap*, o *Op-iap* (de *Orgyia pseudotsugata* NPV) e o *iap-3* (de AgMNPV) mostraram ter função anti-apoptótica (CROOK; CLEM; MILLER, 1993; CARPES *et al.*, 2005).

As proteínas IAP são metaloproteínas que têm como característica a presença de um ou mais motivos ligantes de zinco próximos à cadeia amino-terminal. Esses motivos são denominados BIR (*Baculovirus IAP Repeat*). Além disso, muitas IAP contêm um outro tipo de motivo ligante de zinco chamado domínio RING na porção carboxi-terminal (CLEM; HARDWICK; MILLER, 1996) (Fig. 8).

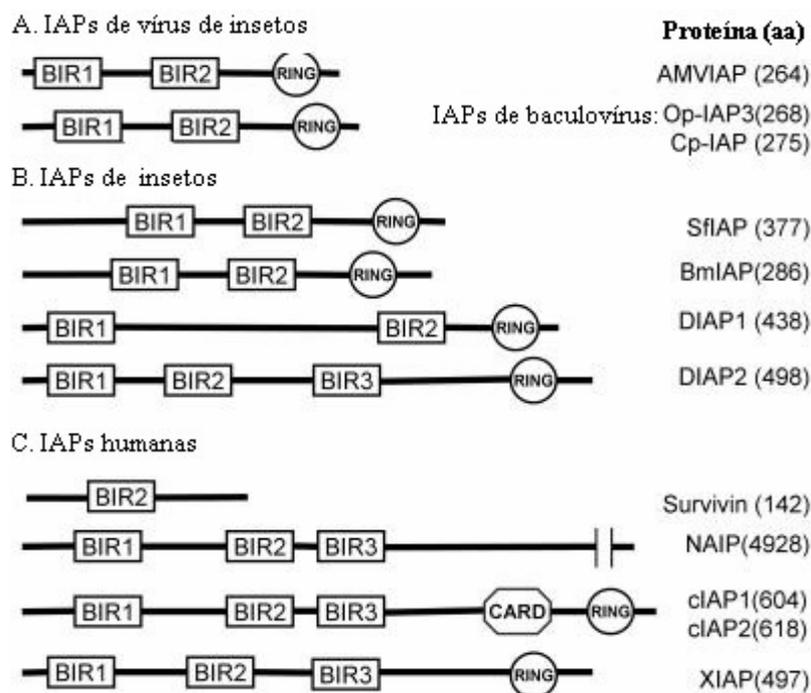


Figura 8. Posições relativas dos domínios BIR e RING de IAP (A) de vírus de insetos, (B) de insetos e (C) humanas. Todos os domínios BIR contêm resíduos conservados de cisteína e histidina no motivo $CX_2C_{16}HX_{6-8}C$. E os domínios RING contêm o motivo esqueleto, C_3HC_4 . (LI; LISTON; MOYER, 2005, modificado).

Existem crescentes evidências de que um subgrupo de proteínas IAP funcione como inibidor direto de caspases. A primeira proteína IAP que mostrou inibir caspases diretamente foi a XIAP de humano, e, após esta, outras também mostraram o mesmo padrão de inibição para certas caspases, como por exemplo, IAP de baculovírus (DEVERAUX; REED, 1999).

IAP codificadas por baculovírus apresentam capacidade de interferir em mecanismos de ativação de caspases (SESHAGIRI; MILLER, 1997). Além de se ligarem a caspases, porções de diferentes proteínas IAP contendo BIR ligam-se a uma ampla variedade de diferentes proteínas pró-morte, incluindo as proteínas de *Drosophila* REAPER, GRIM, HID e DOOM, componentes do complexo sinalizador fator de necrose tumoral (MILLER, 1999). Possivelmente, as seqüências flanqueadoras dos BIR também têm papéis importantes na determinação dos padrões de ligação e na função anti-apoptótica (CLEM, 2001).

O motivo RING está relacionado à atividade de ligase de ubiquitina, a qual pode promover a auto-ubiquitinação de IAP e das proteínas com as quais interage. A ubiquitinação e conseqüente degradação proteassomal de proteínas pró-apoptóticas pode consistir em mais um mecanismo anti-apoptótico de IAP (GREEN; MONSER; CLEM, 2004; HAO *et al.*, 2004).

1.4.3. Influência da apoptose na patogênese viral

A primeira evidência de que a apoptose pode ser uma defesa antiviral significativa veio de trabalhos feitos com baculovírus mutantes que não bloqueiam apoptose (CLEM, 2001). Manipulações experimentais da expressão de genes anti-apoptóticos ou por deleções genéticas ou por RNAi têm revelado os efeitos da apoptose no combate à infecção por baculovírus. Esses resultados indicam que a apoptose pode ser uma resposta extremamente poderosa à infecção por baculovírus, reduzindo a replicação viral, a infectividade e a habilidade do vírus se espalhar dentro do inseto hospedeiro, ainda que uma infecção bem sucedida esteja estabelecida. A apoptose é especialmente efetiva quando combinada com outras defesas antivirais inatas, que são pouco conhecidas em insetos até o momento (CLEM, 2005).

A ausência de resposta imune adaptativa nos insetos os torna um modelo animal interessante para o exame dos efeitos da apoptose na infecção viral. Vários membros da família *Baculoviridae* mostraram induzir apoptose durante a infecção em cultura de células de inseto e, dependendo da combinação do vírus com o hospedeiro, essa resposta apoptótica pode limitar severamente a replicação viral (CLARKE; CLEM, 2003).

AcMNPV normalmente causa doença letal em uma variedade de espécies de insetos, incluindo *S. frugiperda* e *T. ni*. Linhagens celulares derivadas dessas espécies infectadas com mutantes AcMNPV que não possuem o gene p35 diferem na resposta à infecção (HERSHBERGER; DICKSON; FRIESEN, 1992; CLEM; MILLER, 1993). Células SF-21, derivadas de *S. frugiperda*, sofrem apoptose quando infectadas com vírus mutantes p35-, e as produções tanto de BV quanto de ODV são drasticamente reduzidas. Células TN-368, derivadas de *T. ni*, em geral, não sofrem apoptose, ao invés disso, permanecem idênticas a células infectadas com AcMNPV tipo selvagem, com produções normais de BV e ODV (CLEM, 2001). Quando mutantes p35- são usados para infectar larvas dessas espécies é observada uma correlação entre a indução de apoptose nas linhagens celulares e a redução da infectividade do hospedeiro (CLEM; MILLER, 1993; CLEM; ROBSON; MILLER, 1994) (Fig. 9).

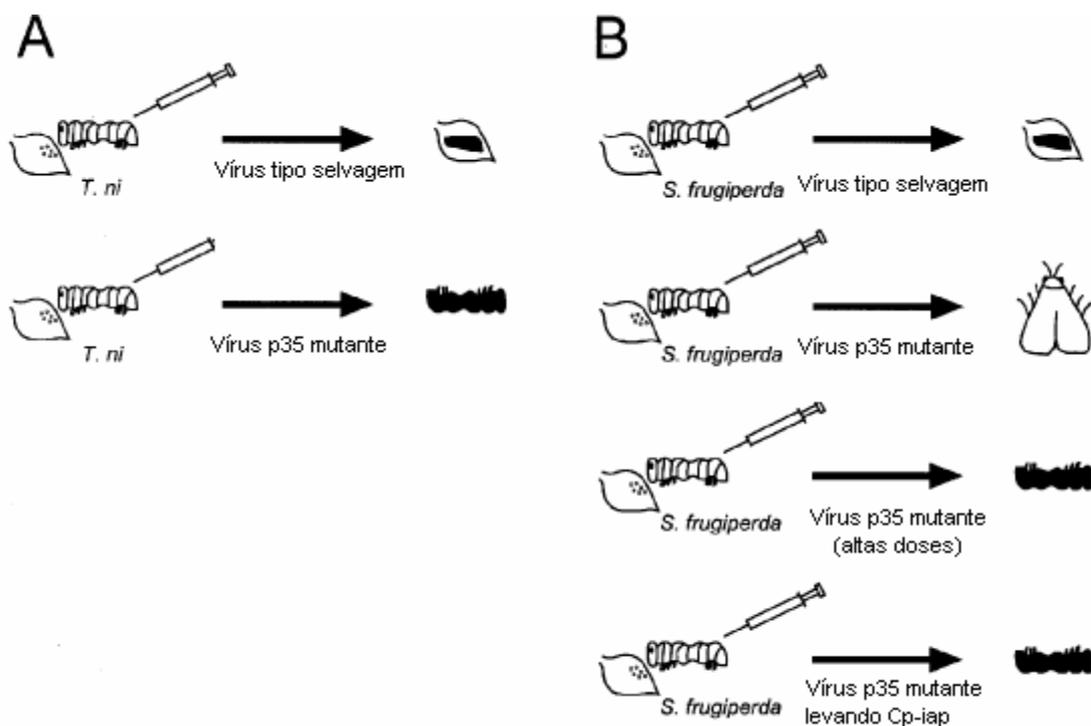


Figura 9. Efeitos dos genes anti-apoptóticos *p35* e *iap* na patogênese dos baculovírus. Em situações naturais, insetos lepidópteros *Trichoplusia ni* e *Spodoptera frugiperda* tornam-se infectados quando se alimentam de folhas contaminadas com vírus oclusos. No laboratório, larvas também podem ser experimentalmente infectadas por injeção de *budded virus*. **(A)** Em *T. ni*, o vírus tipo selvagem mata o inseto (como ilustrado pela poça de líquido preto na folha) e larvas infectadas com vírus mutantes sem o gene anti-apoptótico *p35* tornam-se melanizadas e também morrem. **(B)** Em *S. frugiperda*, o vírus tipo selvagem mata a larva, mas insetos infectados com doses do mutante *p35* suficientes para matar *T. ni* pupam e sobrevivem até a fase adulta. Essa falta de infectividade pode ser revertida pela infecção com doses extremamente altas do vírus *p35* mutante ou pelo uso de um vírus levando o gene *Cp-iap*. (CLEM, 2001, modificado).

A correlação entre a habilidade do vírus para bloquear apoptose em cultura de células, e sua habilidade para infectar de forma produtiva larvas de insetos é devida, portanto, aos seguintes fatos: se as células infectadas inicialmente sofrem apoptose, isso pode permitir que o hospedeiro limpe a infecção, talvez pelo engolfamento ou encapsulação de células infectadas; contudo, se o vírus previne apoptose, ele pode se replicar muito rapidamente, evitando que as defesas do hospedeiro sejam bem sucedidas (CLEM, 2001).

1.5. CONTEXTO E OBJETIVO

Avanços nas técnicas de cultura de células possibilitaram a purificação de partículas virais, levando ao isolamento de mutantes e à caracterização precisa de clones isolados de baculovírus. A maioria deles é derivada do vírus AcMNPV, principalmente pela sua facilidade de propagação e estabilidade em cultura de células (MILLER, 1997).

Em todo o mundo, dezenas de novos mutantes têm sido isolados e caracterizados. Muitos desses mutantes são encontrados ocasionalmente em laboratório durante a rotina de isolamento de vírus recombinantes. Outros são propositalmente mutados, de maneira randômica, com a utilização de agentes mutagênicos, ou específica, através de mutações sítio dirigidas. O estudo desses mutantes tem ajudado a desvendar funções e características de diversos genes e proteínas virais importantes (KATSUMA *et al.*, 2000).

No Laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia Molecular da Universidade de Brasília, um desses mutantes, o vApAg, foi encontrado durante o isolamento de um vírus recombinante derivado do AgMNPV. Esse mutante mostrou induzir morte celular prematura na linhagem derivada de *Anticarsia gemmatalis*, UFL-AG-286 (SIEBURTH; MARUNIAK, 1988).

Diversas análises, em nível citopatológico e molecular, foram feitas no sentido de melhor se conhecer e caracterizar o vApAg e sua infecção em células de inseto. Silveira, Ribeiro e Bão (1999) realizaram estudos morfológicos da infecção de duas linhagens celulares por esse mutante e constataram que apesar de ele induzir apoptose em células da linhagem UFL-AG-286, ele não era capaz do mesmo na

linhagem derivada de *Trichoplusia ni*, BTI-Tn-5B1-4 (Tn-5B) (GRANADOS *et al.*, 1994).

Carpes *et al.* (2005) caracterizaram e analisaram a mutação presente em vApAg, a qual é devida a uma inserção de 2.500 pb interrompendo o gene inibidor de apoptose, *iap-3*, desse vírus.

Silveira *et al.* (2005) estudaram, em hemócitos de *A. gemmatalis*, o curso da infecção e indução de apoptose por outro vírus, o vP35del, que tem o gene inibidor de apoptose, *p35*, deletado. Os mesmos autores (2007) investigaram também, *in vivo*, nesse mesmo modelo celular, a infecção e indução de apoptose por vApAg. Nos dois sistemas estudados foi observada correlação entre indução de apoptose e redução de infectividade *in vivo*.

Generino, Acácio e Ribeiro (2004) encontraram um vírus mutante indutor de morte celular, o MutApo, durante a seleção de um vírus recombinante e constataram, através de análises moleculares, que essa mutação era devida a uma inserção de DNA interrompendo o gene *p35* desse vírus. Nessa mesma ocasião, outro vírus mutante foi isolado, o MutPolh. As células por ele infectadas apresentavam um fenótipo distinto das demais, com o acúmulo de massas protéicas no citoplasma.. Análises moleculares foram feitas e mostraram que esse mutante apresentava uma mutação pontual no gene da poliedrina.

Esse trabalho tem como objetivo analisar, no nível citopatológico, células da linhagem Tn-5B e Sf-21 infectadas com dois vírus mutantes, o MutApo e o MutPolh, com o intuito de confirmar as seguintes hipóteses:

- O MutApo é um indutor de apoptose;
- O MutPolh induz deficiência na localização e montagem de poliedrina.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. LINHAGENS CELULARES

Células de insetos das linhagens IPLB-SF-21 (Sf-21) (VAUGHN *et al.*, 1977), derivada de *Spodoptera frugiperda*, e BTI-Tn-5B1-4 (Tn-5B) (GRANADOS *et al.*, 1994), derivada de *Trichoplusia ni*, foram mantidas em meio de cultura TC-100 (GIBCO-BRL Life Technologies, Grand Island, N.Y.) suplementado com soro fetal bovino (10%) a temperatura ambiente.

2.2. VÍRUS

Os vírus recombinantes vSynlitx1 e vSynpolhrevC7 (PolhRev) e os vírus mutantes vSynlitx1G4 (MutApo) e vSynlitx1B12P (MutPolh) são derivados do vírus selvagem *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) e foram propagados nas linhagens celulares acima citadas, em placas de cultura de 100mm (aproximadamente 5×10^6 células) (GENERINO; ACÁCIO; RIBEIRO, 2004).

2.2.1. vSynlitx1

O vírus vSynlitx1 contém o gene da toxina de aranha *Loxocles intermedia*, *litx1*, e foi construído a partir de recombinação homóloga entre o plasmídeo recombinante pSynLitx1 (vetor de transferência pSynXIVVI⁺X3 contendo o gene *litx1*) e o vírus parental vSynVI⁺gal (WANG; OOI; MILLER, 1991) (Fig. 10).

O vetor de transferência pSynXIVVI⁺X3 contém o promotor híbrido pSynXIV (sentido anti-horário) e o promotor da poliedrina comandando seu respectivo gene (sentido horário) (WANG; OOI; MILLER, 1991). O cDNA do gene *litx1* (CASTRO *et al.*, 2004) foi clonado sob o comando do promotor pSynXIV. Assim, o plasmídeo pSynLitx1, além do gene *litx1*, contém também o gene da poliedrina (*polh*).

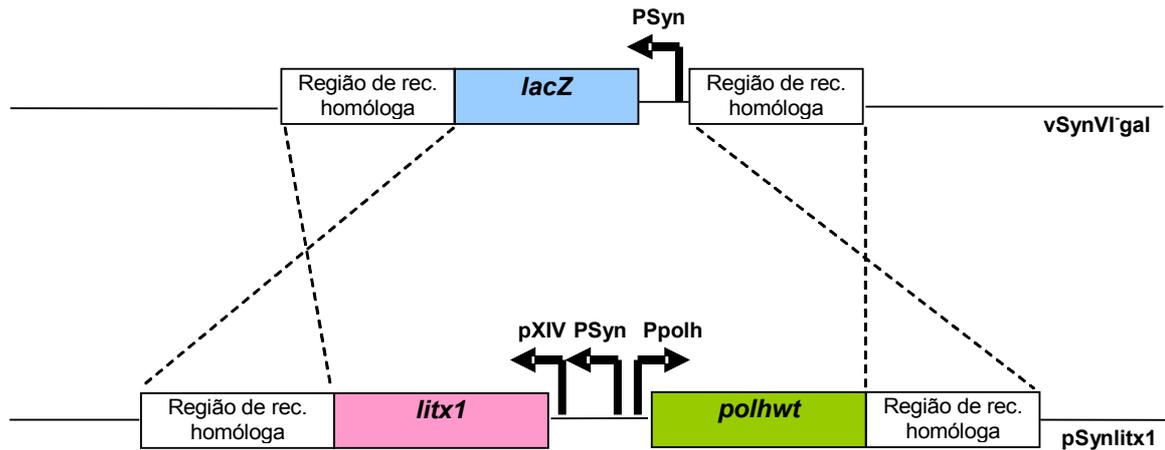


Figura 10. Representação esquemática de recombinação homóloga entre o vetor de transferência pSynlitx1 (parte de baixo) e o vírus parental vSynVIgal (parte de cima), por recombinação homóloga. O vSynVIgal possui o promotor PSyn dirigindo a expressão do gene *lacZ* e regiões flanqueadoras de recombinação homóloga. Todo o cassete de expressão proveniente do pSynlitx1 foi inserido entre as regiões de recombinação homóloga do vSynVIgal, substituindo, assim, o gene *lacZ* do vírus parental.

O vírus parental vSynVIgal possui o gene *lacZ* no locus do gene *polh*, sob o comando do promotor sintético, PSyn. O gene *lacZ* codifica a enzima β -galactosidase, que, na presença de um indutor de atividade, quebra o substrato sintético X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside). A quebra do X-Gal por β -galactosidase produz uma cor azul, o que indica a expressão do gene *lacZ*. Quando a recombinação é bem sucedida, este gene é interrompido e a cor azul não mais é produzida na presença do substrato X-Gal. O *lacZ* age, portanto, como um gene marcador, permitindo a seleção das células infectadas com os vírus recombinantes.

O vírus recombinante vSynlitx1 apresentou, portanto, um fenótipo de placa positivo para poliedros e negativo para a cor azul durante o isolamento e purificação viral em placas de 96 poços, seguindo o protocolo de *end point dilution* (O' REILLY; MILLER; LUCKOW, 1994) (Fig. 11A).

2.2.2. vSynlitx1G4 (MutApo)

Durante a seleção, por diluição seriada em placa, do vírus anteriormente descrito, notou-se um fenótipo diferente em um determinado poço da placa. As células do poço G4 pareciam apoptóticas e não chegavam a produzir poliedros. Para purificação e posterior análise de um possível vírus mutante, o sobrenadante desse poço foi coletado e submetido a diluições seriadas.

O vírus isolado foi então amplificado em células Tn-5B, purificado por ultracentrifugação e seu DNA foi extraído usando a metodologia descrita por O'Reilly, Miller e Luckow (1994). Após a purificação, o DNA viral foi digerido com a enzima de restrição *Bam*HI. Essa digestão revelou o aparecimento de um fragmento extra de 5.000 pb (dados não mostrados). Este fragmento foi clonado no plasmídeo pBluescript SK+ (Stratagene) e parcialmente seqüenciado. A análise da seqüência desse fragmento revelou a presença de uma seqüência de DNA interrompendo o gene anti-apoptótico *p35*.

Devido à morte prematura das células infectadas com esse vírus não foi possível detectar formação de poliedros ou produção de poliedrina, portanto, não se sabe se se trata também de um recombinante contendo o cassete de expressão do pSynlitx1.

Por aparentemente induzir apoptose nas células por ele infectadas, esse vírus foi denominado MutApo (Fig. 11B).

2.2.3. vSynlitx1B12P (MutPolh)

Ainda durante o isolamento do vírus recombinante vSynlitx1, foi detectado, no poço B12, um outro fenótipo de placa peculiar, no qual as células apresentavam manchas escuras no citoplasma, uma superfície irregular e pouca ou nenhuma produção de poliedros, levando a crer que poderia haver alguma mutação no gene *polh* desse vírus.

O possível mutante foi isolado, amplificado e purificado para posterior análise, como já descrito. O DNA viral foi igualmente extraído e usado em uma reação de

PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos para a região do gene da poliedrina (*polh*). O oligonucleotídeo *forward* (ORF603F) anelou-se a 162 nucleotídeos antes do códon de iniciação do gene *polh* e o *reverse* (AcpolhR) a 37 nucleotídeos após códon de parada. O fragmento amplificado foi clonado no vetor pGEM-T (Promega) para então ser seqüenciado (ABI-PRISM), e, a seqüência resultante foi analisada com os programas *open reading frame finder* (ORF *finder*) e BLAST, no endereço eletrônico <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Essas análises mostraram uma mutação em um único nucleotídeo do gene *polh* (G para T) na posição +352, o que modificou somente um aminoácido da proteína Polh (Val para Phe).

Devido ao fato desse vírus conter o gene *polh* pode-se concluir que se trata de um recombinante e, por isso, contém também o gene *litx1*. Contudo, esse isolado aparentou ser ineficiente na formação de poliedros e, por isto, foi denominado MutPolh (Fig. 11C).

2.2.4. vSynpolhrevC7 (PolhRev)

O gene *polh* mutante, amplificado a partir do vírus MutPolh, foi digerido com enzimas de restrição apropriadas originando um fragmento de 500pb. Esse fragmento, contendo a seqüência *mutpolh*, foi usado para substituir o gene *polh* selvagem (*polhwt*), no vetor de transferência pSynXIVVI⁺X3. O plasmídeo resultante, pSynpolhmut, foi então usado para a construção de um novo vírus recombinante com o vírus parental vSynVI⁻Gal, como descrito no item 2.1.

O objetivo dessa construção foi confirmar o fenótipo visto para o vírus MutPolh, e, dessa forma, provar que essa mutação pontual no gene *polh* mutante era a única responsável por tal fenótipo. Atendendo ao esperado, o vírus construído mostrou ser revertente ao mesmo fenótipo produzido pelo vírus MutPolh, sendo, dessa forma, denominado PolhRev (Fig. 11D) (Quadro 1).

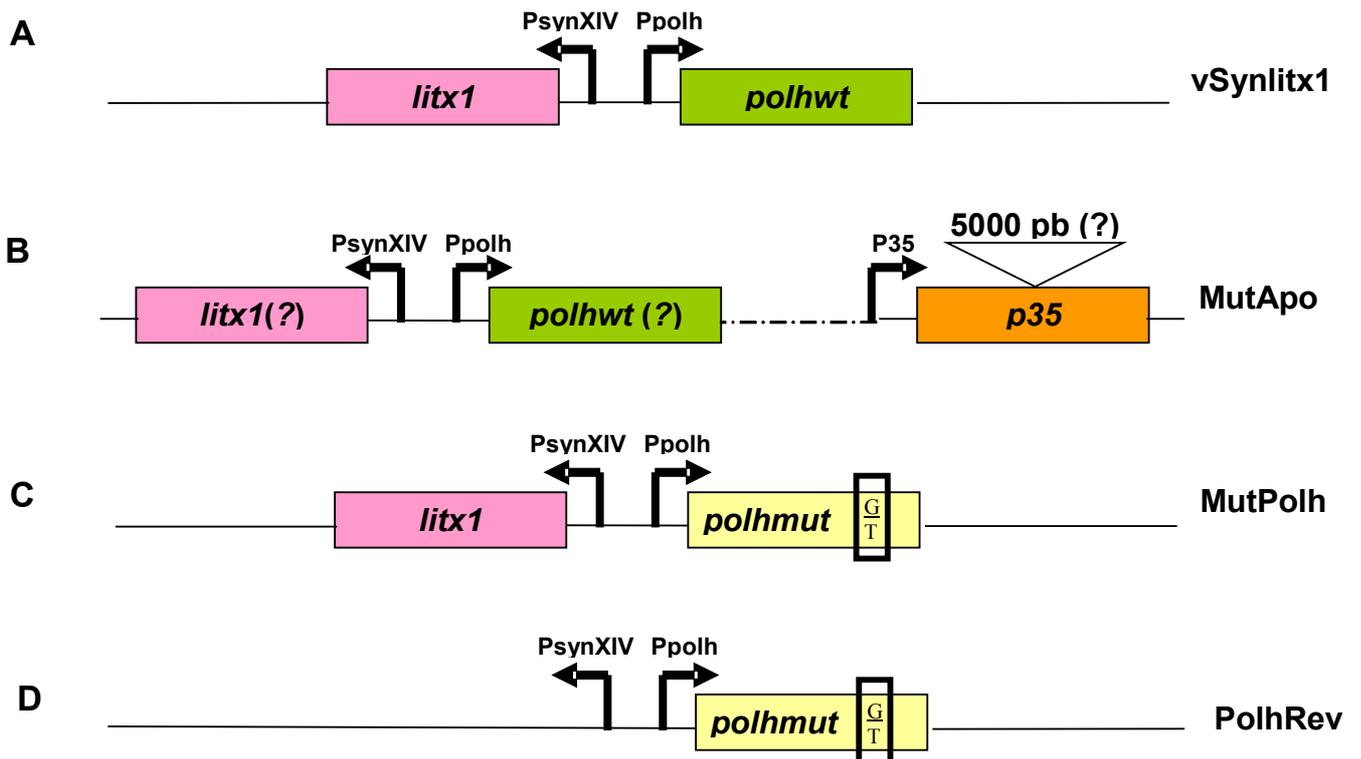


Figura 11. Representação esquemática da estrutura gênica dos vírus utilizados. **(A)** O vSynlitx1 contém o gene *litx1* sob o comando do promotor sintético pSynXIV e o gene *polh* selvagem sob o comando do seu respectivo promotor (cassete de expressão do pSynlitx1); **(B)** O MutApo contém uma inserção de tamanho desconhecido no gene antiapoptótico *p35*, mas não se sabe se contém o cassete de expressão; **(C)** O MutPolh contém o cassete de expressão, porém, o gene *polh* possui uma mutação pontual (G para T) e **(D)** O PolhRev contém o mesmo gene *polhmut* do vírus MutPolh, porém não possui uma cópia do *litx1*.

Vírus	Natureza	Gene heterólogo	Mutação	Fenótipo	Objetivo de uso
AcMNPV	Selvagem	_____	_____	occ+	Controle
vSynlitx1	Recombinante	<i>litx1</i>	_____	occ+	Controle
MutApo	Rec? / Mutante	<i>litx1?</i>	Inserção em <i>p35</i>	occ- / apoptose	Caracterização de infecção
MutPolh	Rec / Mutante	<i>litx1</i>	Pontual em <i>polh</i>	occ-	Caracterização de infecção
PolhRev	Recombinante	<i>polhmut</i>	_____	occ-	Controle

Quadro 1. Relação dos vírus utilizados neste trabalho e suas características

Nota: occ+ (positivo para oclusões); occ- (negativo para oclusões)

2.3. INFECCÕES

Os vírus utilizados neste trabalho foram inoculados, separadamente, tanto em células Sf-21 quanto em Tn-5B. Para isso, cultivou-se essas células em placas de seis poços (aproximadamente 1×10^6 células por poço) com 3 mL de meio de cultura, cada poço, e, quando estas estavam bem estabelecidas e aderidas à superfície, foram infectadas com 300 μ L de inóculo viral [aproximadamente, entre 20 e 30 unidades formadoras de placa por célula (pfu/célula)]. As células infectadas foram mantidas à temperatura ambiente. A contagem de tempo pós-infecção (p.i.) começou a partir de uma hora após esse procedimento.

2.4. ANÁLISE ESTRUTURAL DE CÉLULAS INFECTADAS

2.4.1. Microscopia de luz invertida

Células Sf-21 e Tn-5B infectadas foram observadas e fotografadas em microscópio invertido Zeiss (Axiovert 100) aos seguintes tempos pós-infecção: para infecções com AcMNPV, vSynlitx1 e PolhRev, a 72h p.i. – para a caracterização estrutural da fase tardia das infecções-controle; para infecções com MutApo, a 24 e 48h p.i. – para a caracterização estrutural do processo de apoptose nessas infecções; e, para infecções com MutPolh, a 48 e 72h p.i. – para a caracterização estrutural da progressão dessas infecções nos tempos tardios. Padronizou-se todas as fotos utilizando a objetiva de 32x. Células não infectadas (*mock*) de ambas as linhagens foram usadas como controle (Quadros 2 e 3).

2.4.2. Microscopia de contraste interferencial diferencial – DIC

As mesmas células foram também analisadas em microscópio Axiophot Zeiss, utilizando contraste de fase. Para isso, foi retirado o excesso de meio de cultura dos

poços e as células foram cuidadosamente ressuspendidas e usadas frescas para a preparação de lâminas. As lâminas foram imediatamente observadas e fotografadas, padronizando-se o uso da objetiva de 40x. Essas fotos foram utilizadas como *insets* neste trabalho.

2.5. ANÁLISE ULTRA-ESTRUTURAL DE CÉLULAS INFECTADAS

2.5.1. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Células Sf-21 e Tn-5B infectadas foram fixadas e processadas aos seguintes tempos p.i.: para infecções com AcMNPV e vSynlitx1, a 72h p.i. – para a caracterização ultra-estrutural da fase tardia das infecções-controle; para infecções com MutApo, a 24 e 48h p.i. – para a caracterização ultra-estrutural do processo de apoptose nessas infecções; e, para infecções com MutPolh, a 48, 72 e 96h p.i. – para a caracterização ultra-estrutural da progressão dessas infecções nos tempos tardios. Células *mock* de ambas as linhagens foram igualmente fixadas e processadas para controle (Quadros 2 e 3).

Ainda nas placas de cultura, as células foram inicialmente lavadas em 0,1M de tampão PBS pH 6,4 e fixadas por, aproximadamente, 1 min, em fixador Karnovsky (2% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído tamponado em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio pH 6,4) com 5% de sacarose. Em seguida, foram cuidadosamente ressuspendidas, transferidas para micro tubos tipo *ependorf* e fixadas no mesmo fixador por mais 3h a 4°C. Logo em seguida, as amostras foram submetidas a uma centrifugação de 5.000 rpm por 5 min e o sedimento resultante foi lavado três vezes por 5 min, cada vez, em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio pH 6,4. Depois, foram pós-fixadas por 30 min em 1% de tetróxido de ósmio, 0,8% de ferricianeto de potássio e 5 mM de cloreto de cálcio em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio pH 6,4; lavadas três vezes por 5 min, cada vez, em água destilada, e contrastadas *in bloc* durante a noite com 0,5% de acetato de uranila. Por último, foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30 - 100%) por 5 min em cada concentração, incluídas em resina Spurr e emblocadas por 72h a 60°C.

Após ultramicrotomia, as seções ultrafinas foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011 a 80 KV.

2.5.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Células Sf-21 e Tn-5B infectadas com o vírus MutApo foram fixadas a 24h p.i., tempo em que foi observada, por microscopia óptica, alta taxa de morte celular. Para evitar qualquer estresse mecânico que pudesse interferir na morfologia das células, todo o processamento foi feito nas placas onde as células foram cultivadas. Células *mock* de ambas as linhagens foram utilizadas como controle (Quadros 2 e 3).

As células foram lavadas com 0,1 M de tampão PBS pH 6,4 e fixadas por 30 min em fixador Karnovsky (2% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído tamponados em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio pH 6,4) com 5% de sacarose, à temperatura ambiente. As células foram lavadas três vezes, por 5 min, cada vez, em 0,1M de tampão cacodilato de sódio pH 6,4, pós-fixadas por 30 min em 1% de tetróxido de ósmio, 0,8% de ferricianeto de potássio e 5 mM de cloreto de cálcio em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio pH 6,4 e novamente lavadas três vezes por 5 min, cada vez, em água destilada. Em seguida, as amostras foram desidratadas com concentrações crescentes de etanol (30 - 100%) por 5 min, cada concentração, e submetidas à secagem ao ponto crítico com CO₂ no secador Balzers CPD 030. Finalmente, foram recobertas com ouro no aparelho Sputter Coater Balzers SPD 050 e observadas em microscópio eletrônico de varredura Jeol 840A .

2.5.3. Imunocitoquímica

Células Tn-5B infectadas com o vírus MutPolh foram fixadas a 72h p.i., tempo em que há alta produção de poliedrina (Quadro 2).

Após isso, as células foram lavadas em 0,1M de PBS e fixadas, ainda na placa, por aproximadamente 1 min, com 4% de paraformaldeído, 0,5% de glutaraldeído e 0,01% de ácido pícrico em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio pH

6.4 com 5% de sacarose. Em seguida, foram cuidadosamente ressuspendidas, transferidas para micro tubos tipo *ependorf* e fixadas por mais 3h a 4°C. Após a fixação, as células foram lavadas duas vezes em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio pH 6,4 e, os grupamentos aldeídicos livres, foram bloqueados, para se evitar ligação inespecífica de anticorpos, por 1h com 50 mM de cloreto de amônio. Em seguida, as amostras foram lavadas duas vezes em água destilada e contrastadas *in block* durante a noite com solução aquosa de acetato de uranila a 2%, na ausência de luz e a 4°C. Depois, foram novamente lavadas duas vezes em água destilada e desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30 – 90%) por 10 min, cada concentração. Finalmente, foram incluídas em resina LR Gold e emblocadas por 72h a -20°C sob luz ultravioleta.

Para imunomarcção, secções ultrafinas em telas de níquel foram inicialmente incubadas por 30 min em 80 mM de cloreto de amônio em 0,1 M de PBS pH 8,0, e, em seguida, incubadas por 1h em tampão de bloqueio (0,01% de tween 20, 1,5% de BSA em 0,1 M de tampão PBS pH 8,0) a temperatura ambiente. Logo em seguida, as telas foram incubadas por 1h com o 1° anticorpo (soro de coelho imunizado contra a poliedrina de AcMNPV) diluído em tampão de bloqueio numa proporção de 1:50, e, logo após, por mais 1h com o 2° anticorpo (anti-IgG de coelho complexado a partículas de ouro coloidal de 25 nm) diluído em tampão de bloqueio numa proporção de 1:20, a temperatura ambiente. Por último, as amostras foram cuidadosamente lavadas duas vezes em 0,1 M de PBS pH 8,0 e uma vez em água destilada e analisadas ao MET a 80 KV. Como controle de especificidade de ligação foram usadas células incubadas diretamente no anticorpo secundário.

Vírus	Tempos															
	24h p.i.				48h p.i.				72h p.i.				96h p.i.			
	MO	MET	MEV	Imuno												
Acwt									X	X		X				
vSynlitx1									X							
MutRev									X							
MutPolh					X	X			X	X		X		X		
MutApo	X	X	X		X	X										

Quadro 2. Tipos de microscopia x tempos x vírus utilizados para células **Tn-5B**

Vírus	Tempos															
	24h p.i.				48h p.i.				72h p.i.				96h p.i.			
	MO	MET	MEV	Imuno												
Acwt									X							
vSynlitx1									X	X						
MutRev									X							
MutPolh					X	X			X	X						
MutApo	X	X	X		X	X										

Quadro 3. Tipos de microscopia x tempos x vírus utilizados para células **Sf-21**

2.6. ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE POLIEDRINA POR SDS-PAGE

Células Tn-5B cultivadas em placas de 6 poços (aproximadamente 1×10^6 células por poço) foram infectadas separadamente com AcMNPV, vSynlitx1, MutPolh e PolhRev. Essas células foram ressuspendidas em 0,1 M de PBS pH 7,5, 72h p.i., tempo em que há alta produção de poliedrina. Em seguida, as células foram centrifugadas a 5.000 rpm por 5 min, o sedimento resultante lavado em PBS, e, então, fervido em tampão de amostra SDS [*electrophoresis sample buffer* (ESB): 0.0625 M-tris HCl, pH 6.8, 1% SDS, 2% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol e 0.001% azul de bromofenol)]. Os extratos celulares foram submetidos à corrida em gel de poliacrilamida 12% no aparelho Mini Protean, seguindo as instruções do fabricante (Bio-Rad). Após a corrida, o gel foi corado em uma solução de ácido acético: metanol: água (10:40:50) com 0,1% de corante *Comassie brilliant blue* e descoradas na mesma solução sem o corante (LAEMMLI, 1970). Como controle foi utilizado extrato de células *mock* preparado como descrito acima.

3. RESULTADOS

3.1. ANÁLISE ESTRUTURAL, ULTRA-ESTRUTURAL E BIOQUÍMICA DA INFECÇÃO PELO BACULOVÍRUS MUTANTE MutPolh

3.1.1. Microscopia de luz

Para a caracterização em nível estrutural dos efeitos citopatológicos causados durante a infecção pelo mutante MutPolh, bem como comparação com a infecção pelos vírus-controle (Acwt, vSynlitx1 e PolhRev), culturas de células Tn -5B e Sf-21 foram observadas por microscopia de luz, em vários tempos pós-infecção (p.i.), com ênfase nos tempos tardios de 72 h p.i., para os vírus -controle, e de 48 e 72 h p.i., para o vírus MutPolh. Esses tempos foram escolhidos porque são estágios tardios do ciclo de infecção por baculovírus, quando a produção de poliedrina é mais intensa.

3.1.1.1. Células Tn-5B

Células Tn-5B saudáveis apresentam aspecto fusiforme e permanecem, em sua maioria, aderidas à placa de cultura, podendo apresentar projeções citoplasmáticas ao longo de toda a superfície celular (Fig. 12A). As mesmas células infectadas com o vírus selvagem AcMNPV (Acwt) ou com o vírus recombinante vSynli x1 foram observadas a 72 h p.i. e apresentaram um padrão de infecção típico do vírus selvagem, com perda de adesão à placa de cultura, hipertrofia nuclear, arredondamento celular e presença de poliedros na maioria das células. Em geral, as células infectadas com vSynlitx1 pareciam ter poliedros menores e mais numerosos que aquelas infectadas com Acwt (Figs. 12B e 12C).

Células infectadas com o mutante MutPolh apresentaram características morfológicas distintas das descritas anteriormente para o vírus selvagem ou para o recombinante vSynlitx1. Estas células, após 48 e 72 h da infecção mostraram, em geral, ausência de poliedros e formação de massas amorfas no citoplasma com um

padrão refrativo (brilho) similar ao de poliedros. Assim, esses agregados protéicos eram compostos, aparentemente, de poliedrina não cristalizada e foram preditos como tal durante todas as observações.

A 48 h p.i., algumas células já apresentavam acúmulos de poliedrina, mas a 72h p.i. esse acúmulo foi mais evidente e generalizado, alterando significativamente o volume celular (Figs. 12E e 12F). Raramente foi visto algum poliedro formado no núcleo dessas células. Neste mesmo tempo p.i., o recombinante PolhRev reproduziu os mesmos efeitos citopáticos descritos para MutPolh (Fig. 12D).

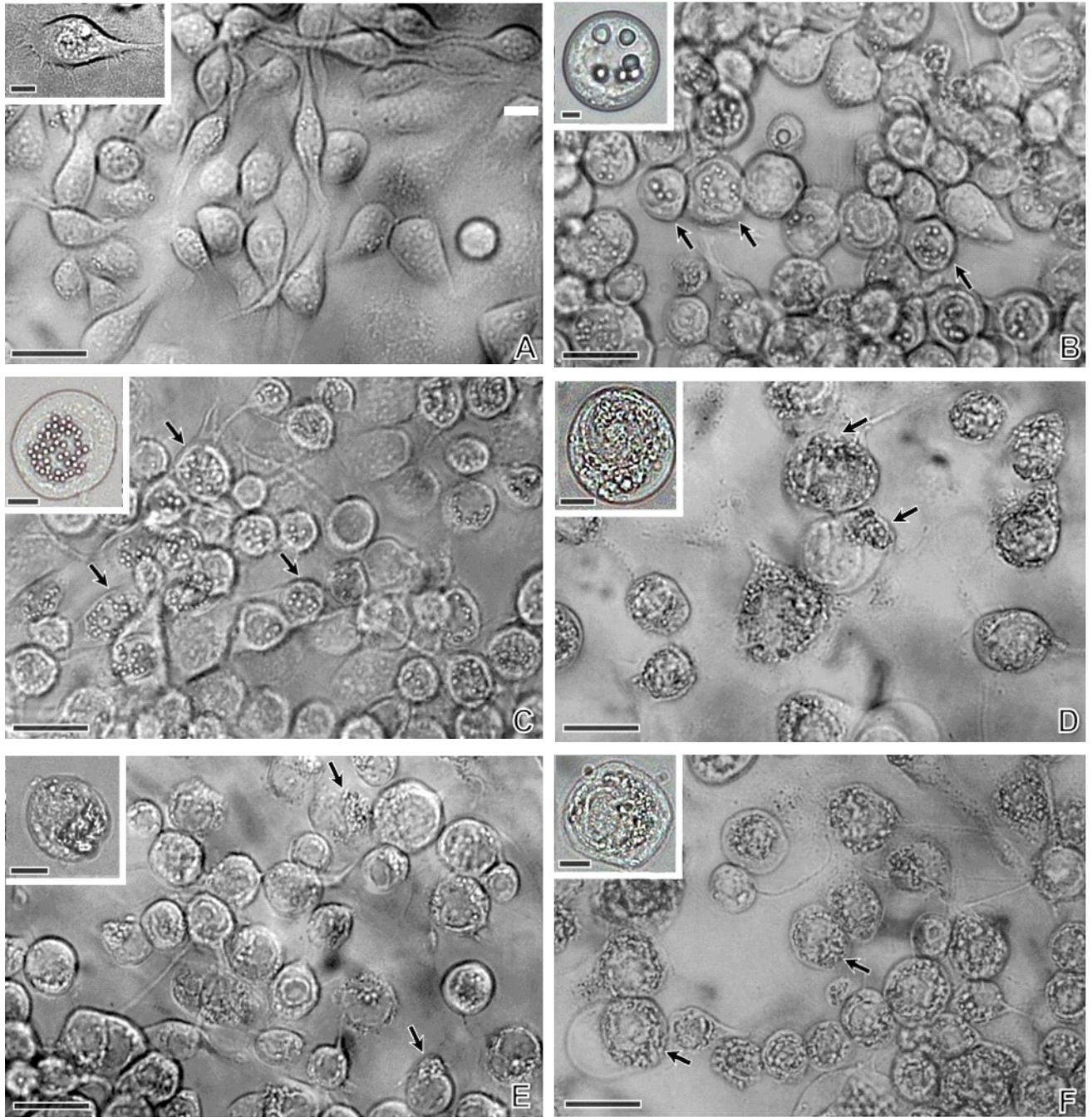


Figura 12. Micrografias de cultura de células Tn-5B não infectadas **(A)** ou infectadas por AcMNPV tipo-selvagem **(B)**; vSynlitx1 **(C)**; PolhRev **(D)**, a 72h p.i.; ou MutPolh **(E e F)**, a 48 e 72h p.i., respectivamente. Setas indicam células com efeitos citopáticos característicos da infecção. Os *insets* mostram mais detalhes das células controle e infectadas. Barras = 30 μm ou 10 μm (*insets*).

3.1.1.2. Células Sf-21

Este tipo celular caracteriza-se basicamente por ter formato arredondado e uma fraca adesão à placa de cultura, permanecendo, a maioria das células, dispersas no sobrenadante (Fig. 13A). Essas células, quando infectadas com o vírus Acwt ou com o recombinante vSynlitx1, a 72h p.i., mostraram padrão de infecção típico do vírus selvagem, com presença massiva de poliedros na maioria das células infectadas (Figs. 13B e 13C).

A infecção com o vírus MutPolh nessas células apresentou as mesmas características observadas para a infecção em células Tn-5B, porém a diferença quantitativa no acúmulo de poliedrina no citoplasma a 48 e 72h p.i. não foi tão evidente (Figs. 13E e 13F). O vírus reverso PolhRev também mostrou um fenótipo de infecção viral indistinguível daquele para o MutPolh, a 72h p.i. (Fig. 13D).

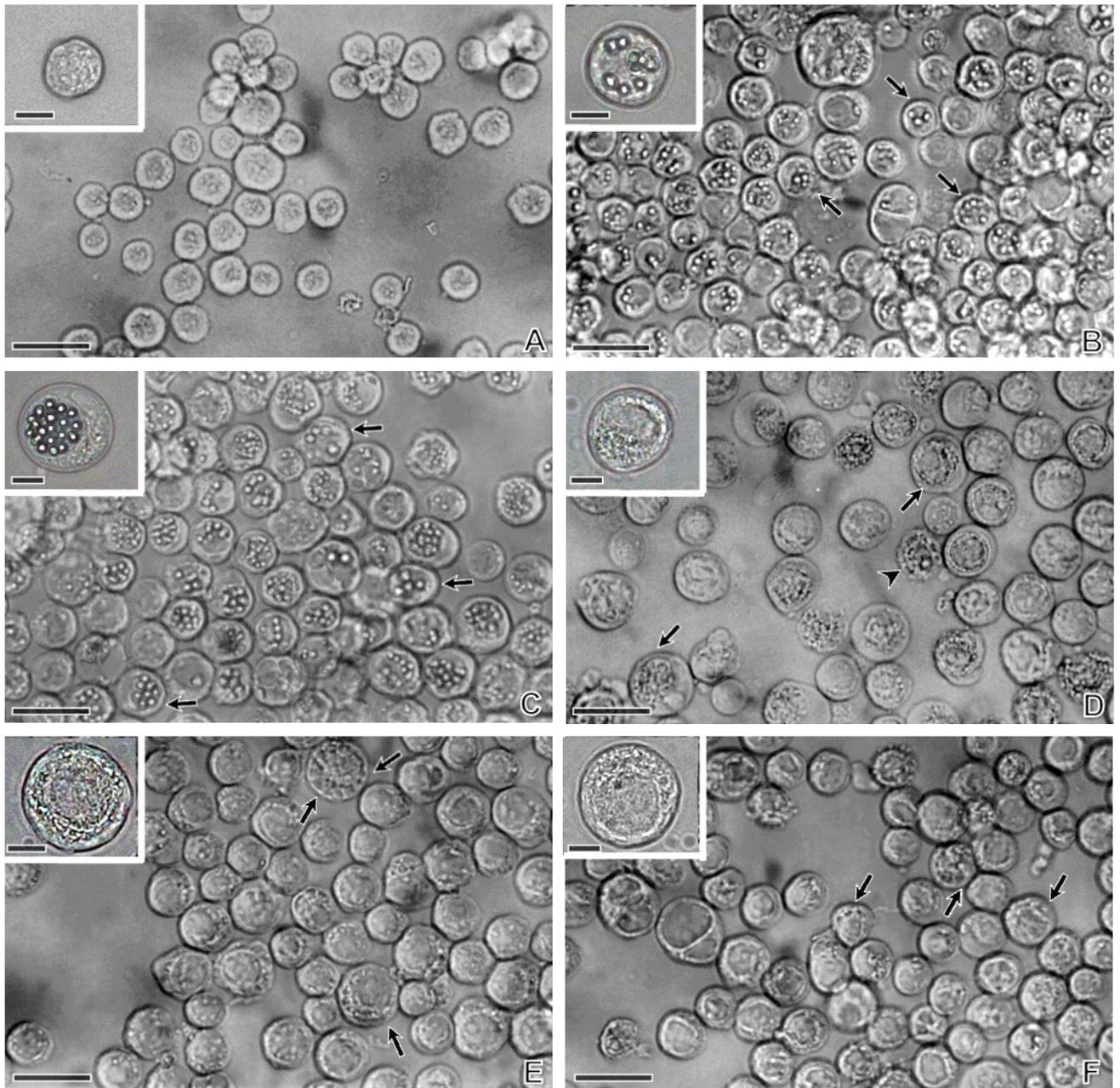


Figura 13. Micrografias de cultura de células Sf-21 não infectadas **(A)** ou infectadas por AcMNPV tipo-selvagem **(B)**; vSynlitx1 **(C)**; PolhRev **(D)**, a 72h p.i.; ou MutPolh **(E e F)**, a 48 e 72h p.i., respectivamente. Setas indicam células com efeitos citopáticos característicos da infecção. Cabeça de seta indica célula com rara aparição de poliedro no núcleo **(D)**. Os *insets* mostram mais detalhes das células controles e infectadas. Barras = 30 μm ou 10 μm (*insets*).

3.1.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Com o intuito de se caracterizar mais precisamente a infecção por MutPolh, foram observados detalhes ultra-estruturais de células infectadas por esse mutante, usando como parâmetro aqueles observados para os vírus controles. Assim, células Tn-5B e Sf-21 foram analisadas por MET, a vários tempos p.i., com ênfase nos tempos tardios de 48, 72 e 96h p.i., para o vírus MutPolh, quando a produção de poliedrina é mais intensa.

3.1.2.1. Células Tn-5B

Células Tn-5B não-infectadas apresentam um núcleo irregular, delineado por um envelope nuclear sinuoso, e contendo porções de heterocromatina dispersas por todo o seu interior. Essas células são ricas em mitocôndrias, evidenciando intenso metabolismo energético, e possuem muitas projeções citoplasmáticas na superfície celular (Fig. 14A).

As mesmas células, infectadas com o vírus Acwt, a 72h p.i., mostram características típicas dessa infecção, como por exemplo, ausência de projeções citoplasmáticas, núcleo hipertrofiado e arredondado com estroma virogênico maduro ao centro, envelopamento de nucleocapsídeos para a formação de poliedros em uma região periférica (*ring zone*) e transporte de nucleocapsídeos para o citoplasma através de vesículas derivadas do envelope nuclear. Há, ainda, presença de agregados de P10, uma proteína fibrilar compacta que costuma aparecer na infecção tanto no núcleo quanto no citoplasma (Fig. 14B).

Quando infectadas com o vírus MutPolh, a 48h p.i., essas células ainda apresentavam muitas projeções citoplasmáticas. Havia presença de numerosas mitocôndrias por todo o citoplasma e este também mostrava formação de muitos vacúolos. O núcleo estava hipertrofiado e arredondado com presença de um estroma virogênico imaturo e porções de heterocromatina dispostas na periferia (Fig. 14C). Pôde-se observar intenso envelopamento de nucleocapsídeos e dobramento

do envelope nuclear para a formação de vesículas de transporte contendo partículas virais (Fig. 14D).

A 72h p.i., as células perderam as projeções citoplasmáticas, apresentando a superfície mais ou menos lisa e as mitocôndrias ficaram mais escassas. Começou-se a observar a presença de agregados de proteína P10 no citoplasma e núcleo, e apareceram consideráveis acúmulos de poliedrina no citoplasma (Fig. 15A). Em maior aumento, pôde-se observar no citoplasma agregados amorfos de poliedrina próximos a porções de P10 e, em menor quantidade, no núcleo. (Fig. 15B).

A 96h p.i., as células apresentavam uma superfície irregular e um citoplasma vacuolizado, indicando uma perda de integridade celular e eminente morte. Os agregados de proteína P10 continuavam dispostos tanto no núcleo quanto no citoplasma. Grandes acúmulos de poliedrina apareciam no citoplasma, e, a poliedrina nuclear formava alguns agregados menores, em geral na região periférica do núcleo (Fig. 15C). Verificou-se, ainda, a presença de um estroma virogênico maduro e muitos nucleocapsídeos envelopados concentrados na periferia nuclear. Apesar de ter sido observada associação de poliedrina com nucleocapsídeos, não havia nenhum indício de formação de poliedros (Fig. 15D).

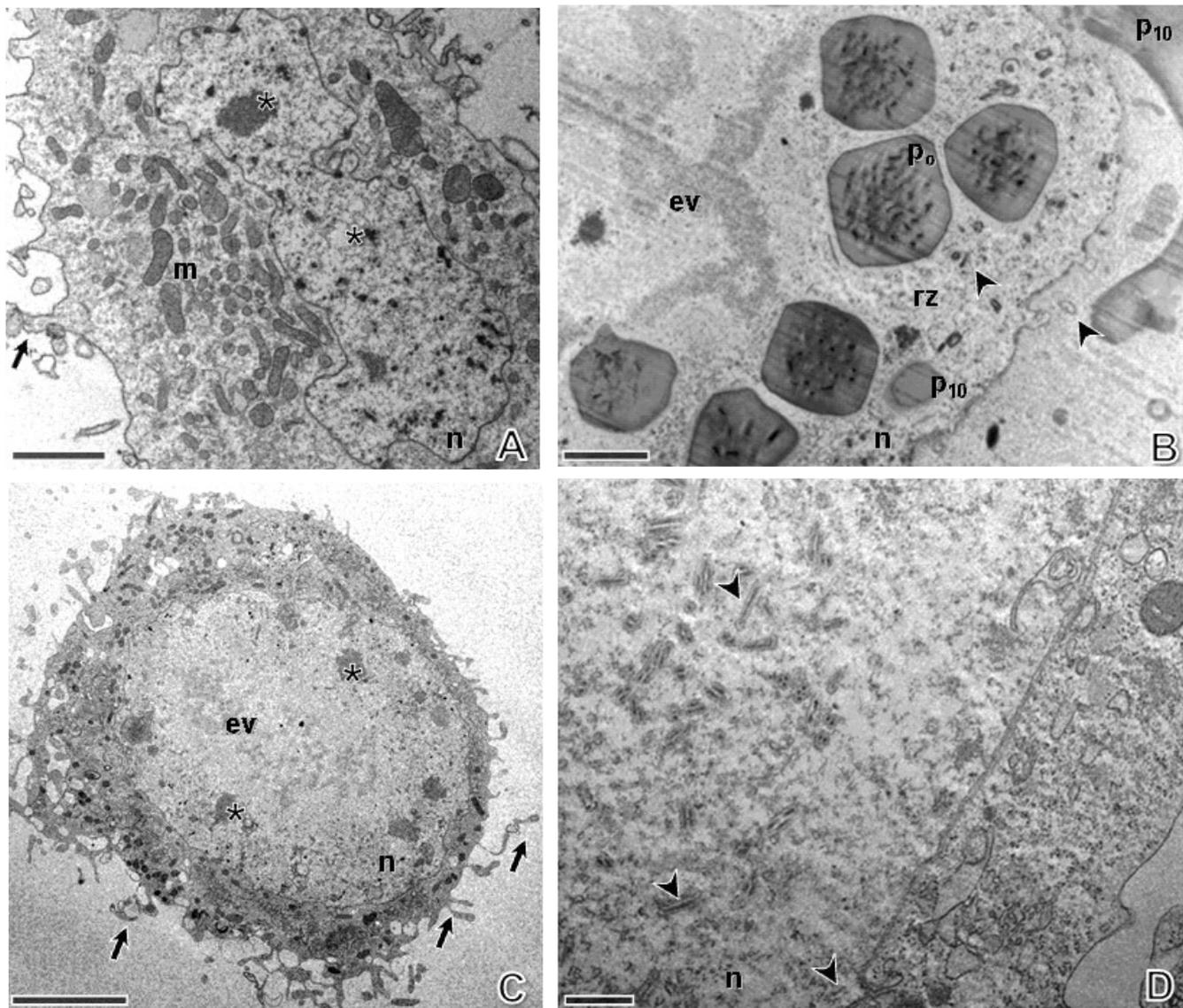


Figura 14. Micrografias eletrônicas de célula Tn-5B não infectada **(A)**; infectada por AcMNPV tipo-selvagem, a 72h p.i. **(B)** ou por MutPolh, a 48h p.i. **(C e D)**. **n**, núcleo; **m**, mitocôndria; **ev**, estroma virogênico; **rz**, *ring zone*; **p₀**, poliedro e **p₁₀**, P10. Asteriscos, setas e cabeças de setas indicam, respectivamente, cromatina, projeções citoplasmáticas e nucleocapsídeos. Barras equivalem a 2 μm , em **(A)**; 0,2 μm , em **(B)**; 5 μm em **(C)** e 0,5 μm , em **(D)**.

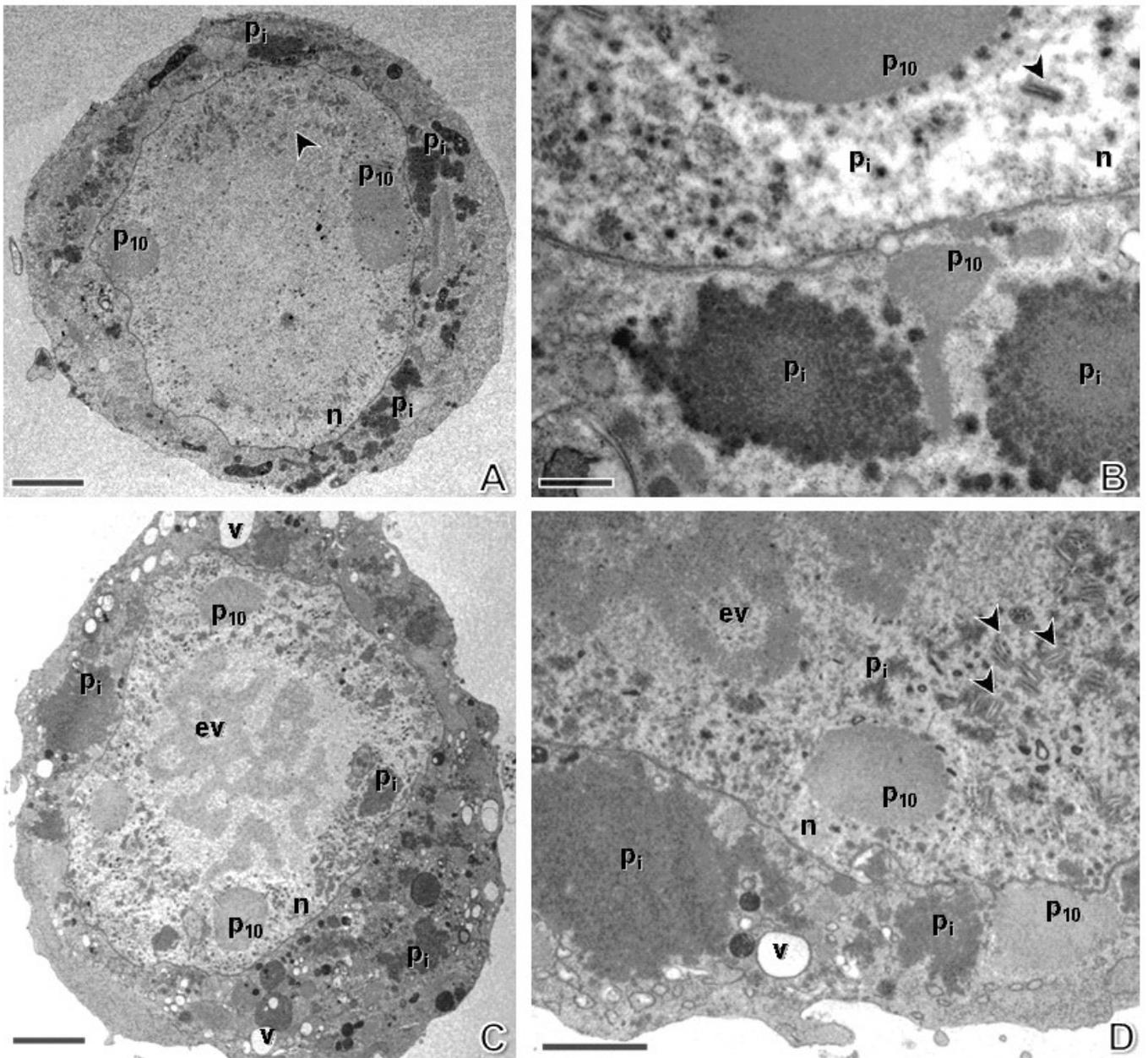


Figura 15. Micrografias eletrônicas de células Tn-5B infectadas por MutPolh, a 72h p.i. (A e B) e a 96h p.i. (C e D). n, núcleo; ev, estroma virogênico; p_i, poliedrina; p₁₀, P10 e v, vacúolo. Cabeças de setas indicam nucleocapsídeos. Barras equivalem a 2 μm, em (A e C); 0,5 μm, em (B) e 1 μm, em (D).

3.1.2.2. Células Sf-21

Células Sf-21 não infectadas apresentam algumas características ultra-estruturais similares àquelas descritas para Tn-5B, como um núcleo de formato irregular, delineado por um envelope nuclear sinuoso, contendo porções de heterocromatina de vários tamanhos dispersas pelo seu interior. Foi observada, também, presença massiva de mitocôndrias e projeções citoplasmáticas e, algumas vezes, vacúolos fagocíticos (Fig. 16A).

Essas células, quando infectadas pelo vírus recombinante vSynlitx1 (72h p.i.), também apresentaram citopatologia típica, similar à infecção pelo Acwt, com perda de projeções citoplasmáticas, núcleo hipertrofiado, presença de estroma virogênico maduro e da proteína P10 e produção de poliedros contendo nucleocapsídeos em seu interior. Também foram observados vacúolos fagocíticos (Fig. 16B).

Quando infectadas pelo mutante MutPolh, essas células apresentaram, em geral, efeitos citopatológicos similares àqueles para a mesma infecção em Tn-5B. Porém, a 48h p.i., as células já haviam perdido as projeções citoplasmáticas e não havia presença significativa de vacúolos. Outra diferença é que a esse tempo já havia presença visível de partículas de poliedrina tanto no citoplasma quanto no núcleo, mas estas ainda não formavam agregados (Fig. 16C). Também, foi possível observar muitos nucleocapsídeos envelopados na região periférica do núcleo e, mais detalhadamente, as partículas de poliedrina. Algumas delas pareciam estar migrando para o núcleo através do envelope nuclear, porém não havia associação alguma com os nucleocapsídeos ali presentes. A esse tempo foi possível, ainda, observar agregados fibrilares de P10, confirmando que a infecção já estava em seu estágio tardio (Fig. 16D).

A 72h p.i., foram visualizadas notáveis quantidades de agregados de poliedrina por todo o citoplasma, mas as partículas que atingiam o núcleo não estavam associadas, aparecendo dispersas por toda essa região. Havia grande quantidade, também, de P10, inclusive entremeada pelos agregados de poliedrina (Fig. 16E). A diferença entre os agregados de poliedrina no citoplasma e as partículas da mesma proteína dispersas pelo núcleo pôde ser observada, assim como feixes de P10 localizados no citoplasma, adjacente ao envelope nuclear (Fig. 16F).

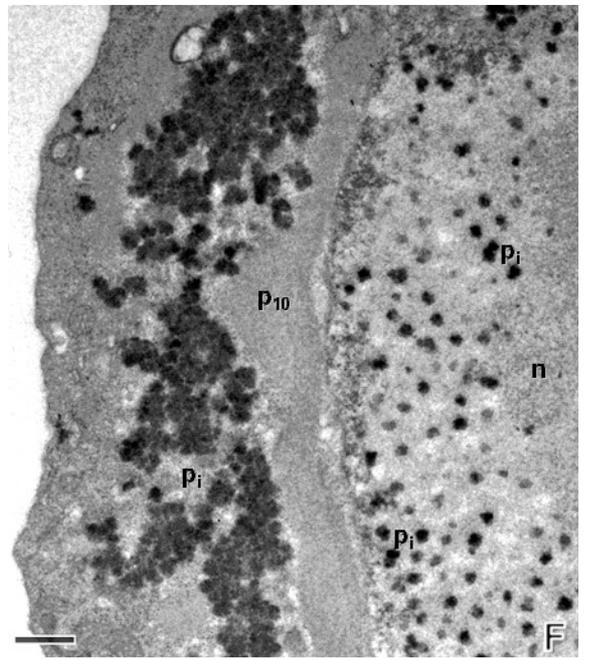
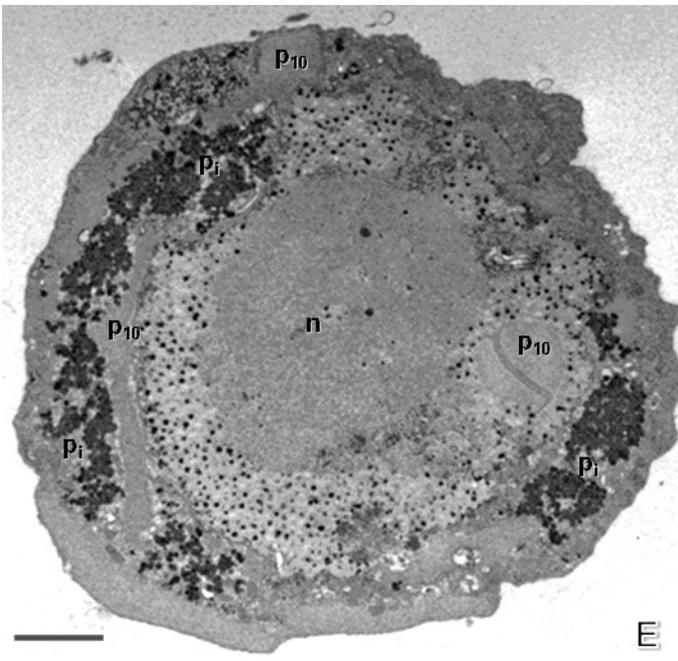
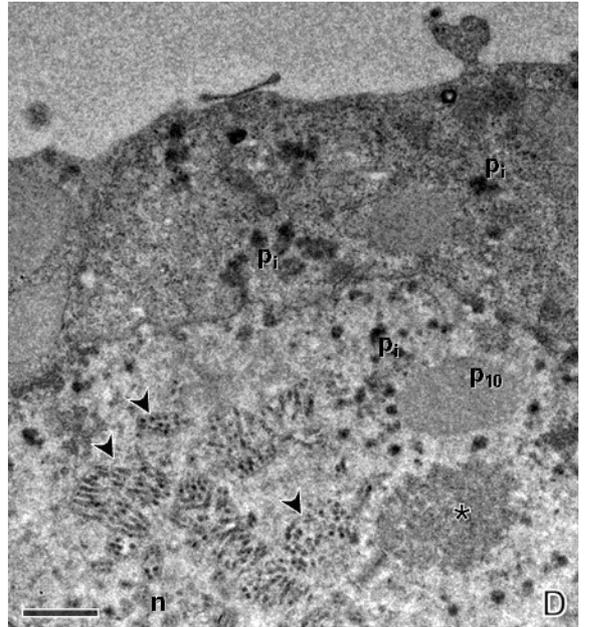
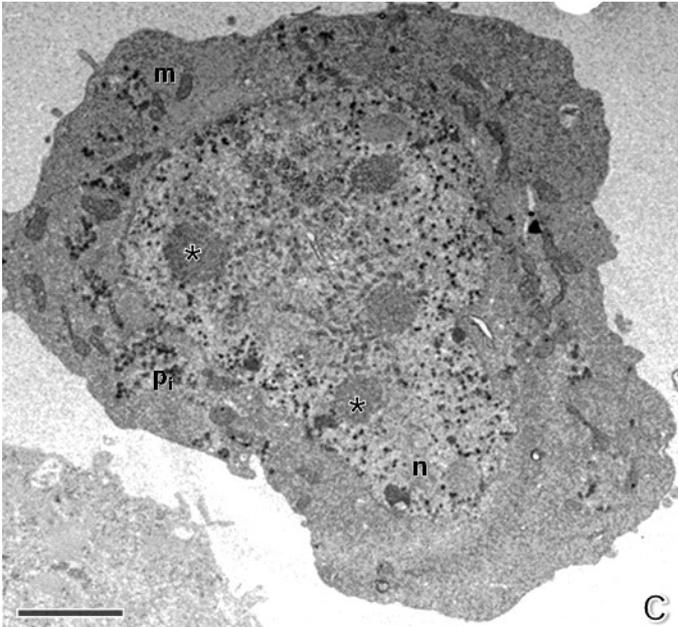
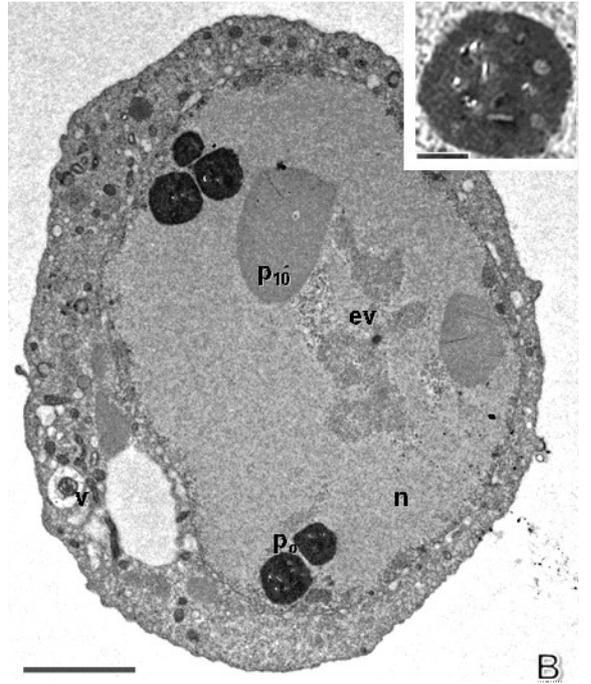
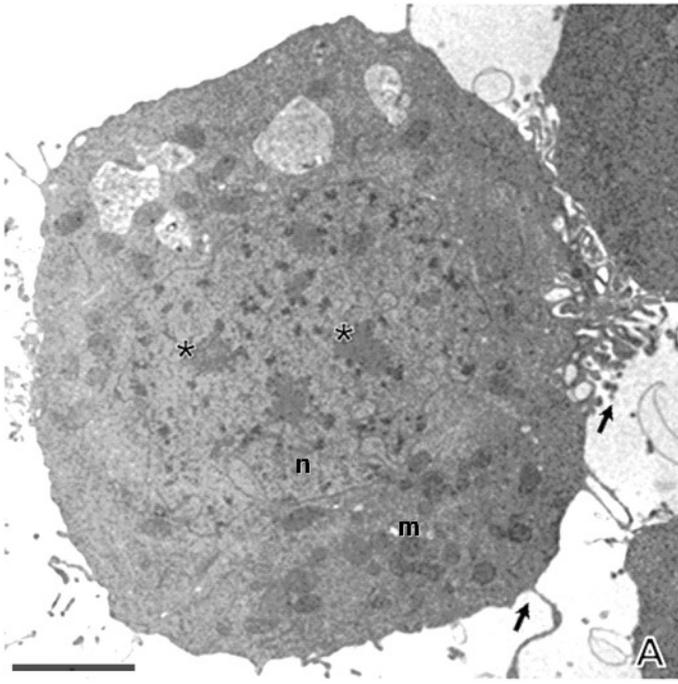


Figura 16. Micrografias eletrônicas de célula Sf-21 não infectada (**A**); infectada por vSynlitx1, a 72h p.i. (**B**) ou por MutPolh, a 48h p.i. (**C e D**) e a 72h p.i. (**E e F**). **n**, núcleo; **m**, mitocôndria; **ev**, estroma virogênico; **p_o**, poliedro; **p_i**, poliedrina; **p₁₀**, P10 e **v**, vacúolo. Asteriscos e cabeças de setas indicam, respectivamente, cromatina e nucleocapsídeos. Barras equivalem a 2 μm , em (**A, C e E**); 3 μm , em (**B**) e 0,5 μm , em (**D e F**) e *inset*.

3.1.3. Imunocitoquímica

Com o objetivo de se comprovar que as massas protéicas observadas na infecção pelo mutante MutPolh tratavam-se realmente de poliedrina não cristalizada foi feito um experimento de imunomarcção, a 72h p.i., utilizando anticorpos primários específicos para a poliedrina e secundários conjugados a partículas de ouro. Para essa infecção foi utilizada a linhagem celular Tn-5B, devido a sua maior resistência à manipulação durante os processos de lavagem e fixação.

As células controle, também infectadas com esse mutante, foram tratadas somente com o anticorpo secundário e não apresentaram nenhuma marcação a 72h p.i. Essas células apresentaram características morfológicas similares às da infecção, acima descrita, com grandes agregados de poliedrina, localizados principalmente no citoplasma (Figs. 17A e 17B). Grandes agregados de poliedrina e da proteína fibrilar P10 puderam ser observados, também, no núcleo. (Fig. 17B).

Como controle de especificidade do anticorpo contra a poliedrina, células infectadas com o vírus Acwt foram analisadas a 72h p.i. Os poliedros presentes nestas células foram intensamente marcados com esse anticorpo, mostrando a eficiência de ligação deste com a poliedrina (Fig. 17C).

As células infectadas com o vírus mutante MutPolh apresentaram, além das mesmas características já descritas para essa infecção, intensa marcação nos agregados preditos como poliedrina, demonstrando, assim, que essas massas tratam-se realmente de acúmulos de poliedrina não cristalizada (Figs. 17D e 17E).

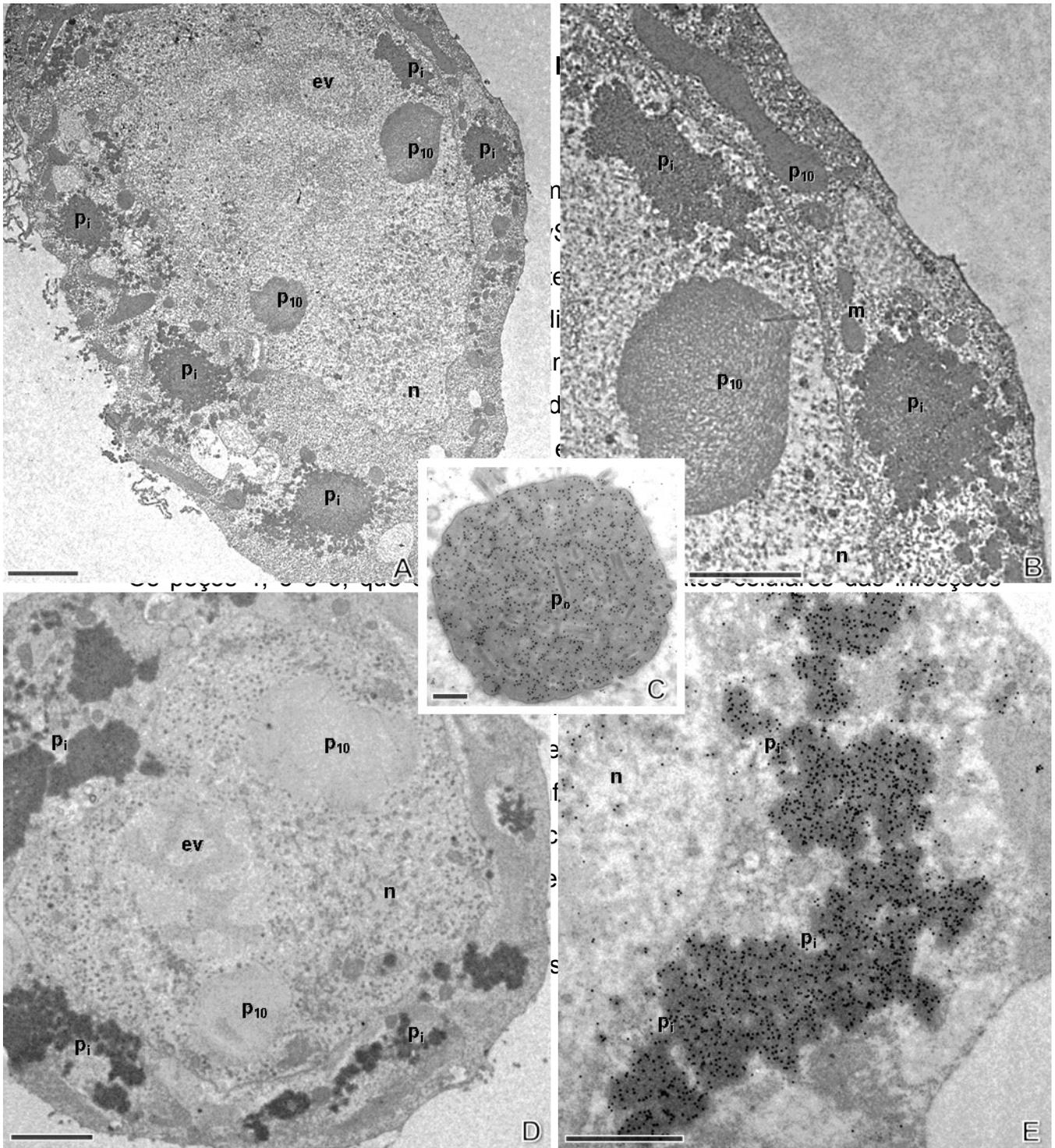


Figura 17. Micrografias eletrônicas de transmissão mostrando o resultado da imunomarcção contra poliedrina feita em células Tn-5B infectadas com o vírus MutPolh (**D** e **E**); ou com Acwt (**C**), a 72h p.i. (**A** e **B**) correspondem ao controle – somente 2º anticorpo; (**D**) diluição 1:100 e (**E**) diluição 1:50. n, núcleo; m, mitocôndria; ev, estroma virogênico; po, poliedro; pi, poliedrina e p10, P10. Barras equivalem a 2 μm, em (**A** e **D**); 1 μm, em (**B** e **E**) e 0,2 μm, em (**C**).

3.1.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para análise em nível bioquímico do mutante MutPolh, extratos de células Tn-5B *mock* ou infectadas com os vírus Acwt, vSynlitx1, MutPolh e PolhRev, a 72h p.i., foram submetidos a eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida.

Os padrões de bandas foram condizentes com o esperado, e todas as amostras de células infectadas apresentaram uma banda de aproximadamente 29 KDa correspondente à massa molecular da poliedrina. Isso demonstrou que a poliedrina expressa pelo mutante MutPolh e pelo recombinante PolhRev tem, de fato, a mesma massa molecular da poliedrina selvagem e do recombinante vSynlitx1 (Fig. 18).

Os poços 4, 5 e 6, que correspondem aos extratos celulares das infecções por vSynlitx1, MutPolh e MutRev, respectivamente, apresentaram bandas de poliedrina mais marcadas, enquanto no poço 3, que corresponde ao extrato celular de Acwt, essa banda apareceu mais suave. Isto aconteceu porque o inóculo viral de Acwt utilizado não produziu boas quantidades de poliedros naquela infecção, talvez porque tenha perdido um pouco da sua infectividade devido a um longo período guardado a 4°C sem ser novamente amplificado em células de inseto. Entretanto, a banda de poliedrina nesse poço ainda é bem visível, o que valida a afirmação de que os recombinantes vSynlitx1 e PolhRev e o mutante MutPolh produziram, durante as infecções, poliedrinas com a mesma massa molecular que a tipo selvagem, cerca de 29 KDa.

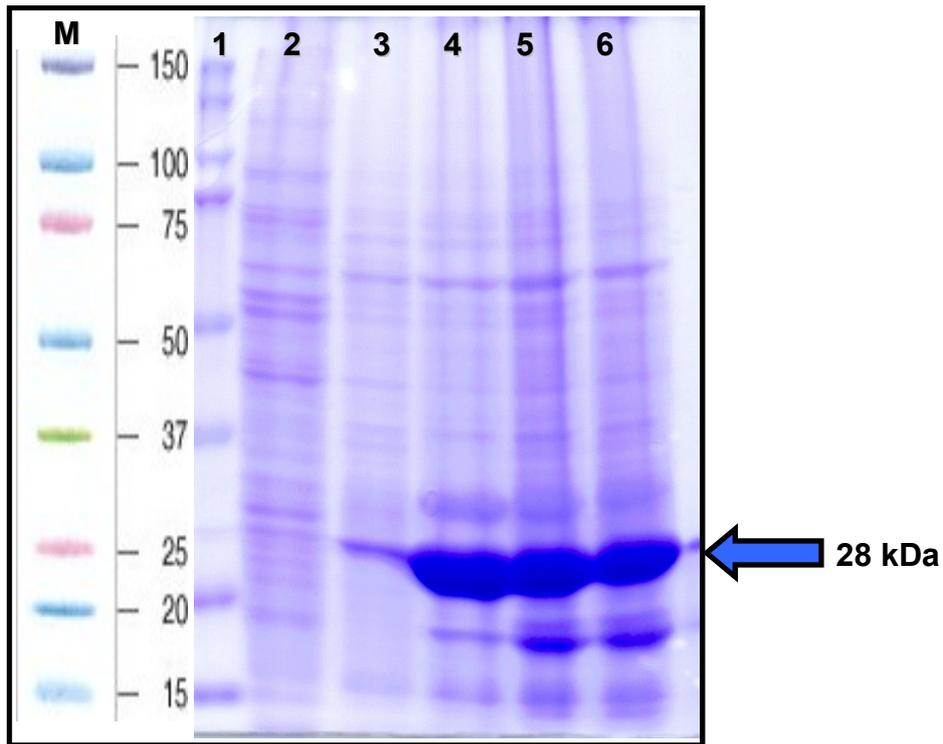


Figura 18. Gel SDS-PAGE contendo amostras de extratos de células Tn-5B não infectadas (2) ou infectadas com Acwt (3); VSynlitx1 (4); MutPolh (5) e PolhRev (6). (1) Marcador. Todos os extratos de células infectadas foram obtidos a 72 h p.i. e apresentam uma banda correspondente ao peso molecular da poliedrina de, aproximadamente, 29 KDa. (M) Marcador de massa molecular Kaleidoscope (Bio-Rad).

3.2. ANÁLISE ESTRUTURAL E ULTRA-ESTRUTURAL DA INFECÇÃO PELO BACULOVÍRUS MUTANTE MutApo

3.2.1. Microscopia de luz

Observações diretas por microscopia de luz foram feitas com o intuito de se caracterizar, em nível estrutural, a evolução da infecção pelo mutante indutor de apoptose, MutApo. Para isso, cultura de células Tn-5B e Sf-21 infectadas foram observadas a vários tempos p.i., com ênfase nos tempos de 24 e 48h p.i., quando estágios marcantes e generalizados de morte apoptótica foram observados.

Células sadias das duas linhagens celulares hospedeiras (Tn-5B e Sf-21) foram usadas como parâmetro para a análise da infecção por MutApo e já foram descritas nos itens 1.1.1 e 1.1.2 (Figs. 12A e 13A).

A 12h p.i., culturas células Sf-21 mostravam sinais evidentes de infecção com algumas células apresentando *blebbing* na membrana plasmática, indicando o início da morte celular por apoptose. Já as células Tn-5B, mostraram maior resistência à apoptose, apresentando, a esse tempo, sinais de infecção, mas não *blebbing* de membrana (dados não mostrados).

A 24h p.i., células Tn-5B continuavam a mostrar alguma resistência à apoptose, mas já apareciam alguns focos de células apoptóticas com alguns corpos apoptóticos soltos. Diferentemente, a maioria das células Sf-21 já estavam em processo apoptótico e muitos corpos apoptóticos se destacavam destas células, permanecendo soltos no meio de cultura (Figs. 19A e 19B).

A 48h p.i., tanto culturas células Tn-5B quanto Sf-21 apresentavam apoptose massiva, com quase todas as células em fase avançada de morte celular e um grande número de corpos apoptóticos soltos por todo o meio de cultura (Figs. 19C e 19D, respectivas). Muitas células já haviam sofrido morte celular e algumas apresentavam sinais de necrose, com extravasamento de conteúdo citoplasmático. Não foi possível observar poliedros em nenhum dos dois sistemas analisados.

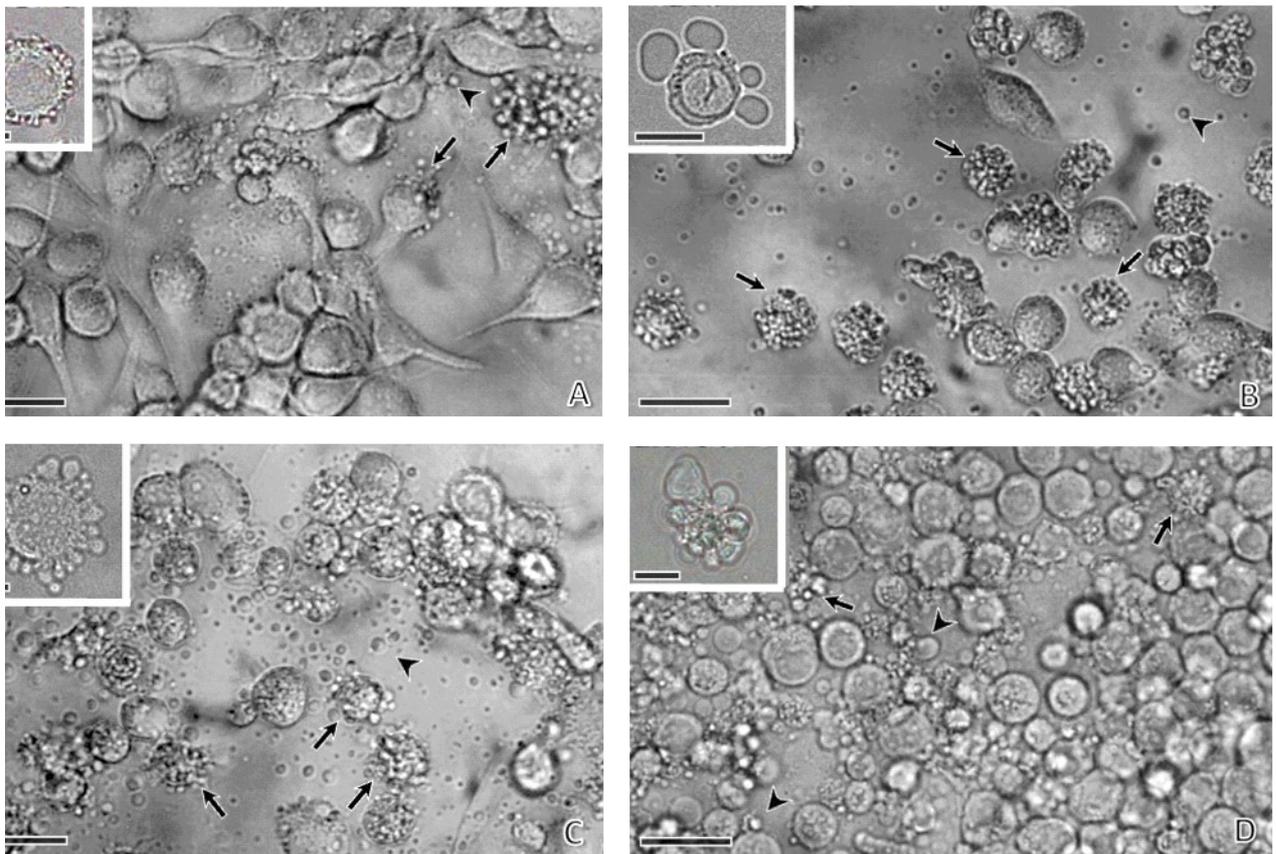


Figura 19. Micrografias de cultura de células Tn-5B infectadas pelo vírus mutante MutApo, a 24h p.i. e 48h p.i. (**A** e **C**, respectivamente) e de células Sf-21 infectadas com o mesmo vírus, a 24h p.i. e 48h p.i. (**B** e **D**, respectivamente). Setas indicam células em morte celular por apoptose. Cabeças de setas indicam corpos apoptóticos soltos no meio de cultura. Os *insets* mostram mais detalhes das células infectadas. Barras equivalem a 30 μm ou 10 μm (*insets*).

3.2.2. Microscopia Eletrônica de transmissão

Para uma melhor caracterização do padrão apoptótico das células Tn-5B e Sf-21 infectadas pelo vírus MutApo foram observados detalhes ultra-estruturais dessas células infectadas aos tempos de 24 e 48h p.i. Esses tempos foram escolhidos devido às observações feitas ao microscópio de luz, em que se observou morte apoptótica nas duas linhagens celulares em cultura. Como parâmetros para controle foram usadas células não infectadas de ambas as linhagens celulares, que foram anteriormente caracterizadas (itens 1.2.1 e 1.2.2) (Figs. 14A e 16A).

Os dois tipos celulares, quando infectados com o mutante MutApo, seguiram as etapas apoptóticas e características ultra-estruturais básicas, já descritas na literatura para esse tipo de morte celular, tais como formação de *blebbing* de membrana e fragmentação celular em corpos apoptóticos.

Nas duas linhagens celulares infectadas por MutApo, a 24h p.i. foram observadas células em várias etapas de apoptose. Algumas começavam a apresentar *blebbing* sutil de membrana, outras *blebbing* mais proeminente. Outras já liberavam corpos apoptóticos com conteúdos citoplasmáticos, como organelas. E outras, ainda, pareciam estar em estágio final de apoptose, com o conteúdo nuclear e citoplasmático misturado e liberando corpos apoptóticos já com conteúdo nuclear.

Em etapas menos avançadas de apoptose, em geral, as células apresentavam porções de heterocromatina maiores ou menores marginalizadas na periferia do núcleo hipertrofiado e o envelope nuclear sofria dobramentos com a evolução da infecção. Corpos apoptóticos apareciam com muitas mitocôndrias e outros, somente citosol. As mitocôndrias contidas nesses corpos, assim como as remanescentes nas células, pareciam estar alteradas em tamanho e morfologia, apresentando membranas dilatadas. Algumas regiões do citoplasma mostravam pequenos aglomerados de vesículas, as quais também apareciam nos corpos apoptóticos, evidenciando, assim, dilatação de endomembranas. (Fig. 20A).

Em estágios mais avançados, núcleo e citoplasma pareciam misturados. Toda a célula tinha um aspecto de um grande corpo apoptótico, mas muitos corpos ainda estavam se destacando e levando esse conteúdo misturado. Os corpos apoptóticos continuavam a conter mitocôndrias e outros pareciam levar pedaços de

heterocromatina. Os aglomerados de vesículas se tornaram mais evidentes, mostrando ainda mais dilatação de endomembranas (Fig. 20B).

A 48h p.i., a maioria das células estava em estágio final de apoptose e muitas já apresentavam necrose secundária, com perda de integridade de membrana e extravasamento de conteúdo celular. Estas células apresentavam eletrodensidade diferente das células apoptóticas, apresentando um aspecto translúcido em algumas regiões (Fig. 20C).

Outras células pareciam estar em autofagia ou fagocitando corpos apoptóticos de células adjacentes, pois apresentavam grandes vacúolos fagocíticos com conteúdos de diferentes eletrodensidades (Figs. 20C e 20D).

Em algumas células das duas linhagens foi possível ver formação de alguns nucleocapsídeos (dados não mostrados), mas não era possível observar formação de poliedros já que a grande maioria das células, a 24h p.i., já estavam em apoptose e, a 48h p.i., já estavam em necrose secundária.

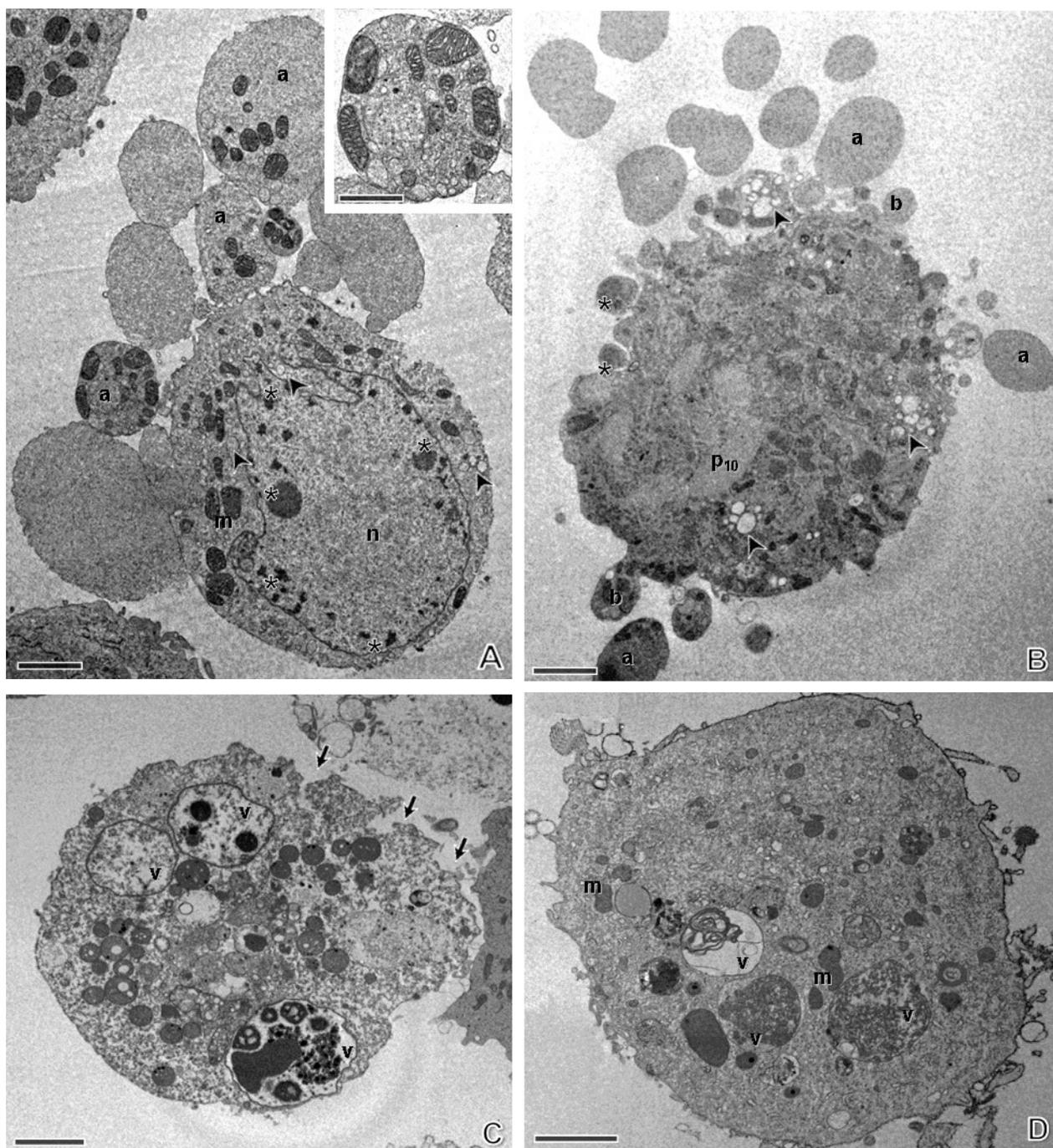


Figura 20. Micrografias eletrônicas de células Tn-5B infectadas pelo vírus mutante MutApo, a 24h p.i. e 48h p.i. (**A** e **C**, respectivamente) e de células Sf-21 infectadas com o mesmo vírus, a 24h p.i. e 48h p.i. (**B** e **D**, respectivamente). **n**, núcleo; **m**, mitocôndria; **a**, corpos apoptóticos; **b**, *blebbing*; **p₁₀**, P10 e **v**, vacúolo. Setas indicam membrana desintegrada em (**C**). Asteriscos e cabeças de setas indicam, respectivamente, cromatina e vesículas. Barras equivalem a 2 μ m, em (**A-D**) e 1 μ m, no *inset*.

3.2.3. Microscopia eletrônica de varredura

Observações ao microscópio eletrônico de varredura foram feitas no sentido de se visualizar as modificações ultra-estruturais sofridas na superfície celular induzidas pelo vírus MutApo, a 24h p.i., em células Tn-5B e Sf-21.

Células Tn-5B e Sf-21 não infectadas foram usadas como controle. As Tn-5B apresentaram formato fusiforme e grande quantidade de projeções citoplasmáticas ao longo de toda a sua superfície (Fig. 21A) e, as Sf-21, formato arredondado com numerosas projeções citoplasmáticas (Fig. 22A).

A 24h p.i. foram vistas células em vários estágios apoptóticos, desde estágios iniciais (Figs. 21B e 22B), até avançados (Figs. 21C e 21D, e, 22C e 22D). Porém, mesmo as células em estágios iniciais de apoptose apresentavam grande diferença das células controle, diferenças advindas da própria infecção, como arredondamento celular e redução em número e tamanho de projeções citoplasmáticas. A esse tempo, foi possível ainda observar, nas duas linhagens, células com poucos corpos apoptóticos em sua superfície, assim como, células já quase totalmente fragmentadas em corpos apoptóticos.

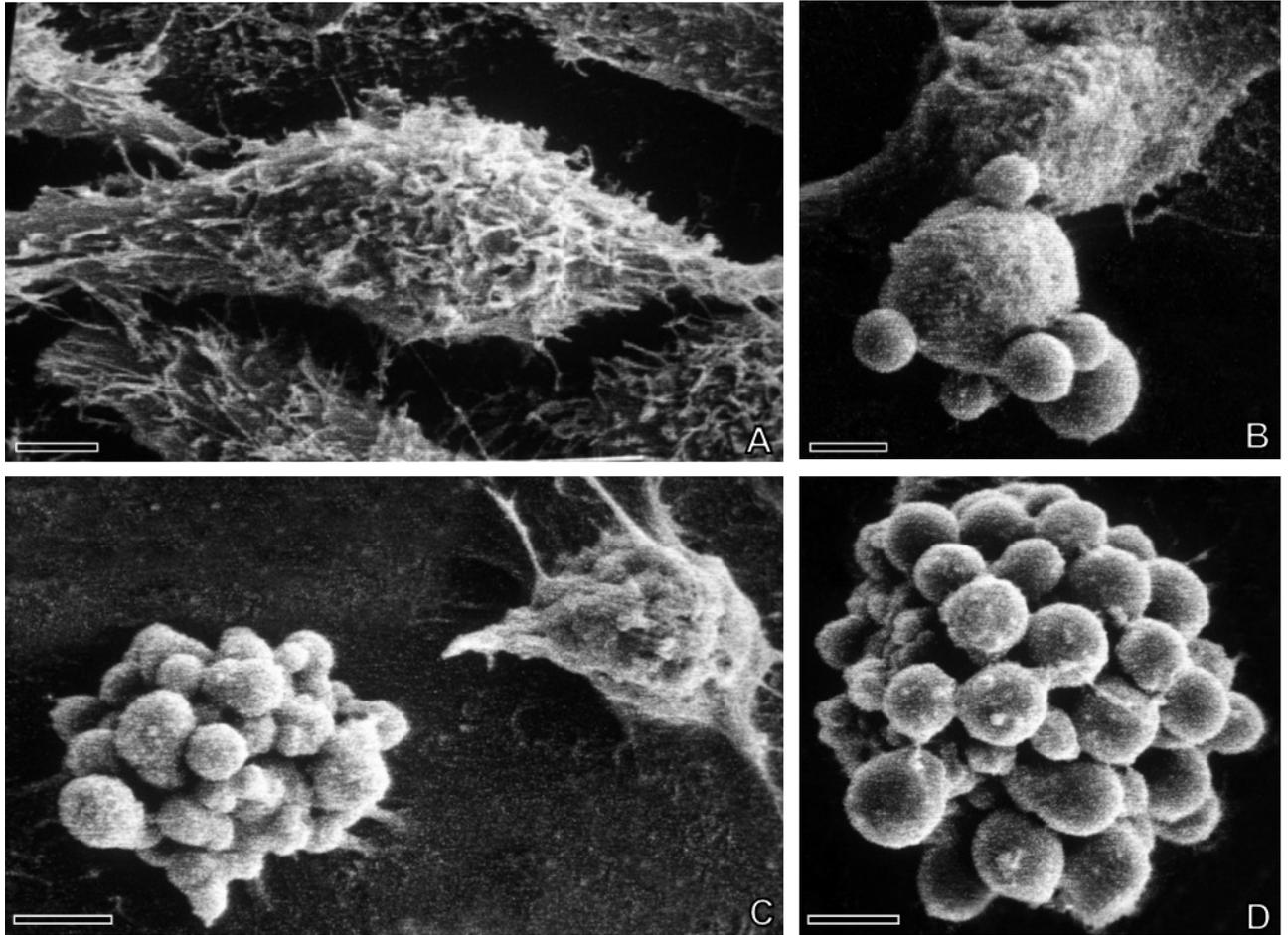


Figura 21. Micrografias eletrônicas de varredura de células Tn-5B não infectadas (A) ou infectadas com o vírus mutante MutApo, a 24h p.i. (B-D). Barras equivalem a 3 μm , em (A, B e D) e 5 μm , em (C).

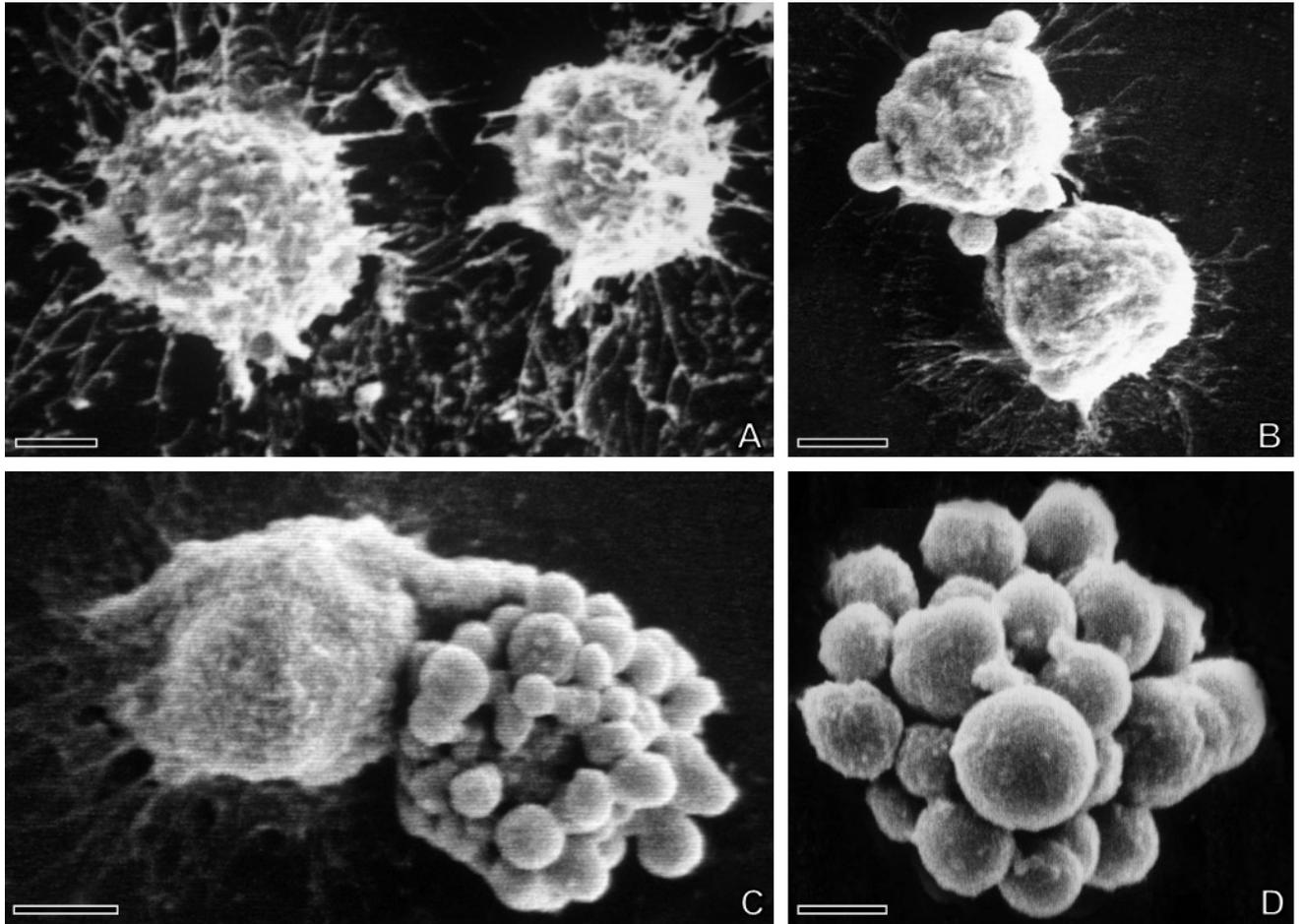


Figura 22. Micrografias eletrônicas de varredura de células Sf-21 não infectadas (A) ou infectadas com o vírus mutante MutApo, a 24h p.i. (B-D). Barras equivalem a 3 μm , em (A); 5 μm (B e D) e 2 μm , em (C).

4. DISCUSSÃO

4.1. ANÁLISE DA INFECÇÃO PELO BACULOVÍRUS MUTANTE MutPolh EM CÉLULAS DE INSETO

Durante o isolamento de um vírus recombinante (vSynlitx1) contendo o gene da toxina LiTx1 da aranha *Loxosceles intermedia*, foi detectado um vírus mutante, que induzia um fenótipo alterado na infecção em células Tn-5B e Sf-21. Essas células, quando infectadas por esse vírus, além de não apresentarem poliedros, mostravam acúmulo de massas protéicas por todo o citoplasma.

A análise do gene *polh* desse mutante revelou uma mutação de um único nucleotídeo na ORF do gene, levando a crer que esse fenótipo era devido à má formação dessa proteína. Um outro vírus recombinante (PolhRev) foi então produzido contendo o gene mutado (*mutpolh*). Esse vírus induziu o mesmo fenótipo durante a infecção, provando que essa única mutação no gene *polh* era responsável pela não-formação de poliedros (GENERINO; ACÁCIO; RIBEIRO, 2004).

As análises citopatológicas feitas neste trabalho mostraram que essas massas protéicas são, na verdade, acúmulos de poliedrina não cristalizada. Isso foi confirmado com o experimento de imunocitoquímica em que houve uma forte e específica marcação desses agregados protéicos com anticorpos específicos contra a poliedrina.

Como esperado, a análise bioquímica por SDS-PAGE mostrou que a poliedrina mutada apresenta massa molecular similar a da poliedrina selvagem, evidenciando a discreta diferença entre essas duas proteínas.

Nessas análises, todos os outros efeitos citopáticos de uma infecção comum por baculovírus foram observados, tais como produção de nucleocapsídeos e presença de agregados fibrilares da proteína P10, indicando que a produção de poliedrina mutada não interfere significativamente no progresso da infecção por esse mutante, exceto na fase final do ciclo de infecção, quando não há formação de poliedros.

O gene *polh* é um dos mais conservados entre os baculovírus. Em AcMNPV, esse gene contém uma “*open reading frame*” (ORF) de 738 nucleotídeos (JEHLE,

2006) e qualquer mutação nessa seqüência de nucleotídeos pode comprometer significativamente a formação de poliedros (KATSUMA *et al.*, 1999; SMITH; FRASER; SUMMERS, 1983).

A importância da estrutura primária da poliedrina para a correta montagem de poliedros é confirmada nesse trabalho, que mostra que uma mutação pontual no gene *polh* leva à não-produção de poliedros pelo vírus mutante MutPolh. Esse fato já tinha sido demonstrado em outros trabalhos, em que esse tipo de mutação, quando não inviabilizava totalmente a formação de poliedros, levava a produção de poliedros morfológicamente anormais, se comparados aos tipos selvagens (CARSTENS *et al.*, 1992; CARSTENS; KREBS; GALLERNEAULT, 1986; CARSTENS; LIN-BAI; FAULKNER, 1987; LIN; ZHONG; WANG, 2000). Outros relatos mostram também falhas na localização nuclear da poliedrina. Nesses casos, a poliedrina é sintetizada, mas permanece acumulada no citoplasma da célula (KATSUMA *et al.*, 2000).

Alguns domínios foram mapeados como essenciais à localização nuclear (aas 30 a 57) e à montagem supramolecular (aas 19 a 110) da poliedrina do AcMNPV (JARVIS; BOHLMAYER; GARCIA, 1991). Isso foi parcialmente confirmado pela existência de um vírus mutante, o M29 (CARSTENS; LIN-BAI; FAULKNER, 1987), com uma mutação única na posição 84 (Leu para Pro), que apresenta grandes quantidades de pequenas partículas de poliedrina não-cristalizada dispersas no núcleo de células infectadas. Contudo, a mutação pontual encontrada no vírus analisado neste trabalho (aa 118 – Val para Phe) não é localizada em nenhum desses domínios.

O mutante M934 (CARSTENS *et al.*, 1992), com uma mutação no aminoácido 183 (Leu para Phe), produz massas amorfas de poliedrina no núcleo de células infectadas, com ausência de vírus oclusos. E os mutantes #126 e # 136 (KATSUMA *et al.*, 1999), com mutações pontuais nos aminoácidos 178 (Cys para Tyr) e 141 (Leu para Phe), respectivamente, têm fenótipos similares ao caracterizado neste trabalho. Estes não produzem poliedros e apresentam partículas e agregados presumidos como poliedrina dispostos no núcleo e citoplasma de células infectadas. Nenhum desses mutantes apresentam mutações nos domínios de localização nuclear e montagem supramolecular. Isso demonstra que, na verdade, não existe um padrão definido de domínio requerido para a correta montagem de poliedros e sim várias regiões altamente conservadas, que quando modificadas, mesmo em um único aminoácido, comprometem parcialmente ou totalmente o processo de oclusão viral.

Mutação	Fenótipo	Vírus parental
aa55 - G por D ⁽¹⁾	Poliedro único; grande e cúbico; no núcleo; ausência de vírus oclusos	AcMNPV
M5: aa58 - L por P ⁽²⁾	Poliedro único; grande e cúbico; no núcleo; geralmente, ausência de vírus oclusos	AcMNPV
#220: aa58 D por N; aa22 I por T ⁽³⁾	Poucos poliedros; grandes e cúbicos; no núcleo; presença de vírus oclusos	BmNPV
M29: aa84 L por P ⁽⁴⁾	Nenhum poliedro; muitas partículas de poliedrina não-cristalizada; no núcleo	AcMNPV
#136: aa141 L por F ⁽³⁾	Nenhum poliedro; agregados e partículas de poliedrina; no núcleo e citoplasma	BmNPV
#211: aa144 E por L ⁽³⁾	Muitos poliedros; tamanhos variados; presença de vírus oclusos	BmNPV
#128: aa171 L por P ⁽³⁾	Poliedros normais; no núcleo; nenhum ou poucos vírus oclusos	BmNPV
#126: aa178 C por Y ⁽³⁾	Nenhum poliedro; agregados e partículas de poliedrina; no núcleo e citoplasma	BmNPV
M934: aa183 L por F ⁽⁵⁾	Nenhum poliedro; agregados de poliedrina; no núcleo; ausência de vírus oclusos	AcMNPV
MutPolh: aa 118 V por F ⁽⁶⁾	Raros poliedros; agregados e partículas de poliedrina; no núcleo e citoplasma; ausência de vírus oclusos	AcMNPV

Quadro 4. Esquema comparativo mostrando outros fenótipos de vírus mutantes expressando poliedros morfologicamente anormais devido a mutações únicas na cadeia polipeptídica da poliedrina. A mutação e o vírus parental de cada mutante são também apresentados.

(1) LIN; ZHONG; WANG, 2000. (2) CARSTENS; KREBS; GALLERNEAULT, 1986. (3) KATSUMA *et al.*, 1999. (4) CARSTENS; LIN-BAI; FAULKNER, 1987. (5) CARSTENS *et al.*, 1992. (6) Este trabalho.

A estrutura tridimensional da poliedrina, com a exposição de determinados domínios e mesmo de aminoácidos específicos é fator limitante para que essa proteína interaja com fatores de localização nuclear e possa, dessa forma, ser translocada para dentro do núcleo (KATSUMA *et al.*, 2000).

Tanto o aminoácido Valina quanto Fenilalanina possuem propriedades físico-químicas de polaridade e hidrofobicidade similares, sendo ambos apolares e, portanto, hidrofóbicos, o que sugere que não houve drásticas alterações dessas propriedades na proteína.

Levando em conta a estrutura terciária da poliedrina, após o dobramento final, o aminoácido 118, por ser hidrofóbico, certamente está localizado na face interna dessa proteína e, portanto, não deve interagir diretamente com outras cadeias polipeptídicas ou com fatores de localização nuclear, podendo haver interações de segmentos distantes de estrutura primária, por ligações não covalentes.

Além disso, o padrão imunocitoquímico da poliedrina mutante mostrou que essa mutação possivelmente não alterou significativamente as propriedades de imunogenicidade e antigenicidade dessa proteína, deixando expostos epítomos que foram reconhecidos por anticorpos contra a poliedrina.

Assim, é provável que a substituição no aminoácido 118 implique apenas em mudanças sutis na estrutura tridimensional da poliedrina. Contudo, essas pequenas alterações devem explicar o porquê somente uma pequena quantidade de poliedrina é eficientemente translocada para o núcleo.

A taxa de localização nuclear da poliedrina está diretamente ligada à taxa de produção de poliedros, já que estes se formam no núcleo (FUNK; ROHRMANN, 1997; JARVIS; BOHLMAYER; GARCIA, 1992). Já no núcleo, além da interação da poliedrina consigo mesma, outras proteínas devem interagir para que os blocos triméricos dessa proteína sejam devidamente montados (COULIBALY *et al.*, 2007).

Como para qualquer outra estrutura de origem protéica, a correta montagem supramolecular de poliedros depende de interações específicas entre suas cadeias polipeptídicas e, ainda, de finas interações entre os aminoácidos que constituem essas cadeias. Ainda que diferentes nucleopoliedrovírus apresentem poliedros distintos, a formação de qualquer tipo de poliedro é dependente dessas interações (CARSTENS *et al.*, 1992; CHENG; CARNER; FESCEMYER, 1998; HU *et al.*, 1999).

Deve-se considerar, também, interações da poliedrina com proteínas virais e da célula hospedeira (WOO *et al.*, 1998) e, ainda, com proteínas específicas do envelope do ODV, para a devida inclusão dos *virions* (SLACK ; ARIF, 2007).

Uma variedade de proteínas virais já mostrou estar envolvida na formação de poliedros, por exemplo, a *few polyhedra* 25K ou FP25K. Essa proteína aumenta a biossíntese e localização nuclear da poliedrina no início da fase de oclusão, o que parece ser necessário para assegurar a produção normal de oclusões virais durante a infecção (SLACK; ARIF, 2007). Além disso, interage com proteínas do envelope do ODV. Quando mutada, a FP25K provoca um fenótipo com um reduzido número de poliedros por célula e oclusões contendo nenhum *virion* ou *virions* com morfologia alterada (WOOD; HUGHES; SHELTON, 1994).

Uma outra proteína, a P10, parece estar ligada à formação de poliedros. Esta proteína é também altamente expressa na fase tardia da infecção, formando estruturas fibrilares que interagem com o envelope do poliedro. Foi demonstrado que poliedros de vírus com o gene *p10* deletado são mais frágeis, evidenciando a associação da proteína P10 à qualidade e estabilidade dos poliedros (FUNK; ROHRMANN, 1997).

Curiosamente, neste trabalho, a infecção pelo vírus recombinante VsynLITX1 em células Tn-5B e Sf-21 originou poliedros menores e mais numerosos. Possivelmente, o gene *litx1* interagiu com a poliedrina ou alguma outra proteína à ela relacionada, dando mais uma demonstração da importância da interação da poliedrina com outras proteínas virais.

4.2. ANÁLISE DA INFECÇÃO PELO BACULOVÍRUS MUTANTE MutApo EM CÉLULAS DE INSETO

Ainda durante o isolamento do vírus recombinante vSynlitx1, foi detectado um outro vírus mutante (MutApo), o qual induzia uma massiva morte celular durante a infecção em cultura de células Tn-5B e Sf-21. A análise do DNA desse vírus pela digestão com a enzima *Bam*HI revelou o aparecimento de um fragmento extra de 5.000 pb, o qual continha o gene *p35* interrompido por uma seqüência desconhecida de DNA. Esse fragmento foi parcialmente seqüenciado e não mostrou similaridade com nenhuma outra seqüência nos bancos de dados (dados não mostrados).

As análises citopatológicas feitas neste trabalho descrevem o processo de infecção e indução de apoptose pelo vírus MutApo em células Tn-5B e Sf-21. Essas análises mostraram que as células infectadas com esse vírus mutante entravam rapidamente em apoptose, apresentando a maioria dos eventos típicos descritos para esse tipo de morte celular (FINK; COOKSON, 2005).

É difícil, se não impossível, um vírus infectar uma célula sem ativar uma via de morte celular programada. (HARDWICK, 2001). A marginação de heterocromatina e um *blebbing* de membrana transiente são observados logo nos momentos iniciais de infecção por baculovírus e são relacionados, provavelmente, à rápida indução de apoptose por fatores virais precoces, os quais a célula imediatamente reconhece, engatilhando a cascata apoptótica (CLEM, 2001). Esses eventos iniciais, portanto, por si só, não devem ser considerados determinantes para a caracterização do MutApo como um mutante apoptótico. Porém, o *blebbing* de membrana observado nas primeiras 12h p.i. (Sf-21) e 24h p.i. (Tn-5B), na maioria das células infectadas por esse vírus, evoluiu para a formação de corpos apoptóticos, evidenciando, assim, o processo apoptótico nessas células.

A formação de corpos apoptóticos possibilita uma morte celular “limpa”, em que a membrana plasmática é preservada intacta e não há o extravasamento de conteúdos citoplasmáticos inflamatórios. Esses corpos apoptóticos apresentam proteínas de superfície que são reconhecidas por fagócitos (FINK; COOKSON, 2005). Isso explica porque foi possível observar células não-apoptóticas com grandes vacúolos fagocíticos parecendo conter corpos apoptóticos em seu interior.

Tais células, por algum motivo, podem não ter sido infectadas, passando a reconhecer e englobar corpos apoptóticos vizinhos.

Na ausência de fagócitos, os corpos apoptóticos podem proceder à necrose secundária (FINK; COOKSON, 2005). Em fases mais adiantadas da infecção (48 h p.i.) pelo MutApo foi possível observar muitos corpos apoptóticos perdendo a integridade da membrana e liberando conteúdos citoplasmáticos, caracterizando necrose e indicando que a maioria das células já estavam mortas.

Outras células não-apoptóticas pareciam estar em autofagia, pois apresentavam grandes vacúolos autofágicos com conteúdos de diferentes eletrodensidades. A Autofagia é um tipo de morte celular programada regulada por processos de degradação e reciclagem de constituintes celulares, participando na renovação de organelas e no manejo bioenergético da célula. Essa morte celular é considerada citoprotetiva sob condições de limitações nutricionais e está interrelacionada com a morte celular por apoptose, uma vez que, a inibição de macroautofagia engatilha a apoptose (BOYA *et al.*, 2005).

A discreta ocorrência de dilatação de endomembranas foi outra característica básica de apoptose presente nos dois modelos celulares estudados. Porém em nossos estudos, a fragmentação de algumas células, que chegaram a fases mais tardias de infecção, pode ter sido também influenciada pela presença da proteína P10, que é conhecida por interagir com o citoesqueleto de células infectadas, ajudando a promover a lise celular (FUNK; ROHRMANN, 1997; SILVEIRA; RIBEIRO; BÁO, 1999).

O intumescimento osmótico mitocondrial observado nas células apoptóticas pode ter sido decorrente da ação de proteínas da via apoptótica relacionadas à permeabilidade das membranas mitocondriais, que formam um megacanal denominado poro de transição de permeabilidade mitocondrial, resultando em um alto fluxo de citocromo C para o citosol (MARZO; BRENNER; KROEMER, 1998). Este mecanismo desencadeia a ativação de pró-caspases e representa uma das vias de indução de apoptose por baculovírus, podendo iniciar e/ou amplificar o sinal apoptótico (LIU *et al.*, 2007).

Outra característica associada a apoptose encontrada nas células infectadas pelo MutApo foi a presença de porções de heterocromatina alinhadas na face interna da membrana nuclear. Isso se deve, provavelmente, à clivagem de DNA genômico

entre os nucleossomos pela ação de nucleases ativadas por caspases efetoras, (FINK; COOKSON, 2005).

Linhagens celulares distintas apresentam diferentes resistências a apoptose induzida por mutantes. As células da linhagem Tn-368, por exemplo, não entram em apoptose quando infectadas por um mutante *p35*⁻ (CLEM; MILLER, 1994; HERSHBERGER; DICKSON; FRIESEN, 1992), enquanto células da linhagem Tn-5B1-4, a qual foi utilizada em nossos estudos, entram em apoptose nas primeiras 24h p.i.

Mutações relacionadas ao gene *iap* também induzem apoptose de maneira diferenciada, a depender da linhagem celular. O mutante vApAg, derivado de AgMNPV, por exemplo, induz apoptose em células da linhagem UFL-AG-286, porém células da linhagem Tn-5B não entram em apoptose quando infectadas com esse mutante (SILVEIRA; RIBEIRO; BÃO, 1999).

Linhagens celulares distintas, mesmo que respondendo à indução de apoptose por um mesmo mutante, podem apresentar diferentes padrões de resposta apoptótica. Foi observado em nossos estudos que as células Sf-21 são um pouco mais vulneráveis à infecção pelo MutApo do que as Tn-5B, apresentando uma pequena diferença temporal de efeitos apoptóticos. Isso tem implicações nas relações patógeno-hospedeiro, bem como, na coevolução das vias apoptóticas de diferentes hospedeiros e das estratégias específicas utilizadas por diversos baculovírus para bloquear a apoptose (CLEM, 1997).

O gene *p35* apresenta um padrão temporal de inibição de apoptose distinto do *iap*, visto que, células infectadas com UFL-AG infectadas com um mutante *p35*⁻ (vP35del), morreram mais rapidamente, antes da produção de progênie viral, enquanto que as mesmas células infectadas com o mutante vApAg morreram mais devagar, produzindo progênie viral, indicando um bloqueio parcial ou retardo na apoptose. Esse bloqueio provavelmente foi obtido pela expressão precoce de proteínas anti-apoptóticas ativas. Mais tarde, porém, essa expressão pode não ter sido suficiente para conter a resposta apoptótica celular (SILVEIRA; RIBEIRO; BÃO, 1999).

Em alguns casos, apesar da presença do *p35* intacto, o vírus selvagem AcMNPV pode não bloquear a apoptose em determinadas linhagens celulares (CHEJANOVSKY; GERSHBURG, 1995; PALLI *et al.*, 1996), o que demonstra que,

na verdade, ser indutor de apoptose é diferente de possuir ou não genes anti-apoptóticos

A intensa apoptose ocorrida em algumas linhagens celulares quando infectadas por mutantes *p35*⁻ mostra o quanto esse gene é importante para o sucesso replicativo dos baculovírus, pois a célula, estando livre desse inibidor de apoptose, impede parcialmente ou totalmente a produção de progênie viral (CLEM, 2001). Neste trabalho, foi observada alguma produção de progênie viral, porém, esses vírus, não chegavam a concluir seu ciclo infeccioso, com a produção de poliedros, pois a maioria das células não sobrevivia à fase tardia da infecção.

Uma outra explicação para a não observação de poliedros é a possibilidade do MutApo não ser um recombinante e, dessa forma, não conter o gene *polh*. Por outro lado, a presença de muitas células em necrose a partir de 48 h p.i. poderia também ser explicada pela possibilidade de esse mutante ser um recombinante, expressando o gene da toxina de aranha *litx1*, que é extremamente danosa para alguns insetos (CASTRO *et al.*, 2004) e que pode também ter alguma atividade tóxica em cultura de células de inseto. Porém células infectadas com o vírus controle, o VsynLitx1, não mostraram sinais precoces de necrose, o que indica que não há uma atividade tóxica direta provocada pelo gene *litx1* nessas células, restando à hipótese de uma resposta à interação da expressão desse gene mais a não-expressão do *p35*.

Um exemplo de interação deste tipo ocorreu em células Tn-368, que, normalmente, não entram em apoptose quando infectadas por um mutante *p35*⁻. Porém, a combinação de uma deleção no *p35* e uma mutação no gene *FP25K* foi responsável por engatilhar apoptose nessa linhagem celular (KELLY *et al.*, 2006).

O vírus MutApo, portanto não foi capaz de contornar a resposta celular apoptótica à infecção em nenhuma das duas linhagens celulares analisadas (Sf-21 e Tn-5b), o que, demonstra a importância do gene *p35* para o progresso da infecção nestas duas linhagens.

5. CONCLUSÃO

A identificação e caracterização de baculovírus mutantes têm se mostrado uma ferramenta muito interessante para o estudo de vários genes e proteínas virais importantes envolvidos em diversos processos biológicos relacionados à infecção. Neste trabalho, por exemplo, através da análise de dois vírus mutantes foi possível observar detalhes de dois eventos básicos ocorridos durante uma infecção, a indução de apoptose e a síntese de uma proteína viral.

A análise citopatológica do vírus MutApo permitiu a observação de uma intensa resposta apoptótica à infecção em duas linhagens celulares, Sf-21 e Tn-5B. Dessa forma, o MutApo foi caracterizado como um vírus indutor de apoptose, provavelmente, por conter uma inserção no gene inibidor de apoptose, *p35*, confirmando, portanto, a importância desse gene para o sucesso de uma infecção por baculovírus. Além disso, o fato de que todos os baculovírus estudados até o momento possuem genes anti-apoptóticos permite inferir que a apoptose tenha exercido uma pressão significativa para a evolução destes vírus.

Já nas análises morfológicas feitas para o MutPolh, a reduzida localização nuclear de poliedrina, a deficiência na montagem supramolecular dessa proteína e a rara associação desta a nucleocapsídeos denotam que a mutação, caracterizada nesse trabalho, no aa 118 (Val para Phe) foi determinante para a não-formação de poliedros. Essas observações confirmaram que a poliedrina é uma proteína altamente conservada entre os baculovírus e que sutis mudanças em sua seqüência polipeptídica podem ocasionar a não-formação de poliedros.

Quanto as perspectivas para novos estudos envolvendo esses dois mutantes, seria interessante realizar ensaios biológicos de infectividade com o MutApo, e, investigar, mais detalhadamente, a estrutura tridimensional da poliedrina do MutPolh. Esses estudos podem esclarecer mais questões sobre indução viral a apoptose e resposta apoptótica celular, bem como, formação de poliedrina e conseqüente montagem de poliedros; facetas extremamente importantes no sucesso evolutivo dos baculovírus.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. et al. 2002. The Cell Cycle and Programmed Cell Death. In: ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 4. ed. New York: Garland Science, 2002. cap. 17.

ANDULEIT, K., et al. Crystal lattice as biological phenotype for insect Viruse. **Protein Science**, [Woodbury, US], v. 14, p. 2741-2743, 2005.

ASHE, P. C.; BERRY, M. D. Apoptotic signaling cascades. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [Oxford, UK], v. 27. p. 199-214, 2003.

[BACULOVIRUS]. [200-?]. 1 gravura. Disponível em: <<http://www.mygene.net/Research/images/baculo.jpg>>. Acesso em: 08 nov. 2007.

BILIMORIA, S. L. et al. Abortive cell culture infections of nuclear polyhedrosis viruses as model systems for host specificity. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, p.123-141, 1992.

BILIMORIA, S. L. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. In: KURSTAK. E. **Viruses of invertebrates**. New York: Marcelk Dekker, 1991. p. 1-72.

BLISSARD, G. W. et al. Baculoviridae. In: REGENMORTEL, M. H. V. et al. **Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses**. San Diego: Academic Press, 2000. p. 195-202.

BLISSARD, G. W.; WENZ, J. R. Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. **Journal of Virology**, [Washington, US], v. 66, p. 6829-6835, 1992.

BOYA, P. et al. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, [Washington, US], v. 25, p. 1025-1040, 2005.

BUMP, N. J. et al. Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. **Science**, [Washington, US], v. 269, p. 1885-1888, 1995.

CALLUS, B A.; VAUX, D. L. Caspase inhibitors: viral, cellular and chemical. **Cell Death and Differentiation**, [London, UK], v. 14, p. 73-78, 2007.

CAO, G. L. et al. Cloning and nucleotide sequence analysis of the p35 gene of *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus. **Acta Entomologica Sinica**, [Beijing, China], v. 45, p. 711-716, 2002.

CARPENTER, W. M.; BILIMORIA, S. L. A semipermissive nuclear polyhedrosis virus infection: characterization of infection kinetics and morphogenesis. **Virology**, [New York, US], v. 130, p. 222-227, 1983.

CARPES, M. P. et al. The inhibitor of apoptosis gene (iap-3) of *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) encodes a functional IAP. **Archives of Virology**, [New York, US], v. 150, p. 1549-1562, 2005.

CARSTENS E. B. et al. Analysis of polyhedra morphology mutants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus; molecular and ultrastructural features. **Journal of General Virology**, [London, UK], v. 73, p. 1471-1479, 1992.

CARSTENS E. B.; KREBS A.; GALLERNEAULT C. E. Identification of an amino acid essential to the normal assembly of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedra. **Journal of Virology**, [Washington, US], v. 58, p. 684-688, 1986.

CARSTENS E. B.; LIN-BAI Y.; FAULKNER P. A. Point mutation in the polyhedrin gene of a baculovirus, *Autographa californica* MNPV, prevents crystallization of occlusion bodies. **Virology**, [New York, US], v. 68, p. 901-905, 1987.

CASTRO, C. S. et al. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. **Toxicon**, [Oxford, UK], v. 44, p. 273-280, 2004.

CHEN, X. et al. Genomic organization of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. **Archives of Virology**, [New York, US], v. 145, p. 2539-2555, 2000.

CHENG, X.; CARNER, G. R.; FESCEMYER, H. W. Polyhedrin sequence determines the tetrahedral shape of occlusion bodies in *Thysanoplusia orichalcea* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. **Journal of General Virology**, [London, UK], v. 79, p. 2549-2556, 1998.

CHEJANOVSKY, H.; GERSHBURG, E. The WILD-TYPE *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus induces apoptosis of *Spodoptera littoralis* cells. **Virology**, [New York, US], v. 209, p. 519-525, 1995.

CLARKE, T.E.; CLEM, R.J. Insect defenses against virus infection: the role of apoptosis. **International Reviews of Immunology**, [Philadelphia, US], v. 22, p. 401-424, 2003.

CLEM, R. J. Baculoviruses and Apoptosis: a diversity of genes and responses. **Current Drug Targets**, [Hilversum, Holland], v. 8, p. 1069-1074, 2007.

CLEM, R. J. Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad, and the ugly. **Cell Death and Differentiation**, [London, UK], v. 8, p. 137-143, 2001.

CLEM, R. J. Regulation of programmed cell death by baculoviruses. In: MILLER, L. K. **The baculoviruses**. New York: Plenum Press, 1997. p. 237-266.

CLEM, R. J. The role of apoptosis in defense against baculovirus infection in insects. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, [Berlin, Deutschland], v. 289, p. 113-129, 2005.

CLEM, R. J.; MILLER, L. K. Apoptosis reduces both the in vitro replication and the in vivo infectivity of a baculovirus. **Journal of Virology**, [Washington, US], v. 67, p. 3730-3738, 1993.

CLEM, R. J.; MILLER, L. K. Control of programmed cell death by the baculovirus genes p35 and iap. **Molecular and Cellular Biology**, [Washington, US], v. 14, p. 5212-5222, 1994.

CLEM, R. J.; FECHHEIMER, M.; MILLER, L. K. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. **Science**, [Washington, US], v. 254, p. 1388-1390, 1991.

CLEM, R. J.; HARDWICK, J. M.; MILLER, L. K. Anti-apoptotic genes of baculoviruses. **Cell Death and Differentiation**, [London, UK], v. 3, p. 916, 1996.

CLEM, R. J.; ROBSON, M.; MILLER, L. K. Influence of infection route on the infectivity of baculovirus mutants lacking the apoptosis-inhibiting gene p35 and the adjacent gene p94. **Journal of Virology**, [Washington, US], v. 68, p. 6759-6762, 1994.

CORY, J. S.; MYERS, J. H. The ecology and evolution of baculoviruses. **Annual Review of Ecology and Systematics**, [Palo Alto, US], v. 34, p. 239-272, 2003.

COULIBALY, F. et al. The molecular organization of cypovirus polyhedra. **Nature**, [London, UK], v. 446, p. 97-101, 2007.

CROOK, N. E.; CLEM, R. J.; MILLER, L. K. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. **Journal of Virology**, [Washington, US], v. 67, p. 2168-2174, 1993.

DAI, X. Prevention of baculovirus-induced apoptosis of BTI-Tn-5B1-4 (Hi5) cells by the p35 gene of *Trichoplusia ni* multicapsid nucleopolyhedrovirus. **Journal of General Virology**, [London, UK], v. 80, p. 1841-1845, 1999.

DEVERAUX, Q. L.; REED, J. C. IAP family proteins suppressors of apoptosis. **Genes and Development**, [Cold Spring Harbor, US], v. 13, p. 239-252, 1999.

DU, Q. et al. Isolation of an apoptosis suppressor gene of the *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. **Journal of Virology**, [Washington, US], v. 73, p. 1278-1285, 1999.

FEDERICI, B. A. Baculovirus pathogenesis. In: MILLER, L. K. **The baculoviruses**. New York: Plenum Press, 1997. p. 33-59.

FINK, S. I.; COOKSON, B. T. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. **Infection and Immunity**, [Bethesda, US], v. 73, p. 1907-1916, 2005.

FISHER, A. J. et al. Crystal structure of baculovirus P35: role of a novel reactive site loop in apoptotic caspase inhibition. **The EMBO Journal**, [Oxford, UK], v. 18, p. 2031-2039, 1999.

FRIESEN P. D. Regulation of Baculovirus Early Gene Expression. In: MILLER, L. K. **The baculoviruses**. New York: Plenum Press, 1997. p. 141-170.

FRIESEN, P. D.; MILLER, L. K. Divergent transcription of early 35 and 94-kilodalton protein genes encoded by the Hind-III K genome fragment of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Virology**, [Washington, US], v. 61, p. 2264-2272, 1987.

FUNK, C. J.; ROHRMANN, G. F. Baculovirus structure. In: MILLER, L. K. **The baculoviruses**. New York: Plenum Press, 1997. p. 7-27.

GENERINO, A. P. M.; ACÁCIO, C. N.; RIBEIRO, B. M. Characterization of a single mutation which inhibits normal polyhedra formation in insect cells infected with a mutant *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV). In: Encontro Nacional de Virologia, 15., 2004, Águas de São Pedro, São Paulo. **Virus Reviews and Research**, Rio de Janeiro, v. 9, p. 92-93, 2004.

GRANADOS, R. R. et al. A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn 5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, [New York, US], v. 64, p. 260-266, 1994.

GREEN, D. R.; MONSER, K. P.; CLEM, R. J. Ubiquitin protein ligase activity of the anti-apoptotic baculovirus protein Op-IAP3. **Virus Research**, [Amsterdam, Holland], v. 105, p. 89-96, 2004.

HAAS-STAPLETON, E. J.; WASHBURN, J. O.; VOLKMAN, L. E. P74 Mediates Specific Binding of *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus Occlusion-Derived Virus to Primary Cellular Targets in the Midgut Epithelia of *Heliothis virescens* Larvae. **Journal of Virology**, [Washington, US], v. 78, p. 6786-6791, 2004.

HAO, Y. et al. Apollon ubiquitinates SMAC and caspase-9, and has an essential cytoprotection function. **Nature Cell Biology**, [London, UK], v. 6, p. 849-860, 2004.

HARDWICK, J. Apoptosis in viral pathogenesis. **Cell Death and Differentiation**, [London, UK], v. 8, p. 109-110, 2001.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, [London, UK], v. 407, p. 770-776, 2000.

HERNIOU, E. A. et al. Ancient coevolution of baculoviruses and their Insect hosts. **Journal of Virology**, [Washington, US], v.78, p. 3244-3251, 2004.

HERSHBERGER, P.A.; DICKSON, J. A.; FRIESEN, P. D. Site-specific mutagenesis of the 35-kilodalton protein gene encoded by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: cell line-specific effects on virus replication. **Journal of Virology**, [Washington, US], v. 66, p. 5525-5533, 1992.

HORTON, H. M.; BURAND, J. P. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. **Journal of Virology**, [Washington, US], v. 67, p. 1860-1868, 1993.

HU, Z. H. et al. Specificity of polyhedrin in the generation of baculovirus occlusion bodies. **Journal of General Virology**, [London, UK], v. 80, p. 1045-1053, 1999.

JARVIS, D. L. Baculovirus expression vectors. In: MILLER, L. K. **The baculoviruses**. New York: Plenum Press, 1997. p. 389-419.

JARVIS, D. L.; BOHLMAYER, D. A.; GARCIA, A. J. Requirements for nuclear localization and supramolecular assembly of a baculovirus polyhedrin protein. **Virology**, [New York, US], v. 185, p. 759-810, 1991.

JARVIS, D. L.; BOHLMAYER, D. A.; GARCIA, A. Enhancement of Polyhedrin Nuclear Localization during Baculovirus Infection. **Journal of Virology**, [Washington, US], v. 66, p. 6903-6911, 1992.

JEHLE, J. A. The Mosaic Structure of the Polyhedrin Gene of the *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus (AcMNPV). **Virus Genes**, [Boston, US], v. 29, p. 5-8, 2006.

KALMAKOFF, J.; WARD, V. K. **Baculoviruses**. 2007. 1 gravura. Disponível em: <<http://www.microbiologybytes.com/virology/kalmakoff/baculo/pics/BV&ODV.gif>>. Acesso em: 08 nov. 2007.

KAMITA, S. G.; MAJIMA, K.; MAEDA, S. Identification and characterization of the p35 gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus that prevents virus-induced apoptosis. **Journal of Virology**, [Washington, US], v. 67, p. 455-463, 1993.

KATSUMA, S. et al. Identification of Novel Residues Involved in Nuclear Localization of a Baculovirus Polyhedrin Protein. **Virus Genes**, [Boston, US], v. 21, p. 233-240, 2000.

KATSUMA, S. et al. Molecular characterization of baculovirus *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus polyhedron mutants. **Archives of Virology**, [New York, US], v. 144, p. 1275-1285, 1999.

KELLY, B. J. et al. Dual mutations in the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus FP-25 and p35 genes result in plasma-membrane blebbing in *Trichoplusia ni* cells. **Journal of General Virology**, [London, UK], v. 87, p. 531-536, 2006.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. L.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, [London, UK], v. 26, p. 239-257, 1972.

KITAGAWA, Y. et al. Ligand-directed gene targeting to mammalian cells by pseudotype baculoviruses. **Journal of Virology**, [Washington, US], v. 79, p. 3639-3652, 2005.

LACOUNT, D. J.; FRIESEN, P. D. Role of early and late replication events in induction of apoptosis by baculoviruses. **Journal of Virology**, [Washington, US], v. 71, p. 1530-1537, 1997.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, [London, UK], v. 227, p. 680-685, 1970.

LANFORD, R. E. et al. Expression and characterization of hepatitis B surface antigen polypeptides in insect cells with a baculovirus expression system. **Journal of Virology**, [Washington, US], v. 63, p. 1549-1557, 1989.

LI, Q.; LISTON, P.; MOYER, R. W. Functional analysis of the inhibitor of apoptosis (iap) gene carried by the entomopoxvirus of *Amsacta moorei*. **Journal of Virology**, [Washington, US], v. 79, p. 2335-2345, 2005.

LIN, G. Y.; ZHONG, J.; WANG, X. Z. Abnormal formation of polyhedra resulting from a single mutation in the polyhedrin gene of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. **Journal of Invertebrate Pathology**, [New York, US], v. 76, p. 13-19, 2000.

LIU, L. et al. Influence of cytochrome C on apoptosis induced by *Anagrapha (Syngrapha) falcifera* multiple nuclear polyhedrosis virus (AfMNPV) in insect *Spodoptera litura* cells. **Cell Biology International**, [London, UK], v. 31, p. 996-1001, 2007.

LU, A.; MILLER, L. K. Regulation of baculovirus late and very late gene expression. In: MILLER, L. K. **The baculoviruses**. New York: Plenum Press, 1997. p. 193-211.

MARTIGNONI, M. E.; IWAI, P. J. A catalogue of viral diseases of insects, mites and ticks. In: BURGESS, H. D. **Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980**. London: Academic Press, 1981. p. 897-911.

MARZO, I.; BRENNER, C.; KROEMER, G. The central role of the mitochondrial megachannel in apoptosis evidence obtained with intact cells, isolated mitochondria and purified protein complexes. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [Paris, France], v. 52, p. 248-251, 1998

MEANS, J. C.; PENABAZ, T.; CLEM, R. J. Identification and functional characterization of AMVp33, a novel homolog of the baculovirus caspase inhibitor p35 found in *Amsacta moorei* entomopoxvirus. **Virology**, [New York, US], v. 358, p. 436-447, 2007.

MILLER, L. K. An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. **Trends in Cell Biology**, [Cambridge, UK], v. 9, p. 323-328, 1999.

MILLER, L. K. Introduction to the baculoviruses. In: MILLER, L. K. **The baculoviruses**. New York: Plenum Press, 1997. p. 1-6.

MORRIS, T. D.; MILLER, L. K. Promoter influence on baculovirus-mediated gene expression in permissive and non-permissive insect cell lines. **Journal of Virology**, [Washington, US], v. 66, p. 7397-7405, 1992.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for the control of Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, [Palo Alto, US], v. 44, p. 257-289, 1999.

O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculoviruses expression vectors: a laboratory manual**. New York: Oxford University Press, 1994. 347p.

- OLIVEIRA, J. V. C. et al. Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. **Journal of General Virology**, [London, UK], v. 87, p. 3233-3250, 2006.
- PALLI, S. R. et al. CfMNPV blocks AcMNPV-induced apoptosis in a continuous midgut cell line. **Virology**, [New York, US], v. 222, p. 201-213, 1996.
- PANG, Y. et al. Sequence analysis of the *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. **Virology**, [New York, US], v. 287, p. 391-404, 2001.
- PRIKHOD'KO, E. A.; MILLER, L. K. Induction of apoptosis by baculovirus transactivator IE-1. **Journal of Virology**, [Washington, US], v. 70, p. 7116-7124, 1996.
- PRIKHOD'KO, E. A.; MILLER, L. K. The baculovirus PE38 protein augments apoptosis induced by transactivator IE-1. **Journal of Virology**, [Washington, US], v. 73, p. 6691-6699, 1999.
- RIBEIRO, B. M.; SOUZA, M. L.; KITAJIMA, E. W. Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1998. p. 481-507.
- SESHAGIRI, S.; MILLER, L. K. Baculovirus inhibitors of apoptosis (IAPs) block activation of Sf-caspase-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [Washington, US], v. 94, p. 13606-13611, 1997.
- SIEBURTH, P. J.; MARUNIAK, J. E. Growth characteristics of a continuous cell line from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). **In vitro cellular and developmental biology**, [Gaithersburg, US], v. 24, p. 195-198, 1988.
- SILVEIRA, E. B. et al. 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**, [Amsterdam, Holland], v. 130, p. 182-192, 2007.
- SILVEIRA, E. B. et al. In vivo apoptosis induction and reduction of infectivity by an *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus p35 recombinant in hemocytes from the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Research in Microbiology**, [Paris, France], v. 156, p. 1014-1025, 2005.
- SILVEIRA, E. B.; RIBEIRO, B. M.; BÁO, S. N. Morphological studies of apoptosis in insect cells infected with vApAg, an *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus mutant. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, [Bologna, Italia], v. 31, p. 543-554, 1999.
- SLACK, J. M.; ARIF, B. M. The baculovirus occlusion-derived virus: virion structure and function. **Advances in Virus Research**, [New York, US], v. 69, p. 99-165, 2007.
- SMITH, G. E.; FRASER, M. J.; SUMMERS, M. D. Molecular engineering of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome: deletion mutations within the polyhedrin gene. **Journal of Virology**, [Washington, US], v. 46, p. 584-593, 1983.

- SUMMERS, M. D. Electron microscopic observations on granulosis virus entry, uncoating and replication process during infection of the midgut cells of *Trichoplusia ni*. **Journal of Ultrastructure Research**, [New York, US], v. 35, p. 606-625, 1971.
- UREN, A. G.; COULSON, E. J.; VAUX, D. L. Conservation of baculovirus inhibitor of apoptosis repeat proteins (BIRPs) in viruses, nematodes, vertebrates and yeasts. **Trends in Biochemical Sciences**, [Cambridge, UK], v. 23, p. 159-162, 1998.
- VAUGHN, J. L.; DOGHERTY, E. M. The replication of baculoviruses. In: MARAMOROSCH, K.; CHERMAN, K. E. **Viral insecticides for biological control**. Orlando: Academic Press, 1985. p. 569-633.
- VAUGHN, J. L. et al. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **In Vitro**, [Rockville, MD, US], v. 13, p. 213-217, 1977.
- VOLKMAN, L. E.; SUMMERS, M. D.; HSIEH, C. H. Occluded and nonoccluded nuclear polyhedrosis virus grown in *Trichoplusia ni*: comparative neutralization, comparative infectivity, and in vitro growth studies. **Journal of Virology**, [Washington, US], v. 19, p. 820-832, 1976.
- WANG, X.; OOI, B. G.; MILLER, L. K. Baculovirus vectors for multiple gene expression and for occluded virus production. **Gene**, [Amsterdam, Holland], v. 100, p. 131-137, 1991.
- WILLIAMS, G. V. et al. A cytopathological investigation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p10 gene function using insertion-deletion mutants. **Journal of General Virology**, [London, UK], v. 70, p. 187-202, 1989.
- WILLIAMS, G. V.; FAULKNER, P. Cytological changes and viral morphogenesis during baculovirus infection. In: MILLER, L. K. **The baculoviruses**. New York: Plenum Press, 1997. p. 61-108.
- WOO, S. D. et al. The morphology of the polyhedra of a host range-expanded recombinant baculovirus and its parents. **Archives of Virology**, [New York, US], v. 143, p. 1209-1214, 1998.
- WOOD, H. A.; HUGHES, P. R.; SHELTON, A. Field studies of the co-occlusion strategy with a genetically altered isolate of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Environmental entomology**, [Lanham, US], v. 23, p. 211-219, 1994.
- XUE, D.; HORVITZ, H. R. Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell-death Protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. **Nature**, [London, UK], v. 377, p. 248-251, 1995.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)