

Eni Braga da Silveira

ESTUDOS MORFOLÓGICOS DO PROCESSO INFECCIOSO E OCORRÊNCIA
DE APOPTOSE EM CULTURA DE CÉLULAS DE INSETO INFECTADAS POR
BACULOVÍRUS MUTANTES

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Eni Braga da Silveira
e aprovada pela Comissão Julgadora.
24/09/99 Sônia Nair Bão

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de
Mestre em Biologia Celular e
Estrutural na área de Biologia Celular

Orientadora: Profa. Dra. Sônia Nair Bão

1999

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	
TOMBO BC/	39447
PROC.	229/99
C	☐
D	☒
PREÇO	78\$ 11,00
DATA	17/11/99
N.º CPD	

CM-00136896-4

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Silveira, Eni Braga

S39e Estudos morfológicos do processo infeccioso e ocorrência de apoptose em cultura de células de inseto infectadas por baculovírus mutantes/Eni Braga da Silveira. -- Campinas, SP. [s.n.], 1999.
112f. illus.

Orientadora: Sônia Nair Bão

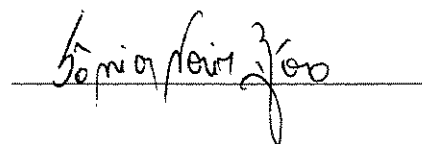
1. Apoptose. 2. Células de inseto. 3. Morfologia. I. Bão, Sônia Nair. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 27/09/1999

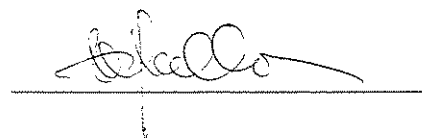
Banca Examinadora

Titulares:

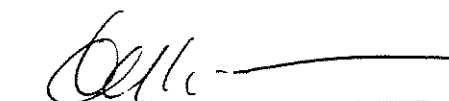
Profa. Dra. SÔNIA NAIR BÃO (Orientadora)



Profa. Dra. MARIA LUIZA SILVEIRA MELLO



Prof. Dr. ELLIOT WATANABE KITAJIMA



Suplente:

Prof. Dr. HERNANDES FAUSTINO DE CARVALHO



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB), sob orientação da Prof^a Dr^a Sônia Nair Bão e colaboração do Prof. Dr. Bergmann Moraes Ribeiro, contando com o apoio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF);
- Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX);
- Universidade de Brasília (UnB);
- Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Ao meu pai Nelson (*in memoriam*), grande incentivador e admirador da minha carreira, que sempre compartilhou comigo do deslumbramento diante dos fenômenos naturais...

... e à minha mãe Edna, minha primeira professora,
que me fez crescer sabendo que o conhecimento é
caminho para a liberdade, sendo assim o bem mais
precioso que uma mulher pode adquirir.

AGRADECIMENTOS SINCEROS

-À querida professora Sônia, por ter sido sempre muito mais do que uma orientadora, pelas grandes oportunidades que tem me oferecido desde os tempos da Iniciação Científica e pelo maravilhoso exemplo de generosidade e amor a profissão. Obrigada pela confiança!!

-Ao admirável professor Bergmann, grande colaborador para a minha formação desde a graduação, pela atenção valiosa e co-orientação imprescindível neste trabalho;

-Ao veterano professor Kitajima, por ser o grande responsável pelo meu “caso amoroso” com a Microscopia Eletrônica;

-À professora Shirley, coordenadora do curso de pós-graduação em Biologia Celular-UNICAMP, pela sua atenção, carinho e dedicação a nós alunos e ao nosso curso;

-A todos os professores do curso de pós-graduação em Biologia Celular-UNICAMP pela preciosa colaboração para a minha formação;

-Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica-UnB por ter disposto de suas instalações e equipamentos para a realização deste trabalho;

-À Universidade de Brasília, por ter me proporcionado ótima formação acadêmica e moradia durante a graduação, minha primeira oportunidade de emprego depois de formada e por ter sido (e continuar sendo) o cenário de anos maravilhosos da minha vida;

-Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da EMBRAPA/CENARGEN por ter disposto de seu microscópio Zeiss Ômega 912 e apoio técnico para realização de parte deste trabalho;

-À CAPES pela concessão de bolsa;

-À Dra. Lois Miller pelo fornecimento de vírus e células utilizados neste trabalho;

-À Lilian e Sidney, sempre prestativos, por cuidar de nossa burocracia com imensa competência e gentileza;

-À minha querida mãe Edna e meu irmão Ivan pelo apoio e tolerância com relação à minha ausência (em vários sentidos) em virtude da minha opção de vida;

-Ao meu irmão Almir pelo apoio imprescindível para o meu acesso ao ensino superior;

-Ao meu querido Carlos, pelo imenso amor, generosidade, carinho e cumplicidade, sem os quais a vida não seria assim tão boa;

-À querida Diana, pela amizade sincera e maravilhoso convívio em nosso pequeno lar;

-Aos queridos amigos do Laboratório de Morfologia e Morfogênese-UnB (Carla, Umberto, Djalma, Ricardo, Iara, Fafi, Fernanda, Márcio e Mônica) pela torcida, apoio e incentivo constantes, principalmente durante a minha preparação para o exame de mestrado e por terem estado sempre de portas abertas, mesmo após o final do meu contrato.

-Aos amigos do Laboratório de Microscopia Eletrônica-UnB pelo agradável convívio durante todos estes anos;

-Aos amigos Lino e Mônica pela ajuda valiosa que sempre me proporcionaram nas minhas idas e vindas e durante a minha permanência em Campinas;

-A todos os colegas da pós-graduação em Biologia Celular-UNICAMP pela receptividade e agradável convívio;

-À amiga Raquel pelo apoio, hospitalidade, companheirismo e “riquíssimas discussões” durante a realização dos créditos;

-Aos meus amigos Engenheiros Químicos (Ruth, Vanessa, Adriana, Mauro, Renato, Patrícia, Alessandro, Mara, Cristiane, Mirian, Noely, Fábio “Diou” e “Pirão”) por terem me aceito em seu “clã” e tornado minha estada em Campinas bastante divertida. Agradeço especialmente às queridas Ruth, Vanessa e Adriana por terem aberto as portas de suas casas, oferecido sua amizade e abrigo sem me conhecer. O mundo seria certamente muito melhor se todos tivessem um “coração de estudante” como o de vocês!!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Os Baculovírus.....	01
1.2. O Baculovírus <i>Anticarsia gemmatalis</i> nucleopolyhedrovirus.....	11
1.3. Apoptose.....	13
1.4. Relações Entre Apoptose e Infecções Virais.....	26
1.5. Regulação da Apoptose por Baculovírus.....	30
1.6. Contexto e Objetivos.....	37
2. ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO.....	39
2.1. “Morphological Studies of Apoptosis in Insect Cells Infected with vApAg, an <i>Anticarsia gemmatalis</i> nucleopolyhedrovirus Mutant”.....	39
3. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

LISTA DE FIGURAS

1. Os dois fenótipos dos MNPVs.....	03
2. Ciclo de infecção dos MNPVs.....	06
3. Sequência de modificações ultraestruturais na apoptose e necrose.....	17
4. Ativação sequencial de caspases.....	20
5.Regulação da atividade de um membro pró-apoptótico de Bcl ₂ por modificação pós-traducional e papel da mitocôndria na apoptose.....	25
6. P35 e IAPs.....	36

RESUMO

Nestes últimos anos, evidências levaram à percepção de uma estreita associação e coevolução entre a resposta apoptótica de células hospedeiras, que pode prevenir disseminação viral, e estratégias virais de bloqueio ou evasão à apoptose, capazes de garantir a replicação, o que tem feito do estudo dos vírus importante área para a compreensão de aspectos relacionados à regulação da apoptose. Neste sentido, o estudo dos baculovírus tem trazido importantes contribuições. Durante a construção e isolamento de um vírus *Anticarsia gemmatilis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) recombinante obtivemos um mutante (vApAg) que induz morte prematura em uma linhagem celular derivada de *Anticarsia gemmatilis* (UFL-AG-286), permissiva a AgMNPV, e que replica normalmente em outra linhagem celular, derivada de *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B-4) (Tn-5B). Estudos em microscopia de luz e eletrônica foram feitos para descrever comparativamente o processo infeccioso e a indução de apoptose por vApAg em células UFL-AG-286 e Tn-5B e pelo vírus vP35del, derivado de *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV), em células UFL-AG-286. Foi demonstrado que células UFL-AG-286 morrem por apoptose quando infectadas por vApAg e vP35del, apresentando dilatação de endomembranas, *blebbing* de superfície e formação de corpos apoptóticos. No entanto, somente vP35del foi capaz de induzir condensação cromatínica. Apesar da indução de apoptose massiva em células UFL-AG-286 pelo vírus vApAg, este vírus foi capaz de produzir progênie uma vez que a apoptose foi retardada neste sistema. Para células UFL-AG-286 infectadas com vP35del isto não ocorreu porque a apoptose é mais rápida. Este fato resultou em várias diferenças ultraestruturais na forma com que a apoptose ocorre nestes dois sistemas, incluindo as diferenças relativas à condensação cromatínica. Foi também demonstrado que

vApAg completa um ciclo normal de infecção em células Tn-5B, com ausência de apoptose. Estas observações morfológicas foram confirmadas pela ocorrência da degradação oligonucleossomal do DNA em células UFL-AG-286 infectadas com vP35del em tempos iniciais de infecção e, com vApAg, em tempos mais tardios. Estes resultados sugerem que a mutação de vApAg ocorreu de tal forma que este vírus ainda possui a capacidade de bloquear a apoptose no início da infecção. Entretanto, isto não ocorre no caso de vP35del, onde uma deleção no gene *p35* faz com que o mesmo não seja capaz de codificar uma proteína funcional, a qual mostra-se essencial para o bloqueio da apoptose e replicação deste vírus em células UFL-AG-286.

ABSTRACT

In the last few years, evidences about the close association and coevolution of host cell apoptotic responses, that can prevent virus spread, and viral strategies to block or evade apoptosis for replication have been obtained, rendering the study of viruses very important to the understanding of some aspects of the regulation of apoptotic pathways. Baculovirus studies, in particular, have provided valious information in this field. During the construction and isolation of an *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) recombinant virus, a mutant (vApAg) that induces premature cell death in a cell line derived from *Anticarsia gemmatalis* (UFL-AG-286), permissive to AgMNPV, but replicates normally in another cell line derived from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) (Tn-5B) was identified. Light and electron microscopy studies were carried out to describe, comparatively, the infection process and apoptosis induction by vApAg in UFL-AG-286 and Tn-5B cells and by the virus vP35del, derived from *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV), in UFL-AG-286 cells. We have shown that UFL-AG-286 cells die by apoptosis when infected with vApAg and vP35del, presenting endomembranes dilation, surface blebbing and apoptotic bodies formation, however, only vP35del was able to induce chromatin condensation. In spite of the massive apoptosis induced by vApAg in UFL-AG-286 cells, this virus produced some progeny because, in this case, apoptosis is delayed. For UFL-AG-286 cells infected with vP35del this does not occur because apoptosis is faster. Such a difference is accompanied by some ultrastructural differences in the apoptotic process of these two systems, especially chromatin condensation. In Tn-5B cells vApAg completes a normal cycle of infection, without apoptosis. These morphological observations were confirmed by the occurrence of oligonucleossomal DNA fragmentation in

UFL-AG-286 cells infected with vP35del, early on infection, and with vApAg, late on infection. These results suggest that the mutation in vApAg occurred in a way that blocking of apoptosis can be achieved early on infection. However, such not occur in the case of vP35del infection, where the antiapoptotic gene *p35* has a deletion that completely prevents P35 protein activity, essential for blocking of apoptosis and replication of this virus in UFL-AG-286 cells.

1. INTRODUÇÃO

1.1. OS BACULOVÍRUS

1.1.1. ASPECTOS GERAIS

Baculovírus constituem uma família de vírus de DNA dupla - fita, *supercoiled*, contendo entre 90 e 200 pkb (pares de kilobases), com nucleocapsídeo na forma de bastão, envelopado por uma membrana e envolto por uma oclusão cristalina de origem protéica, formando “corpos de oclusão” (OBs, do inglês, *occlusion bodies*) (Arif, 1986). Estes vírus infectam artrópodes em ecossistemas marinhos e terrestres, sendo os insetos da ordem lepidóptera em sua fase larval seus principais hospedeiros (Miller, 1997).

A maioria das espécies de baculovírus tem um espectro de hospedeiros restrito e esta especificidade confere a estes vírus grande potencial como agentes de controle biológico de pragas, havendo na atualidade disponibilidade de diversas formulações comerciais destes vírus para utilização nas lavouras (revisado por Black *et al.*, 1997).

Os baculovírus também têm sido utilizados como vetores de expressão de genes heterólogos, importantes para a pesquisa básica e com grande potencial para a indústria farmacêutica. Baculovírus recombinantes podem ser construídos com a inserção de um ou mais genes de interesse no lugar de um gene não-essencial para replicação, sob comando de um promotor viral forte. A expressão dos genes de interesse ocorre mediante infecção de uma linhagem de células de inseto permissiva ao vírus recombinante. Esta metodologia garante a produção de grandes quantidades de proteína funcional com processamento adequado, por ser um sistema de expressão eucariótico (revisado por Jarvis, 1997).

1.1.2 CLASSIFICAÇÃO E FENÓTIPOS VIRAIS

Atualmente a família *Baculoviridae* é taxonomicamente subdividida em dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus* e *Granulovirus* (Murphy *et al.*, 1995). Os baculovírus do gênero *Nucleopolyhedrovirus* são também denominados de *nuclear polyhedrosis viruses* (vírus da poliedrose nuclear) (NPV) e os do gênero *Granulovirus*, *granulosis viruses* (vírus da granulose) (GV). Nos gêneros NPV e GV os corpos de oclusão (denominado poliedro e grânulo, respectivamente) possuem tamanho aproximado entre 0,15 e 15 μm e 0,15 e 0,5 μm , respectivamente, sendo composto principalmente de subunidades de uma proteína simples, de peso molecular em torno de 26000 a 29000 Da, denominada poliedrina nos NPVs e granulina nos GVs. Os NPVs podem ser ainda separados em MNPVs (*multiple* NPVs), onde vários nucleocapsídeos são envoltos por uma membrana comum, ou SNPVs (*single* NPVs), quando há somente uma partícula viral por envelope (revisado por Ribeiro *et al.*, 1998).

Entre os NPVs, o baculovírus melhor conhecido é *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV), espécie-tipo deste gênero, cujo genoma encontra-se totalmente sequenciado (Ayres, *et al.*, 1994), sendo o modelo principal utilizado em estudos de NPVs.

A replicação dos NPVs é caracterizada pela produção de dois fenótipos virais. Inicialmente, por volta de 12 a 24 horas pós infecção (h p. i.), são produzidos vírus extracelulares (BVs, do inglês, *budded viruses*), responsáveis pela disseminação da infecção célula a célula e, mais tarde, por volta de 48-72 h p. i., são produzidos os vírus ocluídos (OVs, do inglês, *occluded viruses*, ou OBs, ou poliedros), responsáveis pela transmissão horizontal entre insetos. Estas diferentes formas virais são geneticamente idênticas (Smith & Summers, 1978), possuindo porém diferenças de antigenicidade (Volkman *et al.*, 1976;

1984), infectividade (uma vez que BVs são mais infecciosos para células em cultura e quando injetados diretamente na hemolinfa de insetos, enquanto os vírus derivados de corpos de oclusão, ODVs, são mais infecciosos no intestino) (Volkman *et al.*, 1976; Keddie & Volkman, 1985; Blissard & Rohrmann, 1990) e morfologia (Fig. 1).

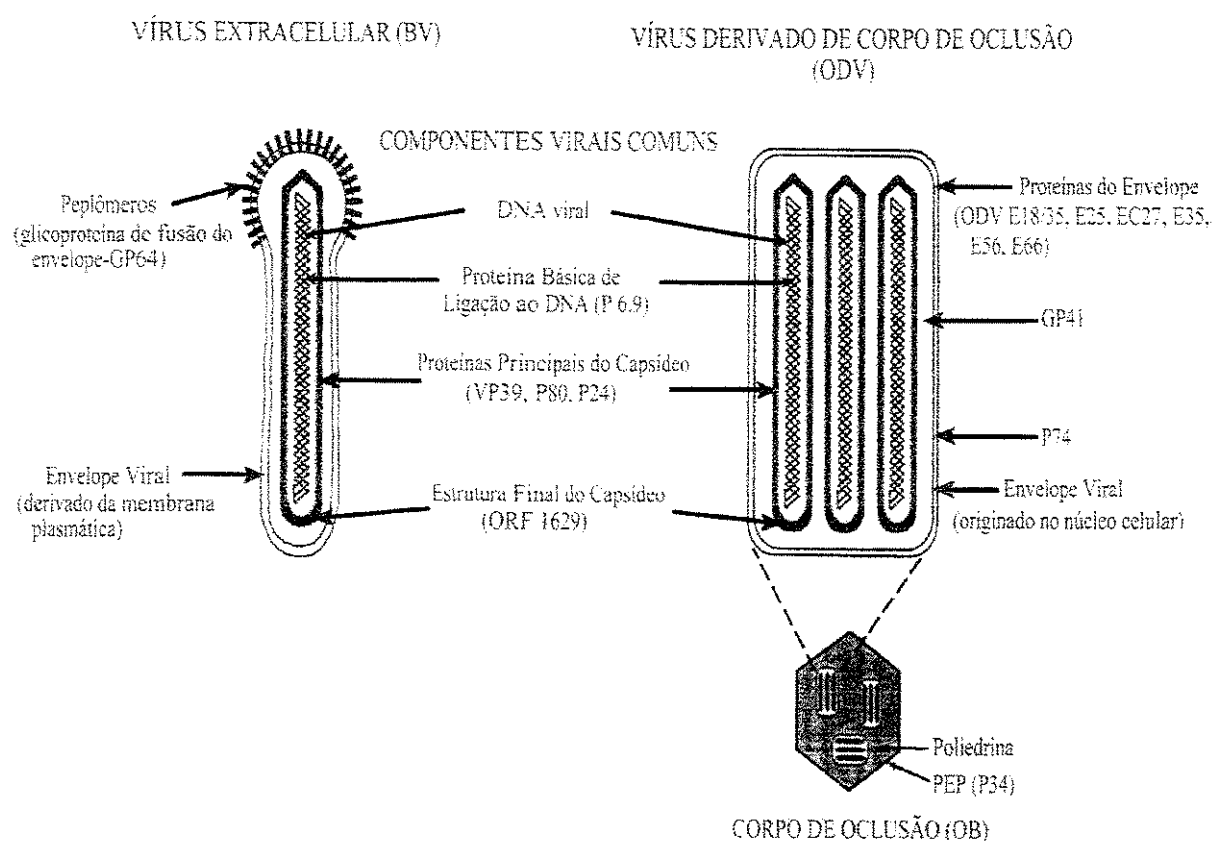


FIGURA 1. Os dois fenótipos de MNPVs. BVs e ODVs apresentam elementos em comum, como o DNA, proteína básica de ligação ao DNA, proteínas principais do capsídeo e estrutura final do capsídeo. Elementos específicos de BVs são a glicoproteína de fusão de envelope e o envelope propriamente dito, que é derivado da membrana plasmática. Elementos específicos de ODVs são as proteínas do envelope, a glicoproteína gp41, presente entre o capsídeo e o envelope, a proteína p74 e o envelope, originado no núcleo celular. (Adaptado de Funk *et al.*, 1997).

1.1.3 PROCESSO DE INFECÇÃO *IN VIVO*

A principal via de infecção dos baculovírus ocorre pela ingestão dos OBs, que encontram-se disseminados na natureza e cujos vírions presentes em seu interior são capazes de permanecer viáveis por vários anos (Funk *et al.*, 1997). Os OBs são dissolvidos no interior do intestino médio da lagarta devido ao pH alcalino e ação de proteases, liberando os ODVs (Granados & Lawler, 1981; Horton & Burand, 1993) (Fig. 2), cuja rota de infecção no organismo do hospedeiro ainda não se encontra totalmente esclarecida.

Um modelo recente, proposto por Barrett e colaboradores (1998b) reúne evidências obtidas em seu trabalho e hipóteses anteriormente postuladas na tentativa de explicar o fenômeno (Granados & Lawler, 1981; Keddie *et al.*, 1989; Flipsen *et al.*, 1993; 1995; Engelhard *et al.*, 1994; Kirkpatrick *et al.*, 1994; Barrett *et al.*, 1998a). Os ODVs liberados no lúmen do intestino aderem às microvilosidades do epitélio intestinal e entram nas células colunares pela fusão do envelope viral com a membrana plasmática (Fig. 2). Nestas células uma parte destes vírus se replicaria e outra parte passaria diretamente pelo sistema reticular da membrana plasmática (Locke & Huie, 1983), ganhando acesso à hemolinfa e infectando os hemócitos. As células cilíndricas do epitélio intestinal infectadas seriam normalmente repostas por novas células, reconstituindo um epitélio saudável. De forma alternativa, os ODVs poderiam infectar células de ramificações finais do sistema traqueal e hemócitos que estejam em contato direto com estas, ou chegaria até estes através de prováveis interrupções da membrana basal. A replicação viral nos hemócitos e traqueócitos resultaria na produção de BVs, os quais se espalhariam pelo organismo realizando a infecção célula a célula e atingindo outros tecidos, como a epiderme e corpo gorduroso, promovendo finalmente a produção massiva de OBs e a liquefação do inseto.

Alguns aspectos particulares relacionados ao caminho dos ODVs até as células hospedeiras e no interior destas merecem ser mencionados: No lúmen do intestino médio os ODVs encontram como barreira inicial a membrana peritrófica, uma estrutura em multicamadas na forma de rede que se estende sobre a borda apical do epitélio de revestimento deste órgão, cujos poros não permitem a passagem das partículas virais, as quais possuem cerca de 35 nm de diâmetro por 300 nm de comprimento (revisado por Volkman, 1997). Acredita-se que alguns fatores liberados juntamente com os nucleocapsídeos durante a dissolução dos corpos de oclusão causem danos à integridade e elasticidade desta membrana para facilitar o acesso às células intestinais (Derksen & Granados, 1988). Há evidências de que a adesão das partículas virais às microvilosidades intestinais e posterior fusão de membranas ocorra por mecanismo mediado por receptor, uma vez que testes revelaram ser a adesão um evento saturável e passível de inibição pela ação de proteases (Horton & Burand, 1993). Ainda não se conhecem mecanismos relacionados ao transporte dos vírus através das microvilosidades (Volkman, 1997), porém acredita-se que o acesso dos ODVs ao núcleo seja facilitado por microtúbulos (Granados, 1978). É possível que os nucleocapsídeos que passam diretamente através da célula intestinal para infectar hemócitos adquiram elementos do envelope de BVs ao brotar pela porção basal da membrana plasmática. Isso inclui a proteína GP64, principal proteína do envelope de BVs, um dos responsáveis pelo mecanismo de endocitose adsorptiva para entrada destes vírus na célula hospedeira (revisado por Blissard, 1996). Foi proposto por Engelhard e colaboradores (1994) que a passagem direta de vírus através da membrana basal seja possível através de mecanismos enzimáticos, uma vez que a malha desta estrutura exclui partículas de diâmetro superior a 15 nm (Reddy & Locke, 1990).

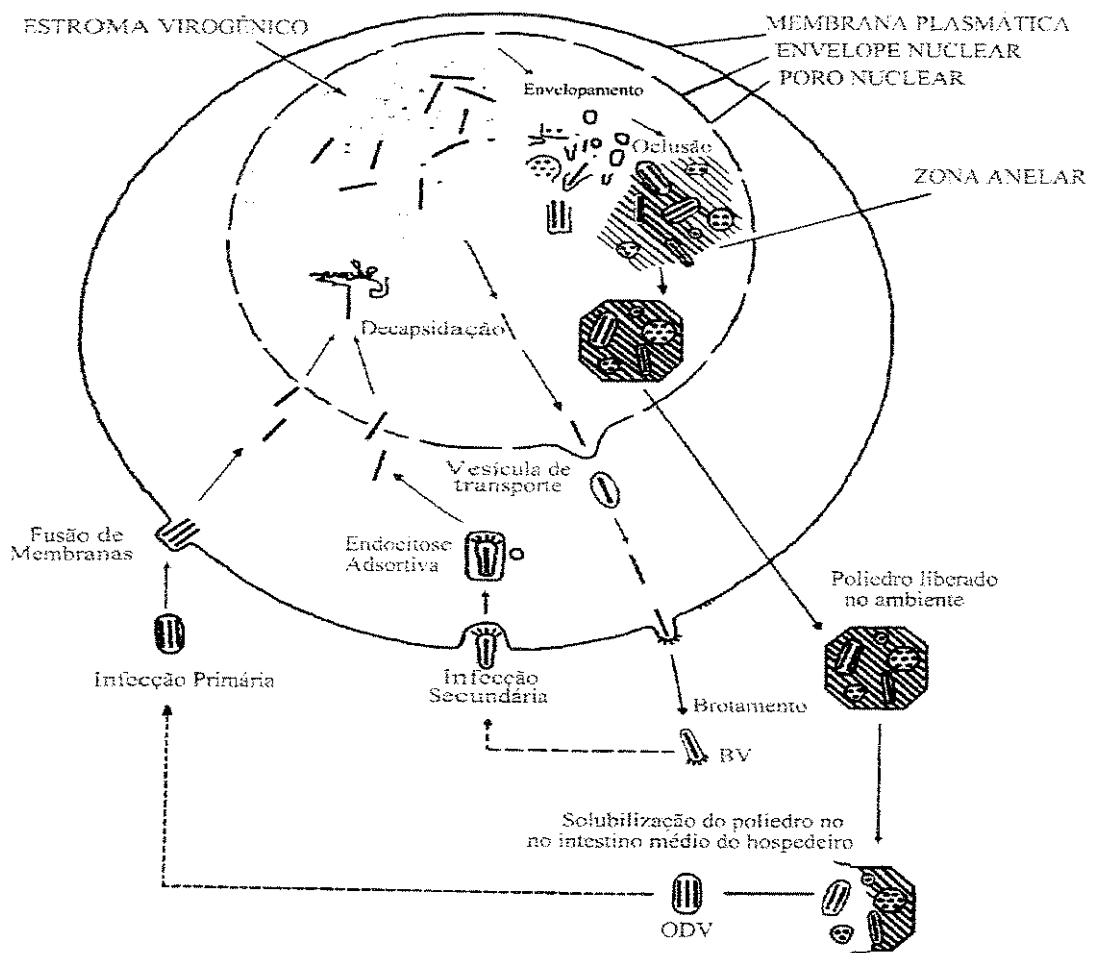


FIGURA 2. Ciclo de infecção dos MNPVs. Após ingestão pela lagarta os poliedros são dissolvidos pelo pH alcalino do intestino médio liberando ODVs que entram na célula hospedeira através de fusão de membranas. No núcleo (ou junto aos poros nucleares) estes vírus sofrem decapsidação, seus genes são transcritos, o DNA é replicado e ocorre montagem de nucleocapsídeos numa porção nuclear modificada em função da infecção viral, o estroma virogênico. Inicialmente, estes nucleocapsídeos podem brotar em vesículas de transporte derivadas do envelope nuclear em direção à membrana plasmática. Ao longo da trajetória estas vesículas desaparecem. Estes nucleocapsídeos brotam posteriormente em porções da membrana enriquecidas pela glicoproteína GP64, constituindo os vírus extracelulares (BVs), capazes de realizar infecção secundária penetrando nas células hospedeiras através do mecanismo de endocitose adsortiva. Em fases mais tardias da infecção os nucleocapsídeos são envelopados e ocluídos na zona anelar, outra porção nuclear modificada, sendo os poliedros liberados no ambiente após lise celular. (Adaptado de Blissard & Rohrmann, 1990).

1.1.4. REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROCESSO DE INFECÇÃO *IN VITRO*

Graças ao desenvolvimento de linhagens contínuas de células de inseto permissivas aos NPVs tem sido possível a realização de estudos detalhados da morfogênese destes vírus, de sua biologia molecular e sua utilização como vetores de expressão. Os principais modelos utilizados nos estudos de morfogênese são linhagens de células derivadas de *Spodoptera frugiperda* e *Trichoplusia ni* infectadas por AcMNPV (Vaughn & Dougherty, 1985; Faulkner & Carstens, 1986; Volkman & Knudson, 1986; Bilimoria, 1991; Blissard, 1996).

A expressão gênica dos baculovírus é regulada temporalmente, podendo ser dividida em duas fases gerais separadas pela replicação do DNA viral. A fase inicial (*early*), ocorre antes e a tardia (*late*) ocorre logo após o início da replicação. Os genes *early* são expressos por volta de 2 a 7 h p. i., sendo que parte destes genes não necessitam da síntese prévia de produtos virais para a sua expressão. Os produtos de genes *early* têm função para a regulação transcricional de outros genes, replicação do DNA viral e inibição da apoptose, entre outras funções regulatórias. Alguns genes *early* necessitam ser expressos continuamente durante a infecção e não somente no início, como é o caso de *p35*, *gp64*, *pp31* e *ie-1* (revisado por Friesen, 1997).

A fase *late* é caracterizada pela produção de BVs, OBs e pelo *shutdown* da expressão gênica do hospedeiro, ocorrendo a expressão de genes estruturais para a montagem de partículas. Esta fase pode ser subdividida em *late*, cujos genes são transcritos entre 6 e 24 h p. i., e *very late*, que ocorre a partir de 18 h p. i. até 72 h p. i., quando a célula é lisada. A fase *very late* é caracterizada pela expressão abundante de poliedrina, a principal proteína dos OBs e P10, uma proteína provavelmente envolvida na lise celular e formação de poliedros (revisado por Lu & Miller, 1997).

Esta expressão gênica temporal resulta numa sequência sistemática de efeitos citopáticos relacionados à morfogênese viral, bastante característicos durante a infecção.

BVs são duas mil vezes mais infecciosos em cultura de células do que ODVs (Keddie & Volkman, 1985), sendo desta forma utilizados para estudos da replicação *in vitro*. BVs ganham acesso ao citoplasma celular através de um mecanismo de endocitose adsorptiva, onde a fusão entre a membrana do envelope viral e da vesícula endocítica é mediada pela principal proteína de seu envelope, GP64, de maneira dependente de pH ácido (revisado por Blissard, 1996) (Fig. 2).

Acredita-se que a decapsidação possa ocorrer junto aos poros nucleares ou mesmo no interior do núcleo pela ação de uma quinase associada ao nucleocapsídeo (Wilson & Consigli, 1985; Bilimoria, 1991; Funk & Consigli, 1993) (Fig. 2). Após decapsidação e acesso do DNA viral ao núcleo, ocorre imediatamente a transcrição de genes *early*, sendo que mRNAs virais podem ser detectados no citoplasma em até 30 min p. i. (minutos pós-infecção) (Chisholm & Henner, 1988). No início da replicação do DNA viral e expressão de genes *late*, por volta de 6 h p. i., ocorre hipertrofia nuclear e arredondamento celular progressivo devido a reorganizações do citoesqueleto (Volkman & Zaal, 1990; Charlton & Volkman, 1991). Agrupamentos heterocromáticos são deslocados para a periferia do núcleo ao mesmo tempo em que surge na sua porção central o estroma virogênico (Vaughn & Dougherty, 1985; Volkman & Knudson, 1986), um material granular frouxo que serve de microambiente para a montagem e maturação de partículas virais, as quais surgem posteriormente, em torno de 10 h p. i. Por volta de 16-18 h p. i. o estroma virogênico torna-se maduro, apresentando um aspecto mais condensado, subcompartimentalizado, com massas fibrilares eletron-densas ricas em DNA e RNA contendo acúmulos de proteínas do capsídeo espaçadas por regiões granulares eletron-lucentes (espaço intraestromal), as quais

contém em seu interior uma maior quantidade de partículas virais que na fase anterior, onde acredita-se que ocorra a montagem e maturação dos nucleocapsídeos (Summers, 1971; Harrap, 1972; Fraser, 1986; Young *et al.*, 1993) (Fig. 2).

Inicialmente os nucleocapsídeos maduros são endereçados para a formação de BVs. Para AcMNPV o título máximo de BVs é produzido em torno de 24 h p. i., declinando em seguida em virtude do envelopamento e oclusão viral (revisado por Willians & Faulkner, 1997). Tem sido comumente observado através de microscopia eletrônica que os BVs brotam do núcleo através de vesículas formadas por evaginações do envelope nuclear, formando as chamadas vesículas de transporte, as quais, por mecanismo desconhecido desaparecem posteriormente, uma vez que os nucleocapsídeos são visualizados desprovidos de membrana em porções citoplasmáticas mais distais com relação ao núcleo (revisado por Willians & Faulkner, 1997) (Fig. 2). Estes nucleocapsídeos brotam da célula alinhando sua porção apical com a membrana plasmática em porções enriquecidas com a proteína GP64, a qual forma projeções chamadas peplômeros, adquirindo assim um envelope o qual é formado por elementos celulares e virais (Adams *et al.*, 1977; Volkman *et al.*, 1984; Volkman, 1986) (Fig. 2).

Entre 10 e 16 h p. i. as proteínas poliedrina e P10 podem ser detectadas no citoplasma através de imunocitoquímica, sendo que, após 20 h p. i. a poliedrina torna-se basicamente nuclear enquanto P10 organiza-se em grandes acúmulos fibrilares no núcleo e citoplasma (Vlak *et al.*, 1988; Willians *et al.*, 1989).

Após 24 h p. i. a produção de BVs decresce, dando espaço para a produção de OV's (Stolz *et al.*, 1973; Tanada & Hess, 1976; Volkman *et al.*, 1976). A maturação do estroma virogênico e consequente progressão da hipertrofia nuclear leva ao aparecimento de um compartimento periostromal distinto, nomeado região anelar (*ring zone*), rica em vesículas

ou fragmentos membranosos trilamelares, onde ocorre envelopamento dos vírions derivados do estroma virogênico e montagem dos OBs (Stolz *et al.*, 1973) (Fig. 2). A origem destas membranas dentro do núcleo ainda não foi totalmente esclarecida, havendo dúvidas com relação a participação do envelope nuclear ou síntese *de novo* para a sua formação (Willians & Faulkner, 1997).

Acredita-se que a regulação da produção e acúmulo de proteínas específicas de OV's no núcleo determine o início da sua produção. Há evidências de que os nucleocapsídeos em sua passagem para a zona anelar sejam interceptados e complexados a proteínas necessárias para o envelopamento (Kawamoto *et al.*, 1977a, b). Nucleocapsídeos envelopados são incorporados numa matriz paracristalina de poliedrina, formando os OBs, fenômeno cujos mecanismos regulatórios não foram ainda identificados (Vaughn & Dogherty, 1985). Por último, os OBs são envolvidos por uma estrutura bilamelar, composta de proteínas (PP34 ou proteína cálix) e principalmente carboidratos, chamada cálix. Esta estrutura também aparece na zona anelar associada aos acúmulos fibrilares de P10, cuja origem também encontra-se obscura (Mackinnon *et al.*, 1974; van der Wilk *et al.*, 1987). O final do ciclo infeccioso é marcado pela lise celular e liberação dos OBs, caracterizado pelo aparecimento de vesiculações citoplasmáticas associadas à membrana plasmática e membrana nuclear externa (Willians & Faulkner, 1997).

1.2. O BACULOVÍRUS ANTICARSIA GEMMATALIS NUCLEOPOLYHEDROVIRUS

A lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) é importante praga nas Américas, sendo responsável pela metade das aplicações de inseticidas químicos em plantações de soja brasileiras (Moscardi, 1998).

Um nucleopoliedrovírus associado a *A. gemmatalis* foi coletado pela primeira vez no Brasil na região de Campinas-SP, em 1972 (Allen & Knell, 1977) e posteriormente em outras regiões, apresentando resultados satisfatórios em ensaios de campo para o controle desta lagarta (Carner & Turnipseed, 1977; Corso *et al.*, 1977). Desta forma, a partir de 1979 o Brasil, através da Embrapa/Soja (Londrina-PR) vem desenvolvendo o maior programa mundial de uso de vírus de insetos para controle biológico de pragas, utilizando este baculovírus, denominado *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV), para o controle da lagarta-da-soja em uma área superior a um milhão de hectares por ano, representando redução de custos de produção de 70% e diminuição do uso de inseticidas químicos na ordem de 1,6 milhões de litros por ano (revisado por Ribeiro *et al.*, 1998).

Estudos moleculares do baculovírus AgMNPV e de suas interações com hospedeiros estão em seu início. O desenvolvimento de uma linhagem celular derivada de formas embrionárias de *A. gemmatalis*, UFL-AG-286 (Sieburth & Maruniak, 1988a) tem facilitado estes estudos. Estas células mostraram-se susceptíveis a infecção com AgMNPV e *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) e pouco susceptíveis a *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SfMNPV) (Sieburth & Maruniak, 1988b).

Seis variantes genômicos do isolado original de AgMNPV foram distinguidos a partir de estudos de perfis de restrição de DNA, sendo o variante AgMNPV-2D considerado o protótipo e modelo para estudos do baculovírus AgMNPV por representar 40% dos variantes obtidos (Maruniak, 1989).

O mapa físico genômico do baculovírus AgMNPV-2D foi obtido pelo uso de sete enzimas de restrição, revelando 82 sítios de clivagem dentro de um genoma de 133 kpb (pares de kilobases) em disposição circular (Johnson & Maruniak, 1989, Garcia-Canedo, 1995). O sequenciamento da região contendo o gene da poliedrina e seu promotor em AgMNPV permitiu que estudos filogenéticos fossem feitos, revelando grande homologia deste vírus com AcMNPV, *Orgyia pseudotsugata* nucleopolyhedrovirus (OpMNPV) e *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) (Zanotto *et al.*, 1992; 1993).

Estudos de dois diferentes isolados de AgMNPV mostraram um aumento no número de variantes genômicos deste vírus ao longo do tempo, bem como aumento no número de regiões variáveis gerados através de rearranjos do genoma viral. Uma região altamente variável localizada entre 88,58 - 90,13 um (unidades de mapa) foi sequenciada e comparada entre dois isolados, revelando possuir sequências repetitivas de 127 pb (pares de base) em tandem, sendo a diferença entre o número de repetições responsável pela divergência entre os dois isolados (Garcia-Canedo, 1995).

O gene *egt* de AgMNPV foi localizado, mapeado e parcialmente sequenciado, revelando homologia com o gene *egt* de outros baculovírus, como *Choristoneura fumiferana* nucleopolyhedrovirus (CfMNPV) e AcMNPV. Este gene foi transativado em ensaios transientes pelo fragmento BglII-F de AgMNPV, o qual apresenta homologia com o gene *ie-1* de AcMNPV, apresentando localização semelhante à deste gene neste vírus bem como em outros baculovírus (Rodrigues, 1996). A análise da transcrição do gene *egt* de AgMNPV ao longo da infecção viral está sendo realizada, bem como a análise química da enzima codificada por ele, a Ecdisteróide UDP-glicosil transferase (EGT) (Pinedo & Ribeiro, comunicação pessoal).

Da mesma forma que *egt* e *ie1*, outros dois genes de AgMNPV (*gp64* e *dnapol*) foram identificados e localizados, apresentando posicionamento semelhante ao de seus análogos em AcMNPV (Da-Silveira & Ribeiro, 1996; Felipe-Alves *et al.*, 1996).

A replicação de AgMNPV em linhagens celulares permissivas, semi-permissiva e abortiva foi caracterizada, sugerindo uma relação entre especificidade e capacidade de replicação do DNA viral (Castro *et al.*, 1997).

Aspectos da citopatologia induzida por AgMNPV em células UFL-AG-286 ao longo da infecção foram descritos, mostrando que este vírus induz dramáticas modificações no padrão de distribuição dos filamentos de actina e microtúbulos nesta linhagem celular (Pombo *et al.*, 1998). De forma semelhante, estudos da citopatologia de AgMNPV em células intestinais de lagartas *A. gemmatilis* foram feitos, sugerindo serem as células cilíndricas do epitélio intestinal alvo de infecção secundária (Matos *et al.*, no prelo).

1.3. APOPTOSE

1.3.1. DEFINIÇÃO E IMPORTÂNCIA

A morte celular programada (M.C.P.) é um fenômeno de autodestruição celular dirigido por uma cascata de reações em resposta a um estímulo, onde uma célula é morta através de mecanismos intrínsecos, finamente regulados. Também chamada de “morte fisiológica”, é distinta da necrose, onde a célula incha e sofre lise passiva frente a um dano severo acidental.

Trata-se de um fenômeno bastante conservado, descrito em representantes dos cinco reinos dos seres vivos e melhor caracterizado dentre os animais, havendo na atualidade conhecimento da existência de grande complexidade mecanística nos vertebrados

(Hochman, 1997; Jacobson *et al.*, 1997; Pennel & Lamb, 1997; Ameisen, 1998; Olie *et al.*, 1998).

A M.C.P. garante para os animais funções básicas como o perfeito desenvolvimento embrionário e metamórfico, homeostase tecidual e defesa contra patógenos, bem como outras funções mais específicas, fazendo parte de estratégias da resposta imune de mamíferos (revisado por Ekert & Vaux, 1997) e diferenciação celular (revisado por Jacobson *et al.*, 1997). Desta forma, ocorre a especialização de células que exercem uma função após a morte (queratinócitos e células do cristalino, por exemplo) e a eliminação de células redundantes, velhas, danificadas, defeituosas, infectadas por vírus ou com potencial maligno, no sentido de garantir a manutenção do organismo. Falhas neste sistema que levem a uma morte celular suprimida ou exarcebada foram relacionadas a doenças como o câncer, doenças auto-imunes, neurodegenerativas, infecções virais, lesões tóxicas e isquêmicas, dentre outras (revisado por Thompson, 1995).

Em plantas, de forma semelhante aos animais, a M.C.P. tem importância durante o desenvolvimento e morfogênese, especialização celular, senescência e defesa contra patógenos, sendo o mecanismo responsável pelas respostas de hipersensibilidade local (revisado por Pennell & Lamb, 1997).

Em organismos unicelulares, procariontes ou eucariontes inferiores, para os quais a princípio a auto-destruição representaria um fenômeno contra-evolutivo, especula-se que a M.C.P. teria importância para a diferenciação e adaptação a hostilidades ambientais. Da mesma forma que para os organismos pluricelulares, a ocorrência de apoptose em unicelulares apresenta uma natureza favorecedora da coletividade, otimizando a sobrevivência da colônia em detrimento da morte de alguns indivíduos inadequadamente

diferenciados ou infectados por vírus, cuja permanência seria prejudicial (revisado por Hochman, 1997; Ameisen, 1998).

De acordo com as funções citadas acima, alguns exemplos de estímulos desencadeadores da apoptose seriam: radiação ou drogas que trazem danos ao DNA, falta de fatores de sobrevivência, espécies reativas de oxigênio, estímulo hormonal ou privação deste, glicocorticóides, estímulo ou privação de citocinas e infecções virais, dentre inúmeros outros. Na presença do estímulo, células que possuem receptores específicos ou que são susceptíveis têm o seu programa de morte ativado. Diferentes tipos celulares respondem diferencialmente a estímulos específicos.

O termo “apoptose”, do grego, “folhas que caem das árvores”, introduzido por Kerr e colaboradores (1972), originalmente refere-se a um conjunto de eventos morfológicos peculiares e sequenciais associados a M.C.P., descritos inicialmente para alguns tipos celulares de vertebrados em condições patológicas e não-patológicas, constituindo um conjunto de sintomas que se tornaram diagnóstico da M.C.P. e que a distinguem da necrose, onde ocorre o comprometimento imediato da função e integridade celular (Fig. 3). Este termo tornou-se bastante popular à medida em que o campo de estudo foi sendo expandido, de forma que “apoptose” e “morte celular programada” têm sido empregados como sinônimos na atualidade.

O fenômeno apoptótico abrange a ocorrência de marginação e condensação cromatínica, fragmentação nuclear, condensação citoplasmática, *blebbing* da membrana plasmática e citoplasma adjacente com posterior fragmentação da célula nos chamados corpos apoptóticos. Nos corpos apoptóticos a integridade de organelas e membranas é mantida, evitando danos ao tecido em consequência do extravasamento de conteúdos

citoplasmáticos, o que ocorre durante a necrose (Fig. 3). (Kerr et al., 1972; Wyllie, 1980; Duvall & Wyllie, 1986).

O conjunto fenotípico da apoptose está associado a modificações da membrana plasmática que levam ao rápido reconhecimento e fagocitose de células apoptóticas por células vizinhas ou “fagócitos profissionais” antes mesmo da célula completar o conjunto de alterações citadas, na ausência ou com resposta inflamatória mínima (Fig. 3) (revisado por Savill, 1997). Uma destas modificações, sendo a melhor descrita até o momento, é a perda da assimetria da membrana plasmática com a exposição de fosfatidilserina na bicamada externa, fenômeno que pode ser localizado *in situ* com o uso da proteína Anexina V, a qual tem afinidade e se liga a fosfatidilserina. Quando complexada a algum marcador a Anexina V constitui uma forma de diagnóstico do fenômeno (McEvoy *et al.*, 1986; Fadok *et al.*, 1992; Koopman *et al.*, 1994; Ernst *et al.*, 1998).

A fragmentação do DNA através de endonucleases específicas também é um evento associado a apoptose, podendo ocorrer a quebra em fragmentos de alto peso molecular (50-300 pkb, pares de kilobases) e oligonucleossomais (200 pb, pares de bases, e múltiplos deste tamanho). Os fragmentos oligonucleossomais podem ser facilmente visualizados como um padrão de bandas em “escada” através de eletroforese em gel de agarose, sendo amplamente utilizado como uma espécie de diagnóstico bioquímico de apoptose desde a década de 80, embora se saiba atualmente que em alguns tipos celulares esta característica possa estar ausente durante a apoptose (Wyllie, 1980; Ucker *et al.*, 1992; Oberhammer *et al.*, 1993; Walker *et al.*, 1993).

Nos últimos anos, estudos morfológicos e bioquímicos têm revelado a ocorrência de significativas mudanças conformacionais, funcionais e de disposição das proteínas do citoesqueleto, lâmina e matriz nuclear, as quais podem ser clivadas ou fosforiladas durante a

apoptose e que resultam nas modificações do padrão cromatínico, fragmentação nuclear e citoplasmática descritas para este processo (Atencia *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1997; Martelli *et al.*, 1997; Mills *et al.*, 1998).

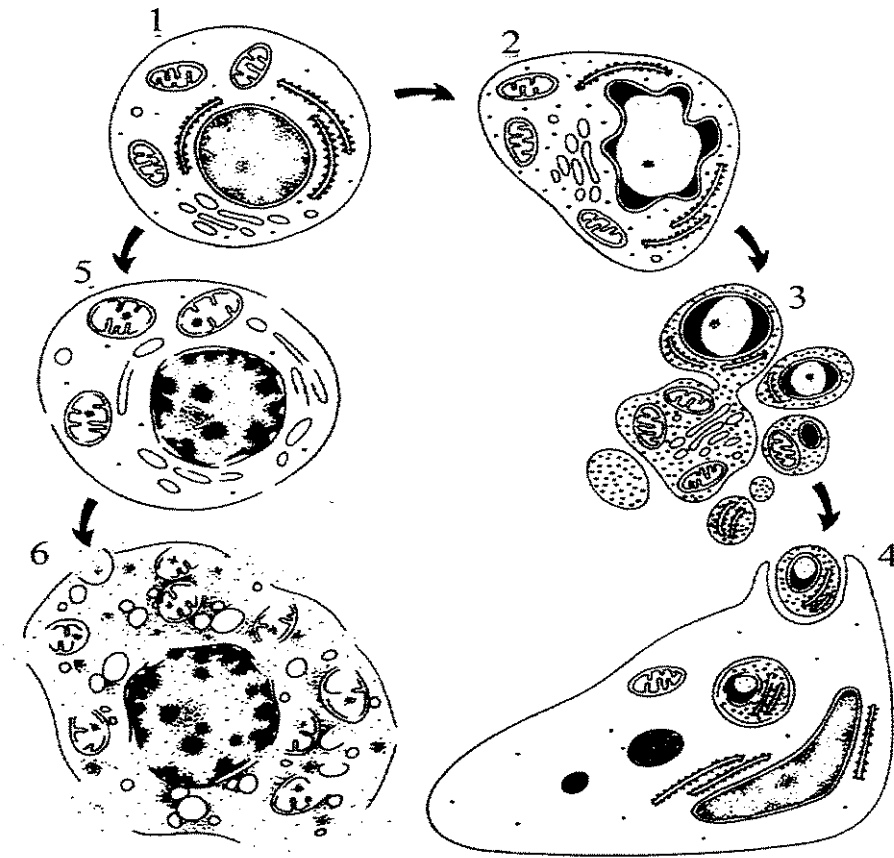


FIGURA 3. Sequência de modificações ultraestruturais na apoptose e necrose. Uma célula normal é esquematizada em 1. Em fases iniciais da apoptose (2) ocorre condensação citoplasmática com a manutenção da integridade de organelas e membranas e condensação cromatínica em porções junto ao envelope nuclear, tornando o mesmo convoluto. Posteriormente (3), a célula fragmenta-se em corpos apoptóticos, que podem conter porções nucleares ou não, os quais são fagocitados por células vizinhas ou "fagócitos profissionais" (4). Em fases iniciais da necrose (5), a célula apresenta condensação cromatínica irregular, mitocôndrias hipertrofiadas contendo um precipitado floculento em suas matrizes, dissolução de ribossomos e ruptura em porções da membrana plasmática. Mais adiante (6), todos os componentes celulares são desintegrados. (Adaptado de Kerr *et al.*, 1995)

1.3.2. PRINCIPAIS MOLÉCULAS ENVOLVIDAS E ASPECTOS MECANÍSTICOS

Nos anos 80 a associação de um evento bioquímico (padrão de fragmentação do DNA) a um conjunto de eventos morfológicos que caracterizam o fenômeno apoptótico deu impulso para novas abordagens no estudo da morte celular, especialmente para a descoberta de genes e moléculas envolvidos na execução e regulação do fenômeno.

Estudos pioneiros do controle genético da apoptose utilizaram como modelo o nematódeo *Caenorhabditis elegans* (Ellis e Horvitz, 1986), passando posteriormente para o estudo de insetos e mamíferos, estando na atualidade já identificadas algumas famílias de genes envolvidas no processo, bem como mecanismos, vias de execução e regulação, relacionados principalmente a humanos, *Drosophila melanogaster* e *C. elegans*.

A observação de que as modificações celulares durante a apoptose são bastante conservadas entre os diferentes tipos celulares levou os pesquisadores a presumir que as diversas vias sinalizadoras possíveis resultariam na ativação de um mecanismo de “execução celular” comum. Estudos posteriores atribuíram a “execução celular” à uma família de proteases de cisteína conhecidas como caspases. Nesta ocasião foi verificada homologia entre o produto do gene CED-3 (*cell abnormal death-3*) de *C. elegans*, essencial para a morte celular e a enzima ICE (*interleucin-1 β converting enzyme*), agora chamada caspase-1, de mamíferos (Yuan *et al.*, 1993).

Os membros desta família têm sequência de aminoácidos, estrutura e especificidade de substrato semelhantes. As caspases são produzidas constitutivamente, sendo encontradas normalmente na célula na forma zimogênica (procaspases), a qual contém três domínios principais separados por sítios de clivagem contendo aspartato: 1 - pró-domínio N-terminal; 2 - uma “sequência maior”, de aproximadamente 20 kD; 3 - uma “sequência menor”, C-terminal, de aproximadamente 10 kD. Estas enzimas tornam-se ativas através de proteólise,

formando tetrâmeros contendo dois heterodímeros constituídos de uma subunidade maior e uma subunidade menor (derivadas, respectivamente, das “sequências maior e menor” presentes na forma zimogênica da enzima) (Fig.4). Cada tetrâmero possui dois sítios catalíticos independentes nas regiões de íntima associação entre uma subunidade maior e uma menor nos heterodímeros (Fig. 4). O pró-domínio N-terminal é extremamente variável em sequência e tamanho, tendo função regulatória da ativação, não fazendo parte da enzima na sua forma ativa (Fig. 4) (revisado por Thornberry & Lazebnic, 1998).

As caspases possuem alta especificidade, reconhecendo sequências de 4 resíduos de aminoácidos em posição N-terminal ao sítio de clivagem, sendo o resíduo mais próximo a este sítio (posição P1) sempre um ácido aspártico, daí o nome trivial "caspase" ("c" refere-se a cisteína no sítio ativo, "aspase" refere-se ao aspartato nos sítios de clivagem) (Cohen, 1997).

Atualmente são conhecidas por volta de 13 caspases diferentes em mamíferos, cada qual, acredita-se, clivando um conjunto específico de proteínas-alvo, que inclui proteínas do citoesqueleto, quinases e caspases (onde a clivagem leva a ativação destas enzimas), proteínas reguladoras de reparo de DNA, de *splicing* de RNA e do ciclo celular, entre outras (revisado Cohen, 1997, Cory & Adams, 1998, Thornberry & Lazebnic, 1998).

A ativação das caspases é um evento hierárquico, havendo caspases que clivam e consequentemente ativam outras caspases numa cascata sequencial de ativação. Desta forma, as caspases poderiam ser classificadas em iniciadoras, as que estão no topo da cascata de ativação, e efetoras, as que estão no fim e que participam da “execução” da morte celular (Fig. 4) (revisado Villa *et al.*, 1997, Cory & Adams, 1998).

Acredita-se que as caspases iniciadoras possam ser ativadas por outras proteases semelhantes, como a serina-protease granzima B (Darmon *et al.*, 1995) ou por auto-

processamento. Há evidências de que o auto-processamento ocorra pela ligação das procaspases a cofatores através do seu pró-domínio N-terminal longo, o que se dá frente ao estímulo apoptótico. Esta ligação promoveria uma aglomeração de procaspases, que possuem uma pequena atividade, cuja proximidade seria capaz de desencadear o auto-processamento (revisado por Thornberry & Lazebnic, 1998).

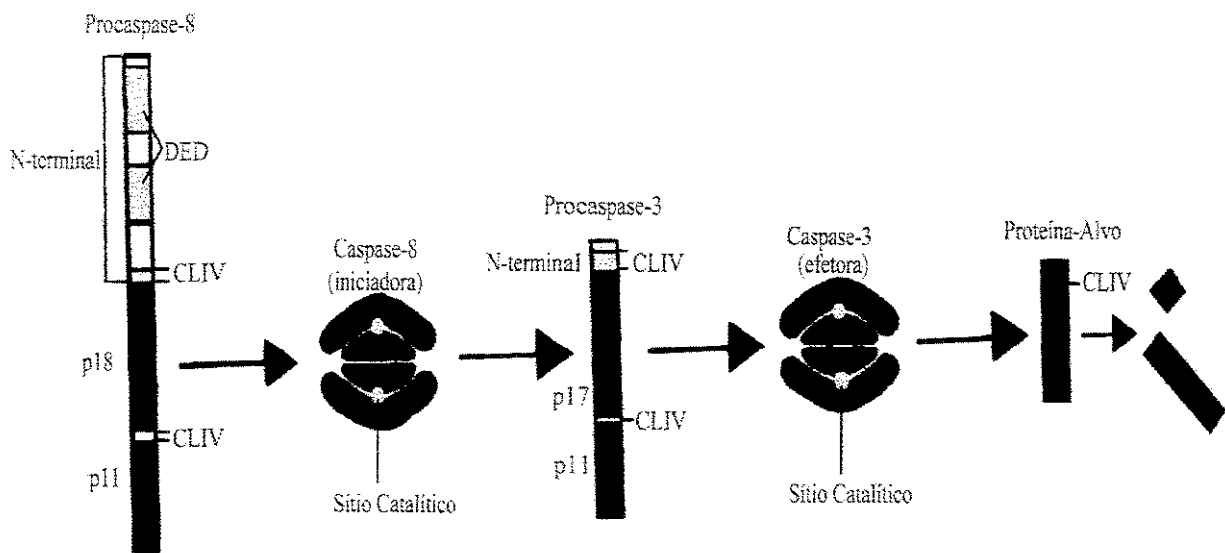


FIGURA 4. Ativação sequencial de caspases. A procaspase iniciadora representada (procaspase-8) possui pró-domínio N-terminal longo, contendo *death effector domains* (DED) e quatro sítios de clivagem (CLIV), necessários para sua auto-ativação. A caspase-8, formada por um tetrâmero com duas subunidades maiores e duas subunidades menores, é capaz de ativar procaspases executoras, como a procaspase-3, a qual contém três sítios de clivagem para ativação, e que, uma vez ativada, clivará proteínas-alvo resultando no conjunto de modificações observado na apoptose. (Adaptado de Cory & Adams, 1998)

Um exemplo bem caracterizado de via sinalizadora inicial da apoptose e ativação de uma caspase iniciadora por proximidade induzida é desempenhada pelo receptor de membrana CD95, também chamado APO-1 ou receptor FAS, pertencente a superfamília de receptores TNF (*tumor necrosis factor*), identificados somente em vertebrados e cujas funções melhor conhecidas são a deleção de linfócitos ativados após a função imune e a morte de células-alvo por linfócitos T citotóxicos (Nagata & Golstein, 1995). Este receptor, da mesma forma que os outros membros da família de receptores TNF, possui um domínio extracelular rico em resíduos de cisteína, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático chamado *death domain* (Tartaglia *et al.*, 1993; Nagata, 1997). Quando em contato com o ligante (FasL ou CD95L), sinalizador para a morte, ocorre agrupamento dos *death domains* de vários receptores CD95 (Huang *et al.*, 1996) e consequente ligação ao *death domain* de uma proteína adaptadora, chamada FADD (*Fas-associated death domain*) (Chinnaiyan *et al.*, 1995). A proteína FADD, por sua vez, também possui um domínio DED (*death effector domain*) que se liga a uma região análoga no prodomínio da procaspase-8, uma caspase iniciadora. O recrutamento e aglomeração destas procaspases resultaria na auto-ativação e início da cascata de caspases.

Outro modelo de auto-ativação de uma caspase iniciadora através de proximidade induzida, passível de ativação por diversos tipos de estímulos, envolve outros elementos-chave da regulação da apoptose que merecem ser comentados.

As análises genéticas em *C. elegans* permitiram a identificação de outras 2 proteínas relacionadas à morte celular, além da já comentada CED-3 cujos homólogos em vertebrados são as caspases: CED-9, de ação inibitória para ativação de CED-3 e CED-4, fator promotor da auto-ativação desta caspase. Na ausência de estímulo para a morte celular estes elementos formam um complexo, chamado apoptossoma, onde CED-9 está presa à membrana

mitocondrial externa e complexada à CED-4; esta, por sua vez está ligada à forma zimogênica de CED-3. Na presença do estímulo apoptótico ocorre uma cascata de reações que leva à liberação do complexo CED-4/CED-3 de CED-9. Assim, CED-4 está livre para interagir com outras moléculas CED-4, promovendo a aglomeração de CED-3 e sua ativação por auto-processamento (revisado por Hengartner, 1998).

CED-9, o inibidor da ativação de caspases, apresenta homologia com um membro antiapoptótico de uma vasta família de proteínas chamada Bcl-2, a qual contém elementos que inibem ou estimulam a ativação de caspases, enquanto CED-4 apresenta homologia com Apaf-1 (*apoptosis protease-activation factor*), a qual funciona como um adaptador para o agrupamento de procaspases, desempenhando função semelhante à das proteínas FADD citadas no exemplo anterior. Desta forma, o apoptossoma de vertebrados seria composto por Bcl-xl (membro da família Bcl-2, homólogo a CED-9), Apaf-1 e procaspase- 9 (Fig. 5) (revisado por Hengartner, 1998).

A família Bcl-2 compreende várias proteínas que estão envolvidas na regulação da apoptose, podendo agir de forma inibitória ou estimulatória. Ao todo, cerca de 23 membros desta família foram identificados em mamíferos e vírus, possuindo pelo menos um entre quatro motivos conservados (BH1 a BH4). De acordo com a função (anti-apoptose ou pró-apoptose) e presença destes domínios, a família Bcl-2 está dividida em três sub-famílias, sendo a mais numerosa, com cerca de 12 membros, inibidora de apoptose e as outras duas, pró-apoptóticas (revisado por Adams & Cory, 1998). Membros de diferentes sub-famílias podem heterodimerizar por interação entre os domínios BH1, BH2 e BH3 onde um elemento pode neutralizar a função do outro de modo específico, o que sugere que a concentração relativa destes elementos dentro da célula seria um fator de regulação do programa de morte (Oltvai *et al.*, 1993).

Além dos 4 motivos citados, quase todos os membros da família Bcl-2 apresentam uma cauda hidrofóbica C-terminal, possivelmente relacionada a ancoragem destas moléculas a endomembranas (Muchmore *et al.*, 1996).

A regulação das funções dos membros da família Bcl-2 encontra-se caracterizada para sinais provenientes de fatores de sobrevivência ou pela via apoptótica mediada pelo fator transcricional P53. Fatores de sobrevivência podem induzir em células-alvo a transcrição de genes antiapoptóticos da família Bcl-2 ou promover inativação de membros pró-apoptóticos através de mudanças pós-traducionais (Fig. 5). Por outro lado, P53 induz a transcrição de genes pró-apoptóticos da família Bcl-2, como por exemplo *bax*, como parte de seu mecanismo de indução de apoptose diante de danos celulares irreversíveis (revisado por Adams & Cory, 1998).

Importantes elementos adicionais de regulação da apoptose no contexto do apoptossoma são provenientes das mitocôndrias, principalmente para vertebrados (Fig. 5). Algumas fontes de estímulo apoptótico, como radiação ultravioleta, resultam na liberação de citocromo C do espaço intermembranas das mitocôndrias para o citoplasma. Citocromo C e ATP são cofatores essenciais para a ativação da procaspase-9 por Apaf-1, fato não observado em *C. elegans* (Liu *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1997). Além do citocromo C, acredita-se que a mitocôndria possa liberar um outro fator de ativação de caspases efetoras chamado AIF (*apoptosis-inducing factor*) bem como caspases propriamente ditas (Susin *et al.*, 1996; 1997). Um dos mecanismos antiapoptóticos de membros da família Bcl-2, uma vez associados a membrana mitocondrial externa, seria manter a sua integridade e evitar a liberação do citocromo C (Yang *et al.*, 1997; Green & Reed, 1998). Por outro lado, o membro pró-apoptótico *bax* induz a liberação deste por formar poros na membrana mitocondrial externa, podendo causar inclusive morte independente da ação de caspases

quando expresso em grande quantidade, fato observado para leveduras e mamíferos (Green & Reed, 1998).

Este último fato juntamente com outras evidência experimentais têm sugerido que apoptose e necrose poderiam possuir mecanismos em comum, sendo a mitocôndria um elemento-chave desta relação, permitindo várias especulações.

Para diversos tipos celulares em apoptose tem sido observado o colapso do potencial transmembrana da mitocôndria pela abertura de um canal de condutância conhecido como poro PT (poro de permeabilidade transitória), o qual resulta no influxo de água e íons para a mitocôndria, possível ruptura da membrana externa e liberação dos fatores proapoptóticos citados (Bernardi *et al.*, 1992; Petronilli *et al.*, 1994). Diante do comprometimento das funções de fosforilação oxidativa e consequente depleção do ATP celular, uma célula na qual a glicólise apresenta maior importância na produção de ATP do que a respiração mitocondrial teria maior tendência à apoptose, enquanto outra, sem ATP suficiente para atuar como cofator na ativação de procaspases ou que possui muitos inibidores destas enzimas, sofreria necrose mesmo na presença de um estímulo apoptótico (Green & Kroemer, 1998).

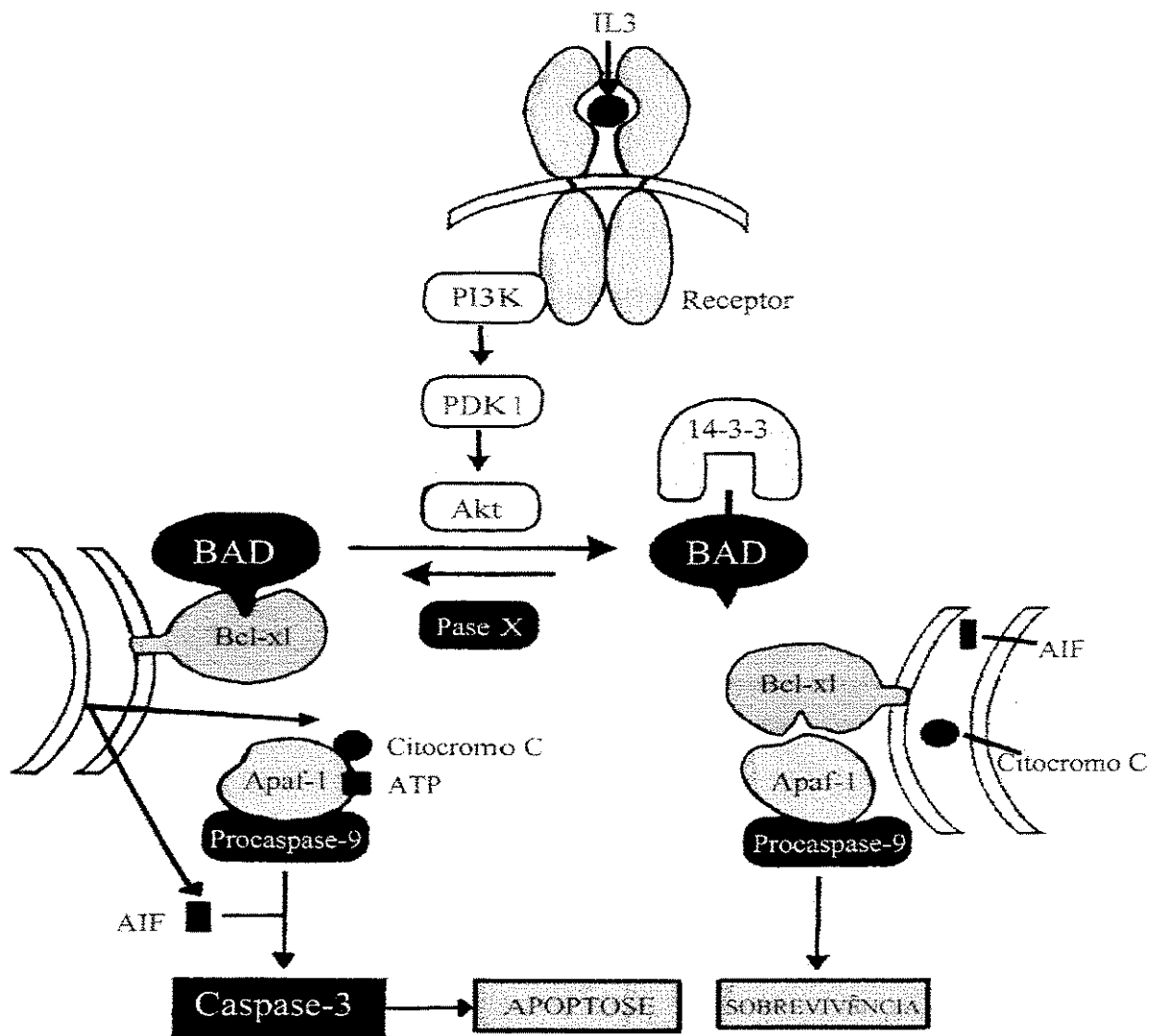


FIGURA 5. Regulação da atividade de um membro pró-apoptótico de Bcl₂ por modificação pós-traducional e papel da mitocôndria na apoptose. A ligação da Interleucina-3 (um fator de sobrevivência) ao seu receptor leva à ativação de uma quinase que fosforila BAD (membro pró-apoptótico da família Bcl₂), resultando no seu sequestro por uma proteína 14-3-3, o que mantém o apoptossoma (Bcl-xl/Apaf-1/procaspase-9) e mitocôndria intactos. Na ausência da citocina a desfosforilação de BAD por uma fosfatase permite a dimerização deste com Bcl-xl e consequente liberação de Apaf-1 complexado a procaspase-9, bem como a liberação de citocromo C e AIF pela mitocôndria, cofatores para a ativação de caspases, ocorrendo assim a ativação da procaspase-9, na presença de ATP, a qual irá ativar a procaspase-3 levando à apoptose. (Adaptado de Cory & Adams, 1998).

1.4. RELAÇÕES ENTRE APOPTOSE E INFECÇÕES VIRAIS

Os estudos sobre vírus têm trazido importantes contribuições para o conhecimento da regulação das vias apoptóticas. Têm-se observado íntima associação e coevolução de estratégias do hospedeiro, no sentido de desencadear resposta apoptótica como forma de defesa, evitando a disseminação viral pelo organismo, e de estratégias virais para bloquear esta resposta ou para replicar em uma célula apoptótica, tirando inclusive proveito da fragmentação celular para disseminação da progênie viral (Teodoro & Branton, 1997).

Ao entrar em uma célula, os vírus podem interferir diretamente em mecanismos do ciclo celular, direcionando a maquinaria da célula para a transcrição e tradução de seus genes e inibindo a transcrição de genes celulares, eventos por si só muito invasivos, passíveis de serem reconhecidos e gerar resposta apoptótica. Adicionalmente, a transcrição e tradução de genes virais também podem ser causas para o desencadeamento da resposta apoptótica pela célula hospedeira frente a uma infecção viral. Apesar destas hipóteses serem bastante consistentes, nenhum mecanismo de indução da apoptose por vírus foi totalmente esclarecido.

Frente à ameaça de interrupção do ciclo de infecção viral pela morte prematura da célula hospedeira, podem ocorrer três tipos gerais de estratégias empregadas por vírus animais para o prosseguimento do ciclo e produção de progênie viral. Duas destas estratégias têm sido observadas em diferentes vírus animais e a terceira é ainda hipotética. Estas estratégias seriam: 1 - uma multiplicação rápida, antes do comprometimento das funções celulares; 2 - a “aquisição” de genes inibidores da morte celular; 3 - o desenvolvimento de uma infecção “silenciosa”, capaz de evadir a resposta apoptótica celular (Koyama *et al.*, 1998).

A hipótese da infecção silenciosa se baseia na possibilidade da existência de infecções persistentes para vírus que não possuem genes antiapoptóticos e que se multiplicam de forma extremamente lenta, não havendo perturbações sérias à maquinaria celular passando, desta forma, despercebido pelos mecanismos de checagem (Koyama *et al.*, 1998).

A rápida multiplicação e grande produção de progênie viral mesmo em uma célula apoptótica é observada para vários vírus de RNA, para os quais se supõe ser mais difícil a “aquisição” de genes antiapoptóticos (Takizawa *et al.*, 1993; Hinshaw *et al.*, 1994; Koyama, 1995; Pekosz *et al.*, 1996; Koyama *et al.*, 1998).

A presença de genes antiapoptóticos tem sido mostrada para diversos tipos de vírus animais, principalmente para vírus de DNA, revelando ampla variedade de estratégias de interferência com as vias apoptóticas (Young *et al.*, 1997; Hardwick, 1998). Dentre esta multiplicidade de estratégias podem ser comentados alguns tipos de produtos de genes virais antiapoptóticos e seus efeitos:

- Homólogos de Bcl-2: Alguns tipos de proteínas codificadas por genes antiapoptóticos encontrados em adenovírus (Rao *et al.*, 1992), herpesvírus (Henderson *et al.*, 1993; Tarodi *et al.*, 1994) e African swine fever virus (ASFV) (Afonso *et al.*, 1996) apresentam estreita homologia de estrutura e função com a proteína celular Bcl-2, cuja função inibidora da apoptose encontra-se bem caracterizada. A proteína homóloga de Bcl-2 BHRF1 de Epstein-Barr virus pode causar inibição da diferenciação de células epidérmicas pela sua ação anti-apoptótica, sendo inclusive um fator de influência para o desenvolvimento de tumores relacionados a este vírus (Henderson *et al.*, 1993; Tarodi *et al.*, 1994).

- Inativadores de P53: Proteínas capazes de inativar as funções pró-apoptóticas do fator transcricional P53, o qual é ativado por diversos estímulos apoptóticos, são

codificadas por genes encontrados também em adenovírus (Debbas & White, 1993), human papilloma virus (HPV) (Scheffner *et al.*, 1990) e Simian virus 40 (SV40) (Linzer & Levine, 1979). A proteína E1B 55k de adenovírus e o antígeno T de SV40 interagem diretamente com P53, estabilizando-a e inibindo sua atividade de ativação transcricional (Mietz *et al.*, 1992; Yew & Berk, 1992), enquanto a proteína E6 do HPV leva a degradação de P53 através da via de ubiquitinação (Scheffner *et al.*, 1990).

- **Inibidores de caspases:** Inibidores de caspases foram descritos em baculovírus (Clem *et al.*, 1991) e cowpox virus (Ray *et al.*, 1992). A proteína Crma, codificada por cowpox virus, possui sítio de clivagem para caspases funcionando como um pseudo-substrato que forma um complexo estável com este tipo de enzima, a qual é responsável pela execução da apoptose, inativando-a. Foi verificado que Crma inativa especificamente a caspase-8, importante caspase iniciadora da via Fas (Dobbelstein & Shenk, 1996), além da caspase-1, cuja função na apoptose é ainda controversa.

- **Inibidores de vias mediadas por receptores TNF:** Inibidores que interagem com vias apoptóticas mediadas por receptores da família TNF são codificados por myxoma virus, um vírus imunodepressor (Macen *et al.*, 1996; Schreiber *et al.*, 1997), herpesvírus e poxvírus (Bertin *et al.*, 1997), adenovírus (Shisler *et al.*, 1997) e human cytomegalovirus (Zhu *et al.*, 1995). Os herpesvírus e os poxvírus codificam proteínas que possuem domínio homólogo ao motivo DED de proteínas adaptadoras FADD. Desta forma, estas proteínas podem se ligar tanto ao prodomínio DED de FADD quanto da procaspase-8, bloqueando o recrutamento desta procaspase e a sua ativação por proximidade induzida (Hu *et al.*, 1997, Thome *et al.*, 1997).

Além de inibir diretamente a apoptose, os vírus desenvolveram estratégias pelas quais conseguem tirar proveito de eventos apoptóticos, atrasando esta resposta de forma a

haver tempo suficiente para ocorrer a produção de progênie viral antes da destruição celular. Durante as fases finais da apoptose, quando fragmentos celulares envoltos por membrana intacta são fagocitados por macrófagos ou células vizinhas sem a indução de resposta inflamatória, os vírus presentes nos corpos apoptóticos podem ser beneficiados sendo disseminados para outras células de forma bastante segura, um mecanismo capaz de explicar a disseminação de vírus não-envelopados não-líticos (Teodoro & Branton, 1997).

A apoptose é também importante evento relacionado à patologia da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida). A perda dramática de células T CD4⁺ pode ser explicada pela indução inapropriada de apoptose em células não-infectadas, uma vez que somente uma pequena percentagem de células mononucleares do sangue periférico são ativamente infectadas, havendo inclusive a indução de apoptose em outros tipos celulares, como neurônios e células tronco da linhagem hematopoiética. De acordo com inúmeras evidências experimentais, a indução de apoptose pelo HIV em células T não-infectadas se processaria de duas formas básicas: a ligação de proteínas virais ENV aos receptores CD4 através de apresentação de antígeno induziria diretamente a apoptose nestas células e/ou induziria uma expressão exarcebada e liberação de Fas-ligante pelas células T não-infectadas, causando a indução de apoptose via receptor Fas (revisado por Young *et al.*, 1997).

Fato peculiar consiste na indução de apoptose em hemócitos da lagarta *Pseudoplusia includens* por infecção viral relacionada ao parasitismo pela vespa *Microplitis demolitor* (Hymenoptera: Braconidae) (Strand & Pech, 1995). Os ovos desta vespa são injetados na lagarta acompanhados de veneno e do polidnavírus *Microplitis demolitor* virus, sendo este último essencial para a sobrevivência da progênie do parasitóide. Sabe-se atualmente que o DNA de polidnavírus associados a vespas desta família integra-se ao seu genoma na forma

de provírus, sendo multiplicado apenas pela sua transmissão vertical (Gruber *et al.*, 1996; Savary *et al.*, 1997), havendo assim uma simbiose obrigatória entre o vírus e a vespa. A inoculação de *Microplitis demolitor* virus na hemolinfa de fases larvais de *Pseudoplusia includens* ou em hemócitos cultivados leva à ocorrência de apoptose em granulócitos, células mediadoras importantes para o processo de encapsulação, garantindo desta forma o sucesso da progênie da vespa e consequentemente do vírus (Strand & Pech, 1995).

1.5. REGULAÇÃO DA APOPTOSE POR BACULOVÍRUS

A percepção inicial de que baculovírus poderiam induzir apoptose em células hospedeiras deve-se ao surgimento casual de um mutante do baculovírus *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV), isolado pelo Dr. Roland Russnak (University British Columbia) durante a construção de um vetor de expressão (Clem & Miller, 1994a). Este mutante foi chamado *Annihilator* ("Aniquilador") por causar morte prematura, em torno de 12 horas pós-infecção (h p. i.), em células IPLB-SF-21 AE (SF-21) (Vaughn *et al.*, 1977), derivadas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae), as quais são permissivas ao vírus AcMNPV selvagem, não havendo produção de corpos de oclusão. A observação de que este vírus poderia se replicar normalmente em outra linhagem, TN-368 (Hink, 1970), derivada de *Trichoplusia ni*, viabilizou a produção de inóculo viral e a análise molecular deste vírus, além de fornecer incentivo adicional para o estudo do ponto de vista da especificidade de infecção (Clem & Miller, 1994a).

A observação de que células SF-21 infectadas com vAcAnh apresentavam *blebbing* na membrana plasmática, sendo posteriormente fragmentadas em corpos apoptóticos, adicionado da ocorrência de condensação, fragmentação nuclear e clivagem internucleossomal do DNA entre 6 e 12 h p. i., mostrou, de forma conclusiva, que a morte

prematura de células SF-21 infectadas pelo mutante vAcAnh se tratava de apoptose, constituindo o primeiro registro formal do fenômeno dentre os invertebrados (Clem, *et al.*, 1991; Clem & Miller, 1994a).

A observação da ocorrência de *blebbing* transiente em células SF-21 infectadas pelo baculovírus AcMNPV selvagem por volta de 12 h p. i. levou à suposição da existência de um gene de bloqueio à apoptose em AcMNPV, o qual poderia estar ausente em vAcAnh. Ensaio de *marker rescue*, onde eram realizadas cotransfecções do vírus vAcAnh com fragmentos de uma biblioteca genômica de AcMNPV em células SF-21, levaram à descoberta de um gene capaz de complementar a infecção, nomeado *p35*, presente no fragmento EcoRI-S de AcMNPV. O sequenciamento desta região em vAcAnh revelou uma deleção no gene *p35*, cujo fenótipo foi confirmado pela construção de um mutante contendo o gene *LacZ* em substituição a uma porção de *p35*, causando os mesmos efeitos que vAcAnh em SF-21 (Clem, *et al.*, 1991, Clem & Miller, 1994a).

O gene *p35* e homólogos foram descritos até o momento em somente três espécies de baculovírus: AcMNPV (Clem *et al.*, 1991), Bombyx mori nucleopolyhedrovirus (BmNPV) (Kamita *et al.*, 1993) e Spodoptera litoralis nucleopolyhedrovirus (SINPV) (Du *et al.*, 1999).

A proteína P35 de AcMNPV contém 299 aminoácidos, com massa molecular aproximada de 38,4 kDa, não possuindo sequência sinal ou motivos reconhecíveis, possuindo várias aglomerações de domínios carregados em sua sequência, passíveis de constituir pontos de interação proteína-proteína (Hershberger *et al.*, 1994, Bertin *et al.*, 1996; Clem *et al.*, 1996) (Fig. 6).

Vários estudos têm demonstrado a capacidade da proteína P35 de AcMNPV bloquear a apoptose em *Drosophila melanogaster* (Hay *et al.*, 1994), em *Caenorhabditis elegans* (Sugimoto *et al.*, 1994; Xue & Horvitz, 1995) e em vários tipos celulares de mamíferos, sob

estímulos variados (Rabizadeh *et al.*, 1993, Beidler *et al.*, 1995; Martinou *et al.*, 1995; Datta *et al.*, 1997; Mei *et al.*, 1997). A apoptose induzida por vários tipos de estímulos em linhagens de células de lepidóptera também é passível de inibição por P35 (Bose *et al.*, 1998; Lee & Chao, 1998; Sah *et al.*, 1999).

Ao mesmo tempo em que foi demonstrado o amplo espectro de inibição de P35, experimentos com proteínas isoladas *in vitro*, bem como em células intactas, mostraram que P35 possui a capacidade de inibir vários tipos de caspases, as quais são bastante conservadas dentre os animais, o que vem explicar o seu amplo espectro de inibição (Bump *et al.*, 1995; Bertin *et al.*, 1996; Xue & Horvitz, 1995, Zhou *et al.*, 1998).

P35 possui o sítio de clivagem para caspases Asp-Gln-Met-Asp₈₇-Gly (DQMD₈₇-G) exposto em uma das várias porções hidrofílicas da molécula (Fig. 6), constituindo um substrato que após a clivagem forma um complexo estável com a enzima, inativando-a. Substituições do resíduo Asp₈₄ (posição p4) causaram perda da inibição porém não suprimiram a capacidade de clivagem, mostrando que outras interações, juntamente com a clivagem, são responsáveis pela inibição (Bertin *et al.*, 1996).

Ensaio de *marker rescue* para identificação de genes de outros baculovírus capazes de complementar a infecção do baculovírus vAcAnh em células SF-21 resultaram na descoberta de um outro tipo de gene antiapoptótico presente em baculovírus, nomeado *iap* (inibidor de apoptose) (Crook *et al.*, 1993; Birnbaum *et al.*, 1994). Estudos posteriores revelaram que os genes *iap* formam uma extensa família, estando presentes em baculovírus, nematóides, insetos, mamíferos e leveduras (revisado por Uren *et al.* 1998), sendo o primeiro representante deste grupo de genes descrito em *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV) (Crook *et al.*, 1993), seguido de *Orgyia pseudotsugata* nucleopolyhedrovirus (OpMNPV) (Birnbaum *et al.*, 1994).

As proteínas IAP apresentam duas sequências-motivo de fácil identificação: na extremidade carboxi-terminal apresentam um motivo do tipo *zinc finger*, conhecido como *RING finger*, que pode estar ausente em alguns IAPs, e na extremidade N-terminal, uma ou até três sequências conhecidas com BIRs (*baculoviral IAP repeats*), presentes em todos os IAPs (Fig. 6). Estes dois motivos apresentam sequências características de ligação a metais, tendo sido mostrado experimentalmente sua ligação com zinco (revisado por Clem, 1997). Ao menos uma BIR é essencial para a atividade antiapoptótica destas proteínas, enquanto a importância do domínio RING finger para esta atividade pode variar de acordo com a IAP ou o estímulo apoptótico (revisado por Miller, 1999).

Uma vez que nem todas as proteínas que contêm o motivo BIR possuem atividade antiapoptótica, recentemente foi sugerido nomear estas proteínas como BIRPs (*baculoviral IAP repeat proteins*) ao invés de IAPs (Uren *et al.*, 1998).

Vários estudos têm demonstrado que as IAPs podem inibir a apoptose de duas formas: interferindo com mecanismos de ativação de caspases ou inibindo diretamente caspases ativadas (revisado por Miller, 1999).

IAPs codificadas por baculovírus têm apresentado capacidade de interferir com mecanismos de ativação de caspases (Seshagiri & Miller, 1997). IAPs de baculovírus e de *Drosophila melanogaster* interagem diretamente com moléculas envolvidas na indução de apoptose de *Drosophila* (Reaper, HID, GRIM e DOOM) expressas em células SF-21 (Harvey *et al.*, 1997; Vucic *et al.*, 1997; 1998).

D-IAP1, uma das duas IAPs de *Drosophila*, mostrou ser capaz de interagir diretamente e inibir caspases ativadas de *S. frugiperda*, *Drosophila* e mamíferos (Sf-caspase-1, drICE e caspase-3) expressas em células SF-21, enquanto D-IAP2 e Op-IAP1 não apresentaram esta atividade (Kayser *et al.*, 1998).

IAPs de mamíferos, por sua vez (X-IAP, c-IAP-1 e c-IAP2), apresentam propriedades de inibir diretamente caspases efetoras ativadas (caspase-3 e caspase-7) bem como de inibir a ativação de uma procaspase iniciadora (procaspase-9) (Deveraux *et al.*, 1997; 1998; Roy *et al.*, 1997). Além disso, c-IAP-1 e c-IAP-2 são capazes de inibir a apoptose em células de mamífero interferindo com a via sinalizadora TNF (Rothe *et al.*, 1995).

Desta forma, em algumas linhagens celulares de inseto a apoptose induzida pela infecção com vírus contendo mutações em *p35* ou por mecanismos não-virais pode ser bloqueada na presença de um baculovírus selvagem ou fragmento de DNA contendo os genes *p35* ou *iap* (Clem *et al.*, 1991; Crook *et al.*, 1993; Kamita *et al.*, 1993; Birnbaum *et al.*, 1994; Cartier *et al.*, 1994; Clem & Miller, 1994b; Hershberger *et al.*, 1994; Du *et al.*, 1999). Em outras linhagens de células de inseto, como TN-368 (Hink, 1970), mutantes de AcMNPV *p35*⁻ podem se replicar e produzir progênie normalmente sem a ocorrência de apoptose (Clem *et al.*, 1991, Hershberger *et al.*, 1992). Ainda em outros casos, como o de AcMNPV selvagem, apesar da presença de *p35* este vírus não é capaz de bloquear a apoptose em linhagens celulares específicas (Chejanovsky and Gershburg, 1995; Palli *et al.*, 1996b). Desta forma, a coevolução de mecanismos apoptóticos e de seu bloqueio nos diversos sistemas hospedeiro/baculovírus revela-se como um dos fatores determinantes do espectro de hospedeiros para cada baculovírus. (revisado por Clem, 1997).

Em comparação com os mecanismos de bloqueio da apoptose de baculovírus, parcialmente elucidados, os mecanismos de indução são completamente desconhecidos, havendo somente indícios do envolvimento da replicação do DNA viral e da expressão de genes *early*, como os transativadores *ie1* e *pe38* (Prihod'ko & Miller, 1996; 1999).

Apesar dos avanços moleculares nesta área de estudo, onde a identificação de proteínas inibidoras de apoptose trouxe grande repercussão para a elucidação de aspectos relacionados à regulação das vias apoptóticas e de sua conservação dentre os metazoários, pouco se conhece sobre a ultraestrutura das linhagens de células de inseto em processo de apoptose induzido por baculovírus ou outro mecanismo, havendo apenas um estudo utilizando microscopia eletrônica de transmissão para células FPMI-CF-203 (CF-203) (Sohi *et al.*, 1993) infectadas pelo vírus AcMNPV (Palli *et al.*, 1996b) e outro estudo desta mesma linhagem sob efeito de inibidores de transcrição e tradução (Palli *et al.*, 1996a). O primeiro trabalho (Palli *et al.*, 1996b) apresenta dados ultraestruturais de células CF-203 em apoptose induzida por infecção com AcMNPV, onde estas células apresentaram típica condensação nuclear, não sendo porém muito bem evidenciada a formação de corpos apoptóticos, sugerindo, de modo geral, um aspecto necrótico para estas células. Já no estudo ultraestrutural desta mesma linhagem sob efeito de inibidores de transcrição e tradução (Palli *et al.*, 1996a), condensação cromatínica, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos são bem documentados, havendo grande semelhança com o conjunto fenotípico da apoptose de vertebrados.

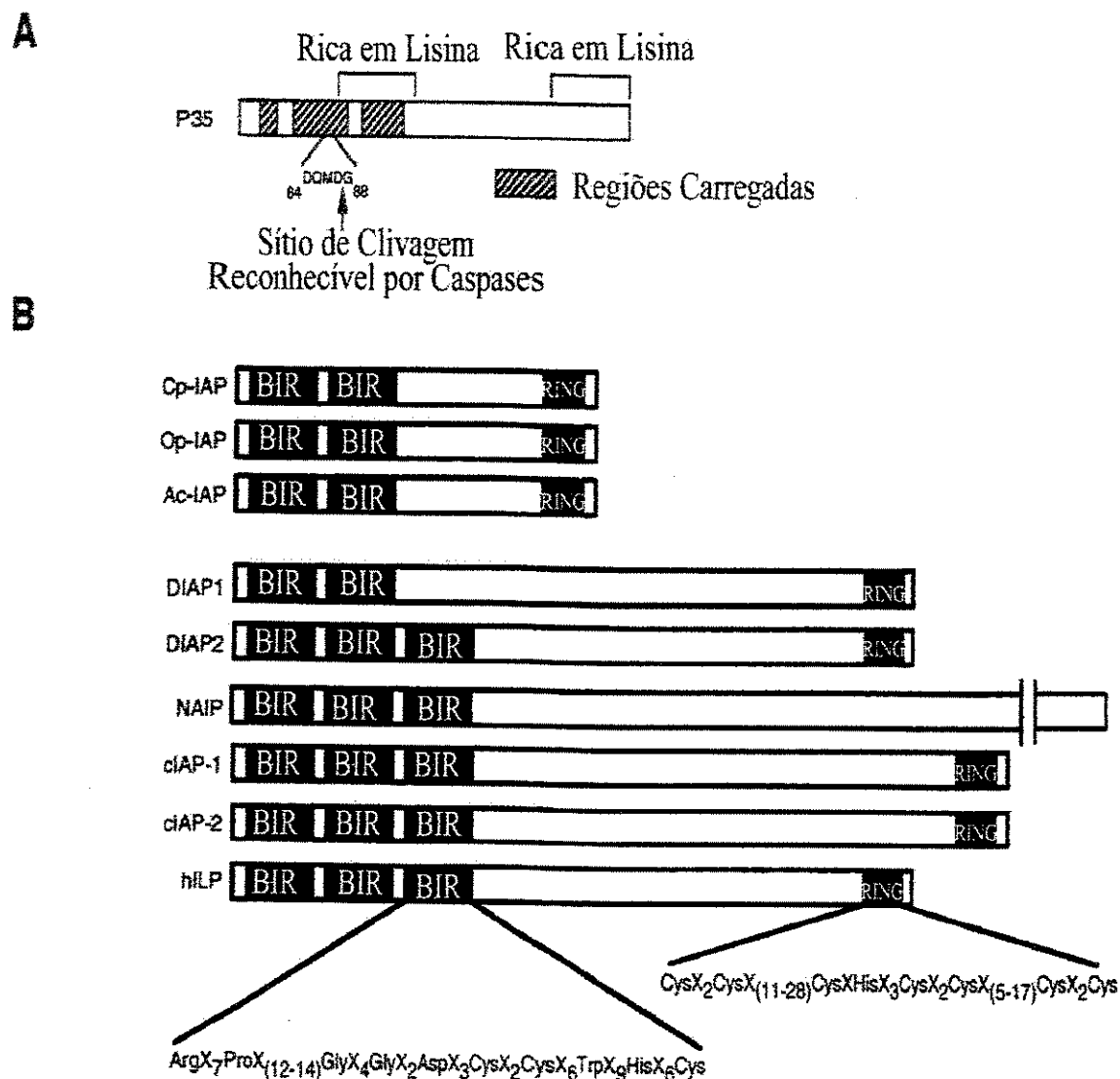


FIGURA 6. P35 e IAPs. A- Características de P35 de AcMNPV. Esta proteína não possui motivos reconhecíveis, possuindo em sua sequência regiões ricas em lisina e três regiões carregadas, sendo que em uma delas está localizado o sítio de clivagem por caspases, estando representados os aminoácidos próximos a este sítio. B- Representação de alguns homólogos conhecidos de IAP. IAPs de baculovirus (Cp-IAP; Op-IAP e Ac-IAP) são menores, possuindo sempre dois BIRs, enquanto os IAPs celulares (DIAP1, DIAP2, NAIP, cIAP-1, cIAP-2 e hILP) são maiores, possuindo três BIRs, com exceção de DIAP1. As sequências consenso de BIRs e RING finger são representadas, onde X significa qualquer aminoácido (Adaptado de Clem, 1997).

1.6. CONTEXTO E OBJETIVOS

A biologia molecular do baculovírus *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) e o seu comportamento infeccioso em lagartas hospedeiras e em cultura de células de insetos vêm sendo estudados no laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília.

Durante a construção de um baculovírus AgMNPV recombinante contendo o gene da β -galactosidase de *Escherichia coli* foi obtido além de vírus recombinantes e não recombinantes, um mutante, cuja infecção à linhagem celular permissiva derivada de *Anticarsia gemmatalis*, UFL-AG-286 (Sieburth & Maruniak, 1988a), induz a morte prematura destas células. A infecção de outra linhagem celular, derivada de *Trichoplusia ni*, BTI-Tn-5B1-4 (Tn-5B) (Granados *et al.*, 1994) com este mutante, ao contrário do ocorrido com UFL-AG-286, resultou em ciclos de infecção completos, com a visualização de poliedros no núcleo da maioria das células a partir de 48 horas pós-infecção (h p. i.), o que possibilitou a multiplicação e produção de inóculo viral.

Frente a este fenômeno, juntamente com o fato de que nesta década inúmeros artigos de grande impacto relacionados à regulação da apoptose por baculovírus têm sido produzidos, gerando interessantes contribuições para a compreensão da regulação das vias apoptóticas, de sua conservação dentre os seres vivos e das relações coevolutivas entre vírus e hospedeiros, tornou-se atrativa a possibilidade de investigar este novo baculovírus mutante, nomeado vApAg (vírus AgMNPV indutor de apoptose).

Desta forma, este trabalho tem por objetivo caracterizar a citopatologia induzida pelo vírus vApAg em células UFL-AG-286, que entram em morte celular prematura, e em células Tn-5B, onde ocorre a replicação normal do vírus. De forma comparativa, pretende-se também investigar a citopatologia induzida por um vírus mutante conhecido, vP35del,

derivado de *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) (Clem *et al.*, 1994), em células UFL-AG-286.

Com este estudo pretende-se:

- Investigar se a morte prematura induzida pelo mutante vApAg em células UFL-AG-286 tem características relacionadas à apoptose;
- Investigar se há a ocorrência de fragmentação oligonucleossomal do DNA em células infectadas, fenômeno relacionado à apoptose;
- Através de caracterizações estruturais e ultraestruturais verificar as semelhanças e diferenças desta morte com a morte induzida por um baculovírus de outra espécie, que não possui o gene antiapoptótico *p35*, sabidamente incapaz de bloquear a apoptose induzida em várias linhagens celulares; no sentido, inclusive de fazer inferências sobre a natureza da possível mutação ocorrida em vApAg;

Acredita-se que este estudo inicial de vApAg seja um caminho para estudos adicionais que levem à compreensão das estratégias empregadas pelo vírus AgMNPV para infectar de forma bem-sucedida seus hospedeiros, de suas relações coevolutivas com estes e relações filogenéticas com outros baculovírus.

2. ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

A realização deste trabalho de tese resultou na produção do seguinte artigo, o qual foi aceito para publicação em outubro de 1999.

- 2.1 **Silveira, E. B.**, Ribeiro, B. M. & Báó, S. N. Morphological Studies of Apoptosis in Insect Cells Infected with vApAg, an *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus Mutant. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 31(4), 1999.

Journal of
**Submicroscopic
Cytology**
and
Pathology

EDITOR-IN-CHIEF
BACCIO BACCETTI
Istituto di Biologia Generale
Via E. Pontola 62
I-53100 Siena Italy

ASSOCIATE EDITORS
GIULIO GAMBANI
Department of Pathology
1 Rue Michel Servet
CH-1211 Geneva Switzerland

VICTOR E. GOULD
Department of Pathology
Rush Medical College
60612 Chicago Ill. USA

Siena, July 1st 1999

Prof. Sonia N. Bão,
Departamento de Biologia Celular,
Universidade de Brasília, 70919-970,
Brasília-DF, Brazil

Dear Dr. Bão,

we are pleased to inform you that your manuscript entitled "Morphological studies of apoptosis in insect cells infected with vApAg, an *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus mutant", revised by the Editorial Board, has been accepted for publication in the Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology in its present version.

It will be published in vol. 31, n. 4, October 1999 of the Journal.

Sincerely

Laura Neri



Morphological studies of apoptosis in insect cells infected with vApAg, an *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus mutant.

E.B. SILVEIRA^{1,2}, B.M. RIBEIRO² and S.N. BÁO.²

¹Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas-SP, Brasil;

²Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, 70919-970, Brasília-DF, Brasil

KEY WORDS *Anticarsia gemmatalis* - *apoptosis* - *baculovirus* - *electron microscopy* - *insect* - *morphology*

RUNNING TITLE *Induction of apoptosis by an AgNPV mutant*

MAILING ADDRESS: Dr. Sônia Nair Bão, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, 70919-970, Brasília, DF, Brasil; e-mail: snbao@unb.br

SUMMARY

An AgNPV mutant (vApAg) induces premature cell death in UFL-AG-286 cells, permissive to AgNPV, and replicates normally in another cell line, BTI-Tn-5B1-4 (Tn-5B). Light and electron microscopy studies were carried out to describe, comparatively, the infection process and apoptosis induction by vApAg in UFL-AG-286 and Tn-5B cells and by the virus vP35del, derived from AcNPV, in UFL-AG-286 cells. We have shown that UFL-AG-286 cells die by apoptosis when infected with vApAg and vP35del, presenting endomembranes dilation, surface blebbing and apoptotic bodies formation, however, only vP35del was able to induce chromatin condensation. In spite of the massive apoptosis induced by vApAg in UFL-AG-286 cells, this virus achieved some viral progeny production because, in this case, apoptosis is delayed. For UFL-AG-286 cells infected with vP35del it does not happen because apoptosis is faster. This fact gives rise to many ultrastructural differences in the way that apoptosis is carried out in these two systems, including the differences related to chromatin condensation. We also showed that vApAg completes a normal cycle of infection in Tn-5B cells, without apoptosis. The morphological observations were confirmed by the occurrence of DNA fragmentation into oligonucleosomal fragments for UFL-AG-286 cells infected with vP35del, early on infection and with vApAg, late on infection. These results suggests that the mutation in vApAg occurred in a way that blocking of apoptosis could be achieved early on infection, which does not happen in the case of vP35del, where the antiapoptotic gene *p35* has a deletion that completely prevents P35 protein activity, which was demonstrated to be essential for blocking of apoptosis and virus survival in UFL-AG-286 cells.

INTRODUCTION

Programmed cell death (PCD) is a self-destruction phenomenon; directed by genetic pathways in response to a wide range of stimuli that occurs in multicellular as well as in unicellular organisms (for review, see Ameisen, 1998). In animals this process is very important for a perfect morphogenesis, homeostasis of cell number, defense against pathogens and other more specific events like immune response (for review, see Wyllie, 1997).

The term "apoptosis" (Kerr *et al.*, 1972) originally refers to the typical morphological changes of the cells associated to PCD, best characterized in mammals cells, that are: chromatin margination and condensation, cytoplasm condensation, cell shrinkage, surface blebbing, nuclear disassembly and cell fragmentation into apoptotic bodies. This phenomenon can be associated with DNA cleavage in high molecular weight and (in most, but not all apoptotic cells) oligonucleosomal fragments (Oberhammer *et al.*, 1993).

Virus (and specifically, baculovirus) studies in the last years have provided important clues to the understanding of some aspects of the apoptotic pathways because of the close association and coevolution of host cell apoptotic strategies to block virus spread and viral strategies to prevent apoptosis or to achieve progeny production in an apoptotic cell (for review, see Teodoro and Branton, 1997).

Pioneering studies of IPLB-SF-21 cells (cell line derived from the lepidopteran *Spodoptera frugiperda*) (Vaughn *et al.*, 1977) infected with the mutant "Annihilator" (vAcAnh), derived from *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcNPV), provided the first formal demonstration of apoptosis in invertebrates (Clem *et al.*, 1991).

In contrast to a few number of structural studies about apoptosis in insect cells induced by baculoviruses or other stimuli (Palli *et al.*, 1996a; 1996b), several molecular studies have been carried out in this decade reporting the discovery of baculovirus antiapoptotic genes, its cellular homologues and mechanisms of action in diverse organisms (for review, see Clem, 1997), contributing to the understanding of apoptotic pathways and regulatory mechanisms conservation among different groups of organisms.

Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus (AgNPV) has been used in a large scale as a biological control agent of the soybean pest *A. gemmatalis* for over 20 years (Moscardi, 1998). In despite of this, very little is known about its molecular biology (Johnson and Maruniak, 1989), host-pathogen interactions (Pombo *et al.*, 1998) and specificity (Castro *et al.*, 1997, Grasela and McIntosh, 1998).

During the construction and isolation of an AgNPV recombinant virus (Ribeiro, personal communication), we obtained a mutant (vApAg) that induces premature cell death in a cell line derived from *A. gemmatalis* (UFL-AG-286) (Sieburth and Maruniak, 1988a), permissive to AgNPV, and replicates normally in another cell line derived from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) (Tn-5B) (Granados *et al.*, 1994).

To better understand and characterize morphological events related to baculovirus infection/apoptosis occurrence in insect cells, we have used light and electron microscopy to study three systems: UFL-AG-286 and Tn-5B cells infected by vApAg and UFL-AG-286 cells infected by another mutant, vP35del (Clem *et al.*, 1994). This virus, which is derived from AcNPV, has a deletion in the antiapoptotic gene *p35* (similarly to the mutant vAcAnh) and lost the ability to block apoptosis in some cell lines, consisting in an interesting model for comparison.

MATERIALS AND METHODS

Cells and viruses

UFL-AG-286 and Tn-5B cells were maintained in TC-100 medium (GIBCO-BRL Life Technologies, Grand Island, N.Y.) supplemented with 10% fetal bovine serum at 27°C. AgNPV isolate 2D (Maruniak, 1989) was propagated in UFL-AG-286 cells, vApAg was propagated in Tn-5B cells and the recombinant AcNPV lacking *p35*, vP35del, was obtained from Dr. Lois Miller (University of Georgia) and propagated in TN-368 cells (Hink, 1970) maintained in TNM-FH medium (GIBCO-BRL Life Technologies, Grand Island, N.Y.) supplemented with 10% fetal bovine serum at 27°C. The inoculums were tittered by the TCID₅₀ method, following the protocol described by O'Reilly *et al.* (1992).

Light Microscopy

UFL-AG-286 and Tn-5B cells (1×10^6) were seeded into 60mm culture plates and infected with vApAg (M.O.I. of 10). UFL-AG-286 cells were also infected with vP35del in the same way as described. The cells were then incubated for 1h at room temperature and the virus inoculum was replaced with fresh medium (zero time post-infection). The plates were then observed and photographed after various times post-infection (p.i.) in an inverted microscope Zeiss (Axiovert 100).

Transmission Electron Microscopy

UFL-AG-286 and Tn-5B cells were infected as described above and after 12, 24, 36 and 48 hours (for UFL-AG-286 and Tn-5B cells infected with vApAg) or 9, 11, 13 and 16 hours (for UFL-AG-286 cells infected with vP35del) these cells were washed in PBS pH 6.4, resuspended and fixed in 2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde buffered in 0.1M sodium cacodylate buffer pH 6.4 with 5% sucrose and submitted to a centrifugation at 750g for 5 min. The pellet was washed in the same buffer and postfixed in 1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferricyanide, 5mM CaCl₂ in 0.1M sodium cacodylate buffer pH 6.4. Then, the cells were contrasted in bloc with 0.5% uranyl acetate, dehydrated through an ascending acetone series and embedded in Spurr resin. The ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and observed in a transmission electron microscope Jeol 100C or Zeiss Omega 912.

Scanning Electron Microscopy

The insect cells were infected as described above and at different times post-infection (12, 24 and 48 h for UFL-AG-286 and Tn-5B cells infected with vApAg or 9, 11 and 16 h for UFL-AG-286 cells infected with vP35del) were washed and resuspended in 0.1M sodium cacodylate buffer pH 6.4 with 5% sucrose, attached to poly-L-lysine-coated glass coverslips and immersed in fixative (2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde buffered in 0.1M sodium cacodylate pH 6.4, 5% sucrose) for 30 min, at room temperature. Primary fixation was followed by rinsing in the same buffer and post-fixation for 30 min in 1% osmium tetroxide. Then, the cells were dehydrated through an ascending acetone series, critical-

point-dried in CO₂, coated with gold in a sputter coater and observed in a scanning electron microscope JEOL JSM 840 at an accelerating voltage of 10.0 kV.

DNA extraction and Agarose Gel Electrophoresis

UFL-AG-286 cells (0.5×10^6) were seeded into 35mm plates and infected with vApAg, vP35del and AgNPV (M.O.I. of 10). Tn-5B cells (0.5×10^6) were infected with vApAg in the same way. After 12, 24, 36, 48, 60 and 72 h p.i. the cells were submitted to DNA extraction following the protocol described by Aljanabi & Martinez (1997). In brief, cells were centrifuged at 1300g for 10 min, the pellet resuspended in 400µl of salt lysis buffer (0.4M NaCl, 10mM Tris - HCl pH 8.0, 2mM EDTA pH 8.0) and 1mg/ml proteinase K, 2% SDS and incubated at 50°C for 1 h. Then, 400µl of 6M NaCl was added, the tubes were vortexed gently and centrifuged at 16.000g for 20 min to separate precipitated proteins. To the supernatant it was added equal volume of isopropanol, the tubes were maintained at -20°C for 1h, and centrifuged at 16.000g for 20 min to precipitate DNA. The pellet was washed with 70% ethanol, air dried and resuspended in 50µl T.E. (10mM Tris - HCl, 1mM EDTA pH 8.0). Ribonuclease A was added in a final concentration of 40µg/ml. DNA concentration was estimated by electrophoresis in 0.8% agarose gel with λ phage DNA of known concentration (GIBCO-BRL). Approximately 1 µg of each sample was loaded on a 2% agarose gel, run at 40V and visualized by staining with ethidium bromide.



RESULTS

Light Microscopy

Direct observations on the inverted microscope were done to follow the infection progress and cell death in insect cells. In UFL-AG-286 cells infected with vApAg or vP35del viruses it was observed the occurrence of blebbing at the cells surface which is characteristic of cell fragmentation in apoptosis. In these two systems the number of blebbing or fragmented cells increased along the time, culminating with the fragmentation of the majority of the cells into apoptotic bodies. This process happened faster for vP35del than vApAg and because of the significant difference in the rate of cell death for the system UFL-AG-286/vP35del, we have made morphological analysis of this system using differentiated periods of time post-infection (p.i.).

UFL-AG-286 cells, which are fusiform in general (Fig. 1A), became round in shape by 9 h p.i. with vP35del. At this time p.i. some cells were presenting surface blebbing (Fig. 1C). At 16 h p.i., almost all of the cells were fragmented or with surface blebbing (Fig. 1D). UFL-AG-286 cells infected with vApAg became round in shape around 12 h p.i. (Fig. 1E), started to present some surface blebbing between 12 and 24 h p.i. (data no shown) and a generalized death by 48 h p.i., with some occlusion bodies being visualized into cell nuclei or apoptotic bodies at this time p.i. (Fig 1F).

Tn-5B cells, which present a softer fusiform aspect in comparison to UFL-AG-286 cells (Fig 1B), became round in shape around 12 h p.i. with vApAg (Fig. 1G) and culminated with the evident formation of occlusion bodies inside the nucleus of the majority of the cells by 48 h p.i. (Fig. 1H), which represents a complete viral infection cycle.

Electron Microscopy

Observations on the transmission electron microscope showed ultrastructural details of the changes induced by the viruses in the insect cells culture and allowed the characterization of the infection process in the three systems. As complementary data, the scanning electron microscopy allowed visualizing the cell surface changes induced by the viral infections.

UFL-AG-286 mock-infected cells are generally rich in surface projections (Figs. 2A and 5A), however, at 12 h p.i. with vApAg, these cells presented its projections reduced in number and size presenting a round and smooth surface aspect (Figs. 2B and 5C). The nucleus became hypertrophied, acquiring more regular limits, and the heterochromatin portions appeared localized at the nucleus periphery (Fig. 2B). At 24 h p.i. it became evident the viral assembly in a mature virogenic stroma at the center of the nucleus, the envelopment of viral particles in a peripheral region of this, the ring zone (Fig. 2C), and the budding of nucleocapsides in vesicles derived from the nuclear envelope through the cytoplasm (Fig. 2D). At this time begun the appearance of fibrillar aggregates, probably derived from the protein P10, that were more common in the cytoplasm but that also occurred in the nucleus (Fig. 2D). At 36 h p.i. it was possible to see polyhedrin accumulation and the formation of some occlusion bodies inside the nucleus (Fig. 2E). The endomembranes became dilated, conferring a vacuolated aspect to the cytoplasm, and the fibrillar aggregates became larger (Fig. 2E). It was also possible to note surface blebbing, with the first detachment of peripheral portions of the cytoplasm (Fig. 2E). At 48 h p.i. the majority of the cells presented extensive blebbing (Figs. 2F and 5D) or were completely broken into apoptotic bodies which could include or not nuclear portions (usually having occlusion bodies) (Fig. 2G). The fibrillar aggregates became fused and larger, occupying a great volume of the cell,

segregating organelles or fragmenting the nucleus (Fig. 2F). Generally after the detachment of cytoplasmic portions, the intact nucleus or large fragments of this break into smaller bodies. It was not detected chromatin condensation in any time during the course of the experiment and the heterochromatin patches detected in mock and initial-infected cells became scarce along the infection.

In the case of UFL-AG-286 cells infected with vP35del, we detected some similarities and significant differences related to cellular changes induced by the viral infection in comparison to the system previously described. In despite of some reduction in the surface cell projections and the change to a general round aspect early on infection (Figs. 3A and 5E), it was observed that the nucleus did not present significant change in shape, remaining with irregular limits (Figs. 3A to 3C). The heterochromatin portions were also moved to the nucleus periphery but presented a more compact aspect, with edges better defined, suggesting some chromatin condensation associated to apoptosis (Figs. 3A to 3D). As the system previously described, it was observed endomembrane dilation that appears around 11 h p.i. (Fig. 3B). The membranous network generated by endomembranes dilation appeared to contribute for modeling and detachment of apoptotic bodies (Figs. 3B to 3D), some of these containing small nuclear pieces with condensed chromatin (Fig. 3D). It was not observed any signs of viral particles assembling, occlusion bodies formation or fibrillar aggregates accumulation as described for UFL-AG-286 cells infected with vApAg.

Tn-5B cells infected with vApAg developed a normal infection process, culminating with the massive production of occlusion bodies in the majority of the cells at late times p.i.. Tn-5B cells mock-infected presented some surface projections, not so long and numerous as in UFL-AG-286 cells (Figs. 4A and 5B). At 12 h p.i. the surface projections are reduced in size and number (Fig. 5G) and the nucleus became hypertrophied, presenting an immature

virogenic stroma at its center (Fig. 4B). At 24 h p.i. the cells presented accumulation of fibrillar aggregates in the cytoplasm, envelopment of nucleocapsides at the ring zone, that presented discrete membrane vesicles, and budding of some of these nucleocapsides into vesicles derived from the nuclear envelope through the cytoplasm (Fig. 4C). At 36 and 48 h p.i. the cells presented a smooth surface (Fig. 5H), nuclei containing large number of occlusion bodies (Fig. 4D) and a ring zone rich in double-membrane vesicles, which probably are involved in the envelopment of nucleocapsides. The fibrillar aggregates became larger and best visualized in the nucleus and cytoplasm (Fig. 4D).

DNA fragmentation analysis

In control systems, which did not present apoptosis (UFL-AG-286/AgNPV and Tn-5B/vApAg), there was no occurrence of DNA degradation at any time p.i. (Fig. 6 A and B). For the system UFL-AG-286/vApAg, DNA-fragmented oligonucleosome ladders were detected only at later times (after 36 h p.i.) (Fig. 6C) but for UFL-AG-286/vP35del it started from 12 h p.i. (Fig. 6D), confirming that the later system presents an earlier apoptosis and suggesting a possible higher rate of DNA degradation when comparing with the first system.

DISCUSSION

This work describes, comparatively, the infection process and cell death induction by the AgNPV mutant virus vApAg in UFL-AG-286 and Tn-5B cells and by the virus vP35del, derived from AcNPV, in UFL-AG-286 cells. We have shown that UFL-AG-286 cells die by apoptosis when infected with vApAg and vP35del. We also showed that vApAg completes a normal cycle of infection in Tn-5B cells, without the occurrence of apoptosis. In despite of the massive apoptosis in UFL-AG-286 cells triggered by vApAg, this virus do replicate and produce some progeny virus, which does not happen when the same cell line is infected by the virus vP35del.

Baculoviruses have two kinds of known antiapoptotic genes that act at different phases of the apoptotic pathway: *p35* and *iap*. The *p35* or homologous genes were described only in baculoviruses (Clem *et al.*, 1991; Kamita *et al.*, 1993; Du, 1999), while *iap* genes, first described for *Cydia pomonella* granulosis virus (CpGV) (Crook *et al.*, 1993), has many cellular homologues in mammals and insects (for review, see Clem, 1997).

In some insect cell lines, apoptosis induced by infection with *p35* mutant viruses or non-viral mechanisms can be prevented by the presence of the wild-type virus or a DNA fragment containing *p35* or *iap* genes (Clem *et al.*, 1991; Crook *et al.*, 1993; Kamita *et al.*, 1993; Birnbaum *et al.*, 1994; Cartier *et al.*, 1994; Clem and Miller, 1994; Hershberger *et al.*, 1994; Du *et al.*, 1999). In others cell lines, like TN-368, an AcNPV *p35* mutant can replicate and produce progeny normally, without the occurrence of apoptosis (Clem *et al.*, 1991, Hershberger *et al.*, 1992). In other cases, despite presenting *p35*, the wild-type virus AcNPV can not block apoptosis of specific cell lines (Chejanovsky and Gershburg, 1995; Palli *et al.*, 1996a).

So, the relationships and coevolution between the apoptotic pathways of different hosts and the specific strategies used by diverse baculovirus to block apoptosis may have important role in baculovirus host range determination (for review see Clem, 1997).

In our study, Tn-5B cells were shown to be resistant to apoptosis induction by vApAg, developing a normal route of infection, as described for AcNPV in insect cell lines derived from *Spodoptera frugiperda* and *Trichoplusia ni* (for review see Willians and Faulkner, 1997). Replication of vApAg in this cell line provided us with normal yields of budded virus (Ribeiro, personal communication) which comes in agreement with observations of resistance to apoptosis in other *Trichoplusia ni* cell line, TN-368 (Clem and Miller, 1993; Prikhod'ko and Miller, 1996, Clem, 1997) and the normal infectivity of AcNPV *p35* mutants in *T. ni* larvae in comparison to wild-type virus, which is much lower for *S. frugiperda* larvae (Clem and Miller, 1993; Clem *et al.*, 1994).

The virus vP35del trigger apoptosis in UFL-AG-286 cells, with almost all the cells being dead by 16 h post-infection (p.i.). Since the expression of baculovirus very late genes starts by 18 h p.i. (for review, see Lu and Miller, 1997), we could not detect late events on infection such as formation of occlusion bodies and accumulation of fibrilar aggregates. Its possible that some production of budded virus occurs, as showed in SF-21 cells infected with *p35* mutants (Hershberger *et al.*, 1992; Clem and Miller, 1993), but, at the ultrastructural level, any traces of virogenic stroma or nucleocapsids assembling were not detected. So, as UFL-AG-286 is a permissive cell line to AcNPV (Sieburth and Maruniak, 1988b) these results can indicate that the *p35* gene is essential for blocking of apoptosis and completion of infection by AcNPV in UFL-AG-286 cells.

The events observed in the system UFL-AG-286/vApAg led us to suppose that apoptosis, in this case, could have been partially blocked or delayed, in a way that some virus particles

were able to complete the infection cycle before the commitment of vital cell functions, presenting characteristic cytopathological changes related to baculovirus infection (for review see Willians and Faulkner, 1997). It suggests that the putative mutation occurred in vApAg should be related to a possible antiapoptotic gene (probably related to *p35* or *iap*) or genes encoding factors that regulates its expression. Blocking of apoptosis could be achieved by the vApAg virus early on infection, probably by the expression of enough active antiapoptotic protein. Late on infection, however, the expression of the antiapoptotic protein could not be sufficient to counteract the apoptotic cell response and the cell dies after some viral particle cycle completion. It's known (Castro, personal communication) that the tittle of budded virus achieved in this system is somewhat reduced, so there is some adverse effect on viral progeny by the late apoptosis.

Chromatin condensation is a typical event in apoptosis, best described in vertebrates (Arends and Wyllie, 1991). We observed some chromatin condensation for UFL-AG-286/vP35del, which does not happen for UFL-AG-286/vApAg. This could be related to the viral replication and assembling occurrence in the last system, which should, in some way, prevent chromatin condensation. In spite of this, the results obtained by electrophoresis showed that some DNA fragmentation occurs at late times p.i. (after 36 h p.i). For the UFL-AG-286/vP35del system, as the apoptosis is faster, there is no impediment for chromatin condensation and an earlier DNA degradation occurs .

The mode of cell fragmentation appears to be influenced by the fibrillar agregates in the system UFL-AG-286/vApAg, as this structure occupy a great volume of the cells, surely generating some mechanical stress in the cytoplasm and nucleus. There is some evidence for a role of the P10 protein in cell lysis and spread of occlusion bodies late on infection, but its role remains not well understood (Willians *et al.*, 1989). Since this protein is not produced in

the UFL-AG-286/vP35del system, the cell fragmentation should proceed in a different manner, probably with a stronger influence of dilated endomembranes, consisting of points for the detachment of cytoplasm parts.

Then, ultrastructural differences in the way that apoptosis is carried out for UFL-AG-286/vApAg and UFL-AG-286/vP35del are closely related to the occurrence of a late interrupted infection cycle in the first system (because apoptosis is delayed) and an early interrupted infection in the later (because apoptosis is faster).

Ultrastructural data about apoptosis in insect cell lines are rare. Palli and co-workers (1996a) described the ultrastructural changes in FPMI-CF-203 cells (cell line derived from *Choristoneura fumiferana*) (Sohi *et al.*, 1993) during apoptosis induced by AcNPV infection. They showed that the death induced by AcNPV in FPMI-CF-203 cells presented unusual characteristics for a classical apoptotic cell, being similar to necrosis. However, the apoptosis induced in this same cell line by transcription and translation inhibitors (Palli *et al.*, 1996b) showed typical apoptotic events as chromatin condensation and cell fragmentation into apoptotic bodies being, in a general aspect, very similar to the two systems described in this work, with special focus in the particular occurrence of endomembranes dilation.

In spite of morphological pioneering studies of Palli and co-workers (1996a; 1996b), this is the first detailed description of ultrastructural changes in insect cells culture during the course of apoptosis induced by two different mutant viruses. Now, very urging questions about the specific mechanisms of this cellular changes, the putative mutation occurred in vApAg and its implications in the apoptotic pathways in cell lines and insects remains and are subject of current and future studies.

FIGURE 1*a-h* Inverted light microscopy micrographs of insect cell culture plates. (*a*) UFL-AG-286 mock-infected cells. (*b*) Tn-5B mock-infected cells. (*c-d*) UFL-AG-286 cells infected with vP35del, 9 and 16 h post-infection (p.i) respectively. (*e-f*) UFL-AG-286 cells infected with vApAg, 12 and 48 h p.i. respectively. (*g-h*) Tn-5B cells infected with vApAg, 12 and 48 h p.i. respectively. Arrows: cells presenting surface blebbing. Arrowheads: cells presenting occlusion bodies in their nuclei. Bars = 30 μ m.

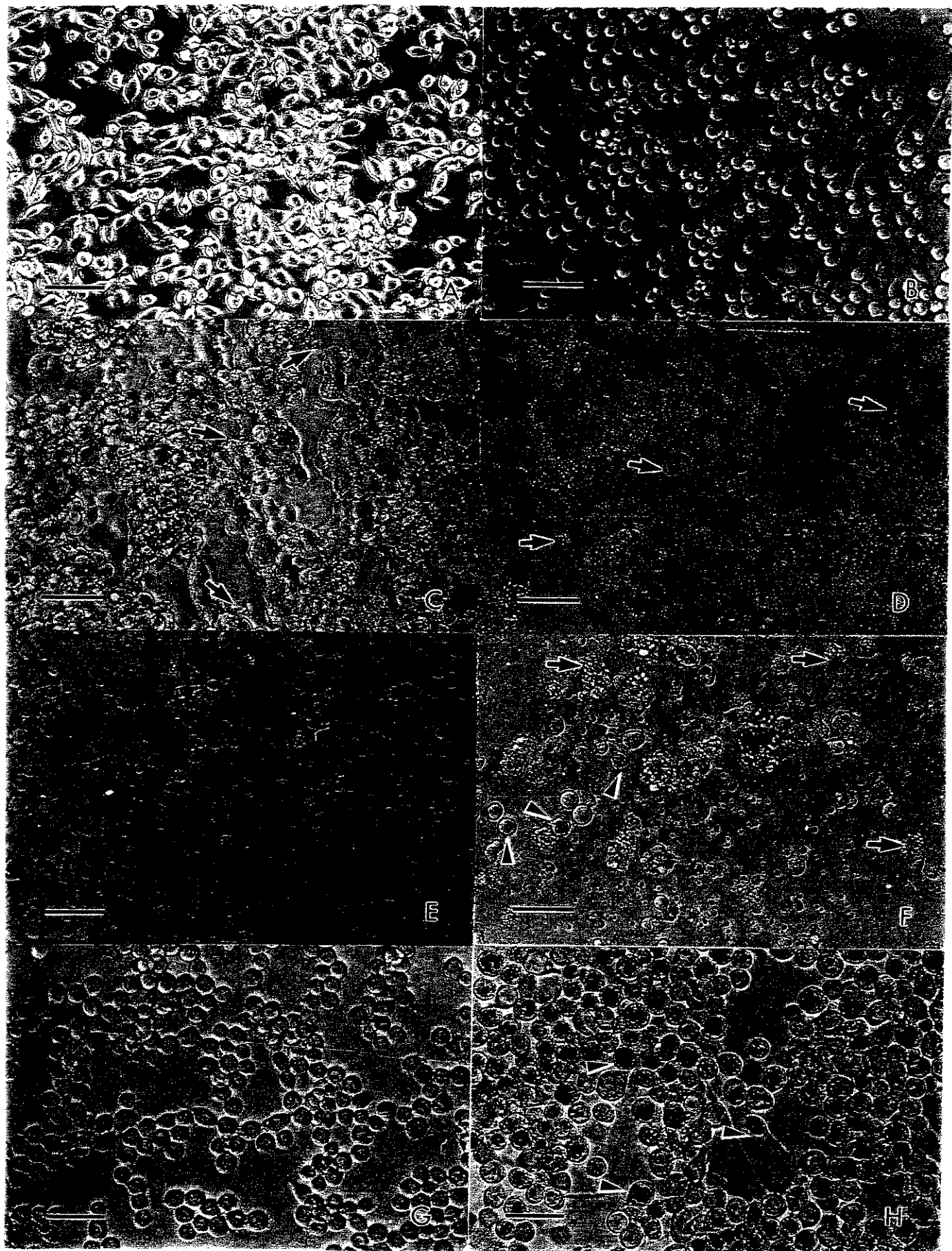


FIGURE 2*a-g* Transmission electron micrographs of the system UFL-AG-286 cells/vApAg.

(*a*) Mock-infected cell. Arrows: surface projections, n: nucleus, which is rich in heterochromatin patches (*). (*b*) Partial view of cytoplasm (c) and nucleus (n) of a cell 12 h p.i. The nucleus appears hypertrophied and the heterochromatin patches (*) were moved to the nuclear periphery. (*c*) Cell nucleus (n) 24 h p.i., presenting a virogenic stroma (vs) and the ring zone (rz). Arrows: viral assembling. Arrowheads: viral enveloping in membranous vesicles. Inset: Detail from viral enveloping. (*d*) Viral budding (arrow) from the nucleus (n) to cytoplasm (c) and its transport in a vesicle derived from the nuclear envelope (arrowhead) at 24 h p.i. fa: fibrilar agregate. (*e*) Partial view of cytoplasm (c) and nucleus (n) 36 h p.i. Occlusion bodies (*), viral enveloping (arrow) and a fibrilar aggregate (fa) can be seen into the nucleus. The cytoplasm presents a membranous network of dilated endomembranes (mn), fibrilar agregates (fa) and initial surface blebbing (arrowhead). Inset: Detail of initial surface blebbing. (*f*) A cell 48 h p.i. presenting extensive blebbing (arrowheads), membranous network (arrows) and a fibrilar agregate (fa) in its center, between two nuclear fragments (n) containing occlusion bodies (*). (*g*) General view of a cell disintegrated into apoptotic bodies 48 h p.i. Arrow: nuclear fragment containing occlusion bodies (*). Bars = 1 μ m (*a-c*, *e*, inset *e*, *f*); 0.2 μ m (inset *c*); 0.5 μ m (*d*); 3 μ m (*g*).

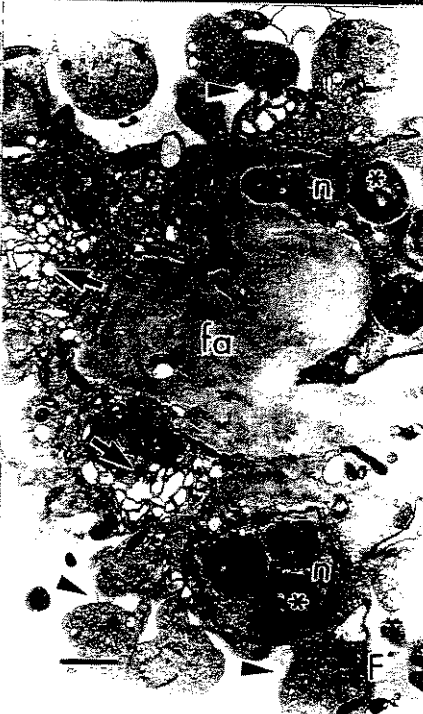
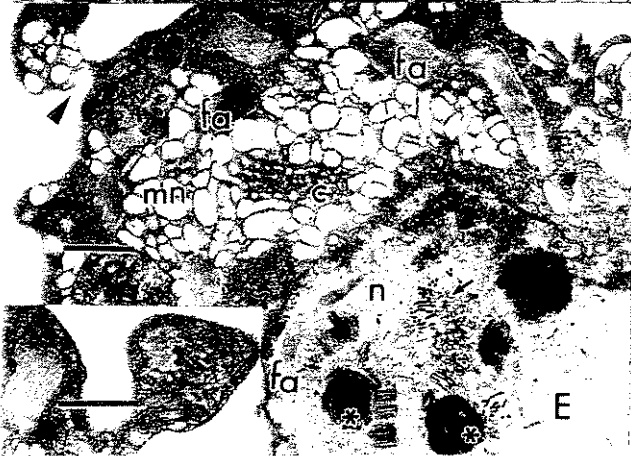
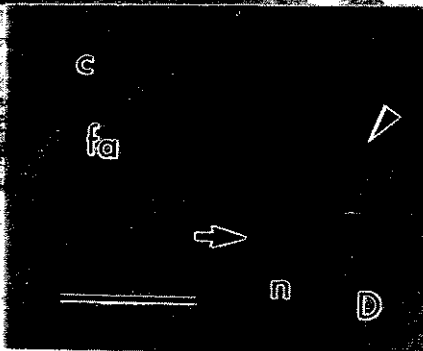
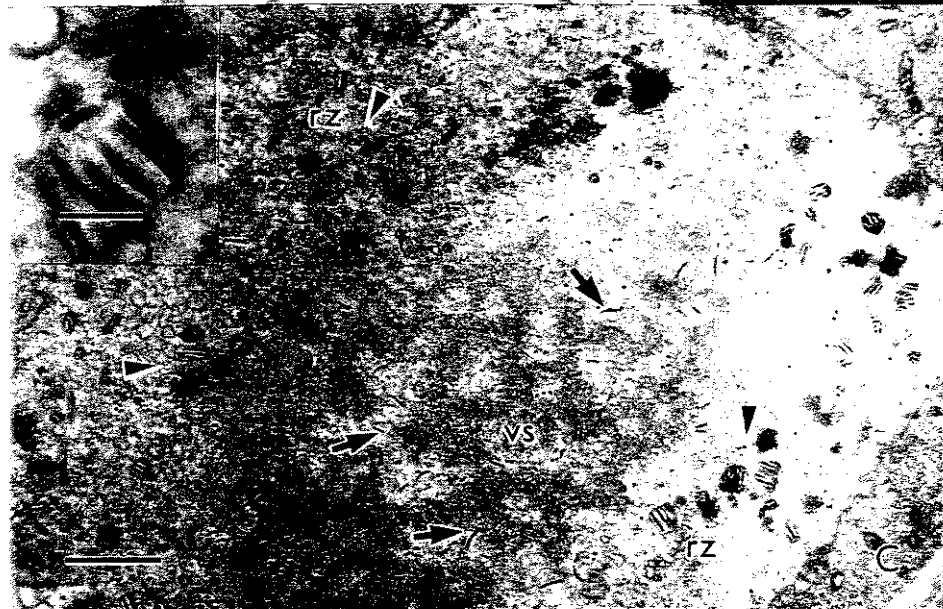
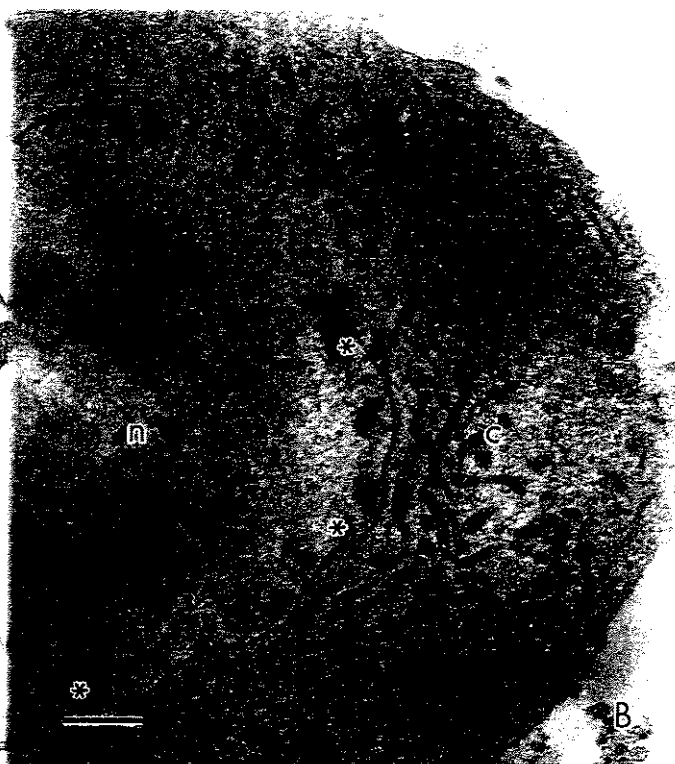
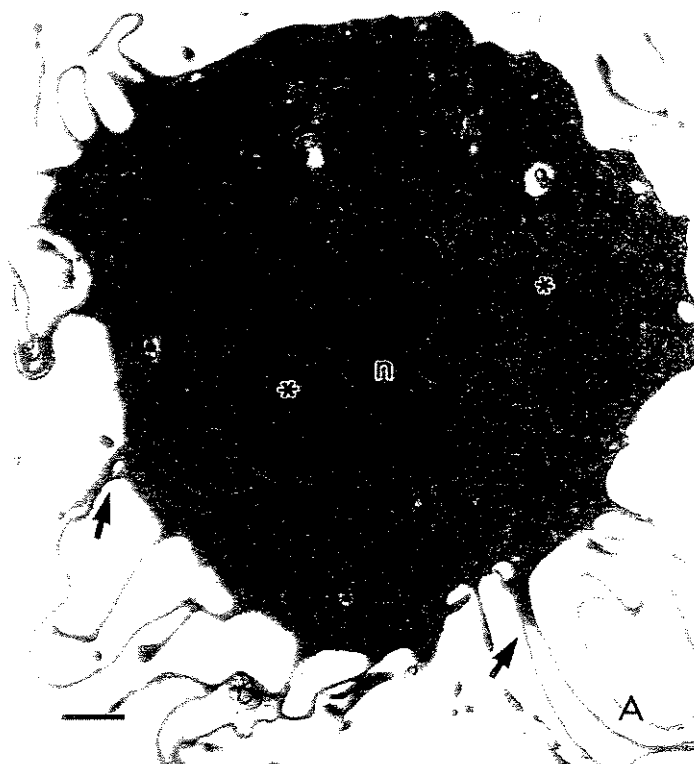


FIGURE 3*a-d* Transmission electron micrographs of the system UFL-AG-286 cells/vP35del. (*a*) After 9 h p.i. the cell still presents some surface projections (arrows). n: nucleus containing peripheral heterochromatin patches (*). (*b*) A cell 11 h p.i. presenting large vacuoles derived from dilated endomembranes (v) and a nucleus (n) rich in well-defined heterochromatin patches (*). (*c*) A cell after 13 h p.i. showing extensive surface blebbing (arrows), and the nucleus (n) with peripheral heterochromatin patches (*). (*d*) General view of a disintegrated cell at 16 h p.i. Apoptotic bodies (arrows) and membranous network (*) can be seen. n: nuclear fragments into apoptotic bodies. Bars = 1 μ m.

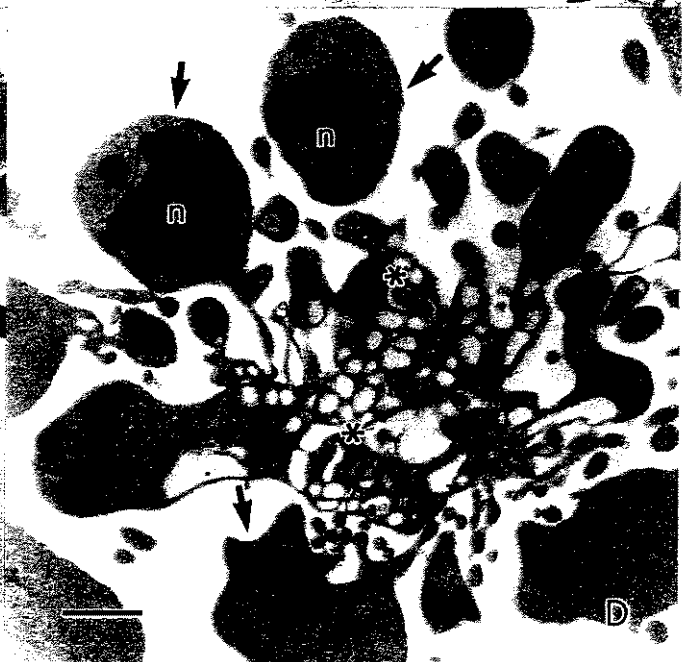
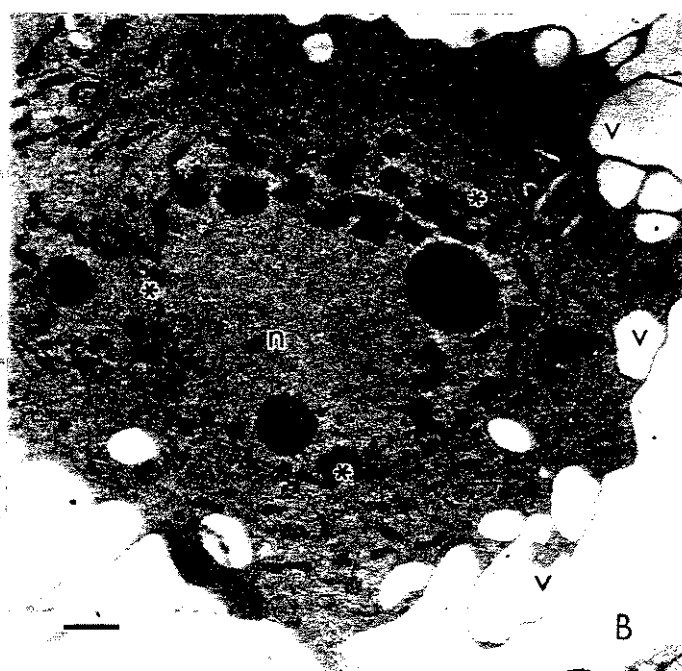
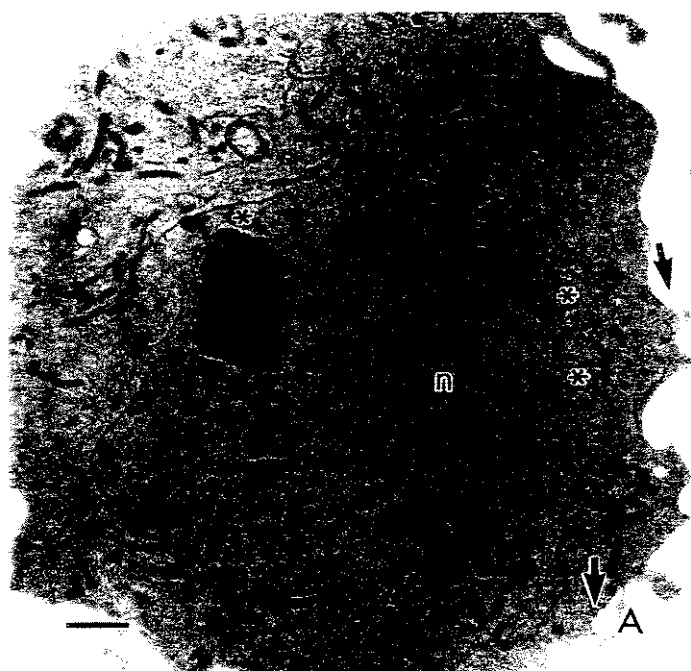


FIGURE 4*a-d* Transmission electron micrographs of the system Tn-5B cells/vApAg. (*a*) Mock-infected cells. Arrows: surface projections, n: nucleus, (*): heterochromatin. (*b*) Nuclear view of a cell 12 h p.i. showing an immature virogenic stroma (vs) and peripheral heterochromatin patches (*). (*c*) Nucleus of a cell 24 h p.i. with virogenic stroma (vs) presenting viral assembling (arrows) and a ring zone (rz) presenting discrete viral enveloping (arrowheads). Inset: Detail of viral budding from the nucleus (n) to the cytoplasm (*c*) into a transport vesicle derived from the nuclear envelope (arrow). (*d*) General view of a cell 36 h p.i. The nucleus presents virogenic stroma (vs), ring zone rich in membranous vesicles (rz), fibrillar aggregate (fa) and occlusion bodies (*). The cytoplasm is rich in fibrillar aggregates (fa). Inset: Detail from the occlusion of enveloped nucleocapsides in the ring zone. Bars = 1 μm ; 0.3 μm (inset *c*); 0.5 μm (inset *d*)

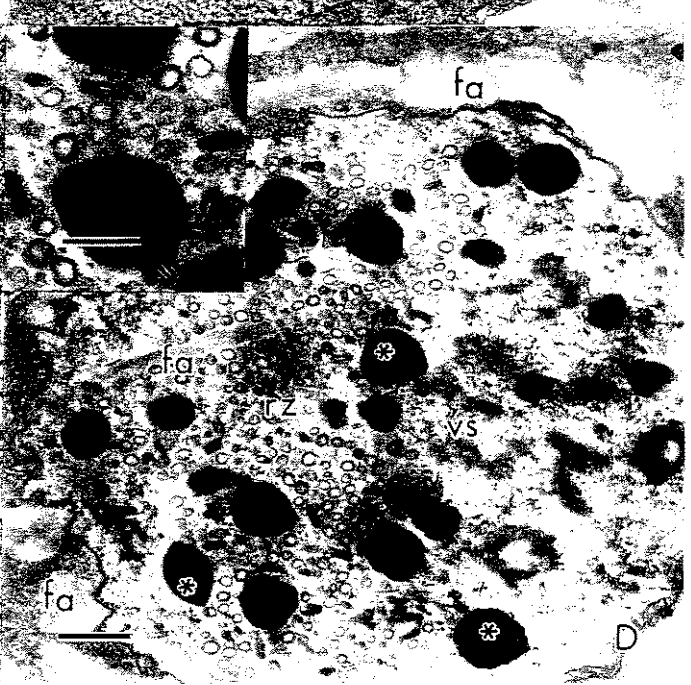
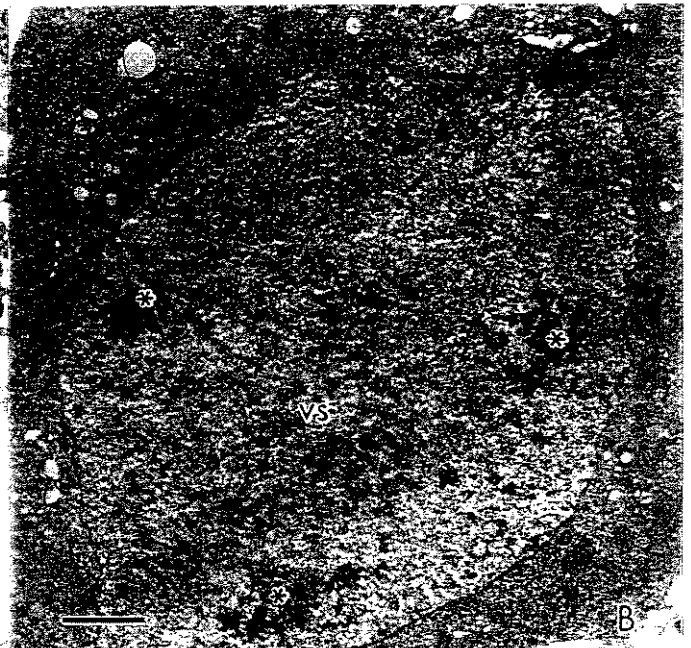
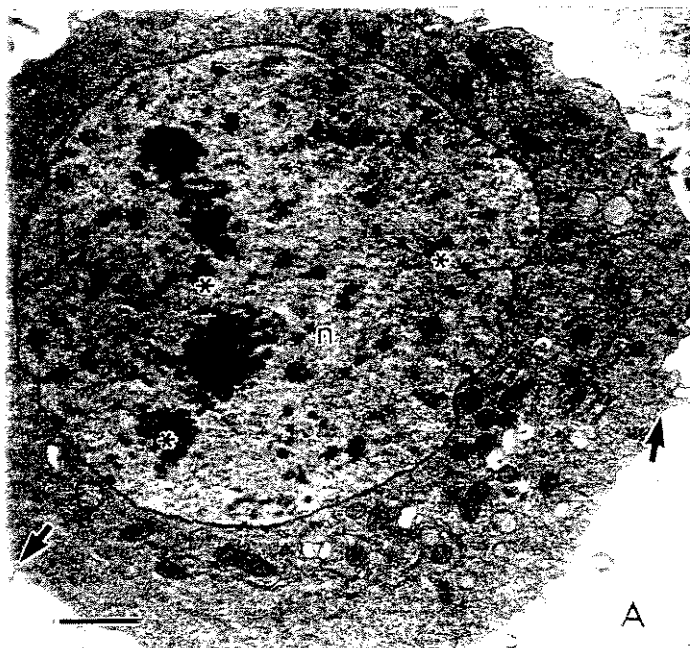
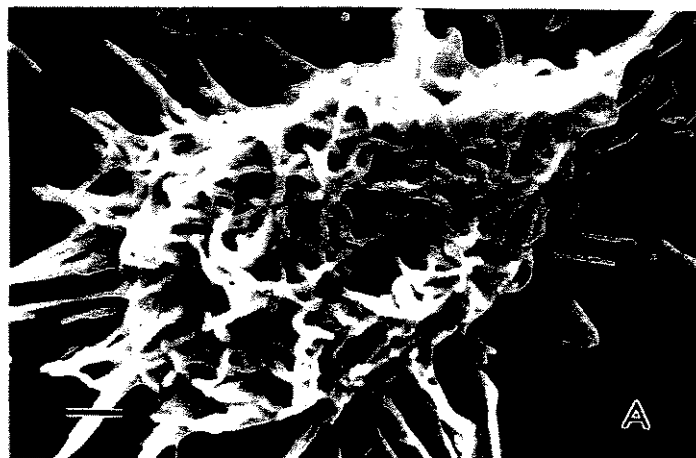
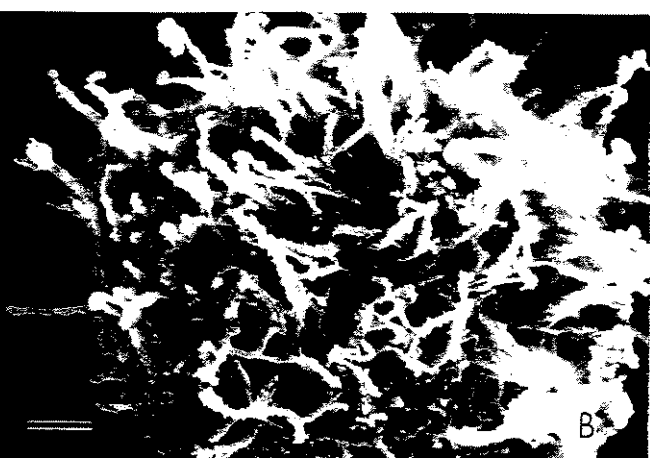


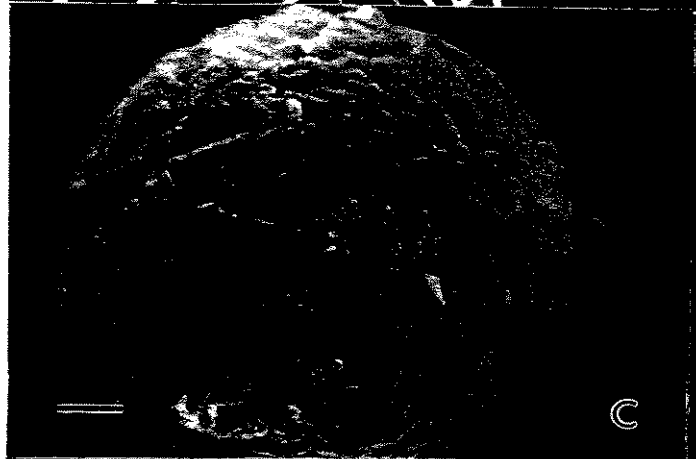
FIGURE 5*a-h* Scanning electron micrographs of insect cell cultures. (*a*) UFL-AG-286 mock-infected cell. (*b*) Tn-5B mock-infected cell. (*c-d*) UFL-AG-286 cells infected with vApAg, 12 and 48 h p.i. respectively. (*e-f*) UFL-AG-286 cells infected with vP35del, 9 and 16 h p.i. respectively. (*g-h*) Tn-5B cells infected with vApAg, 12 and 48 h p.i. respectively. Bars = .1 μ m.



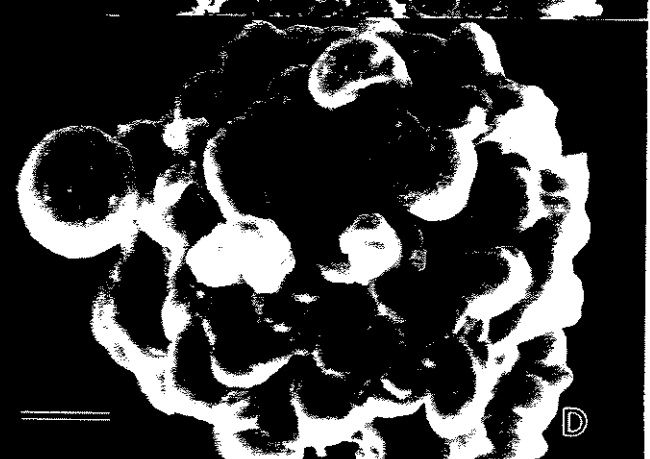
A



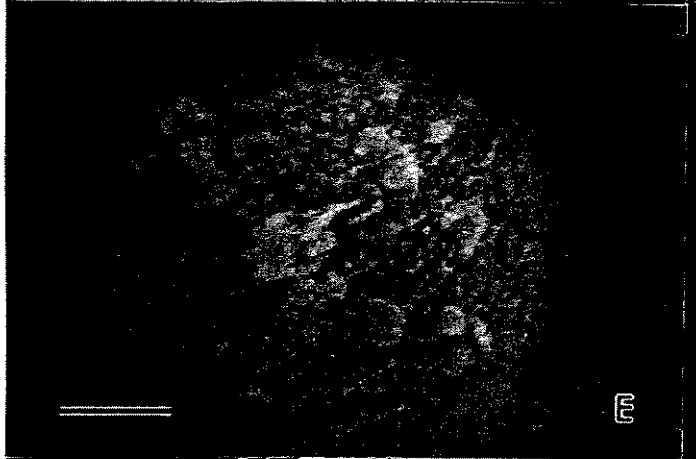
B



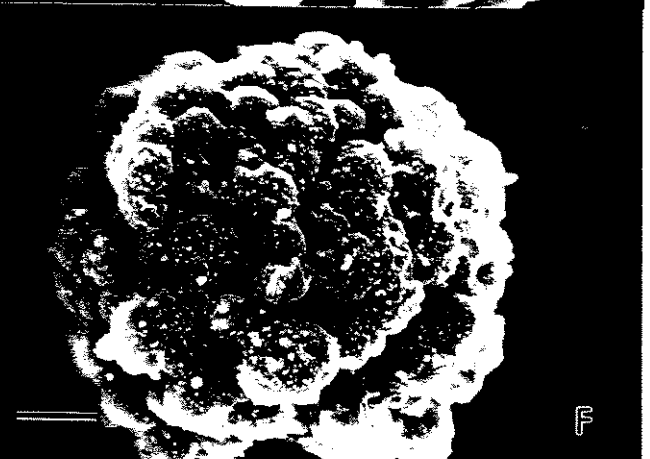
C



D



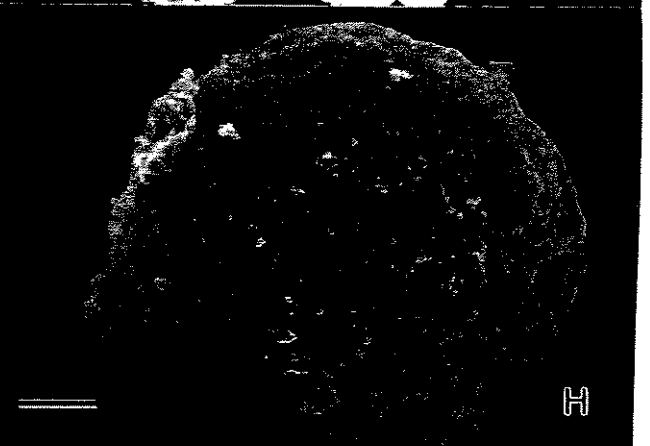
E



F

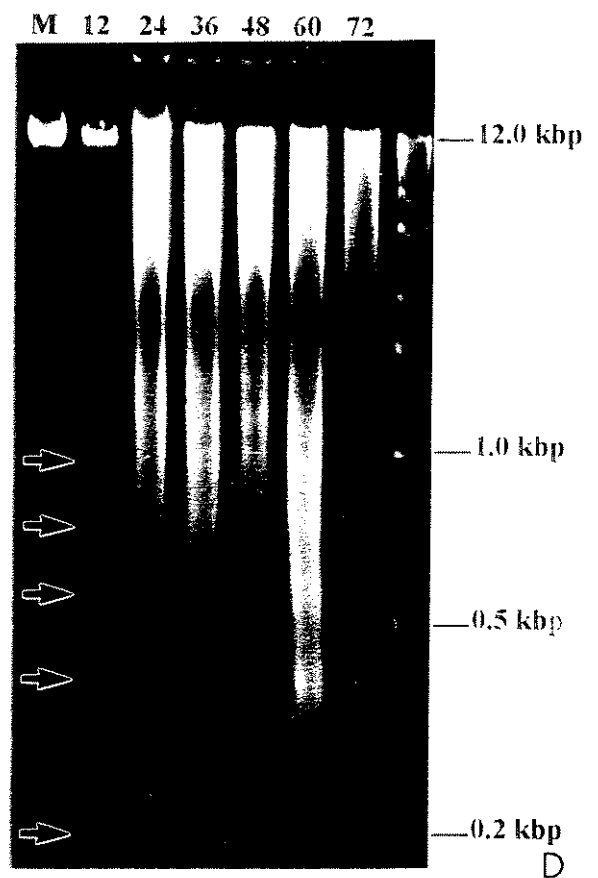
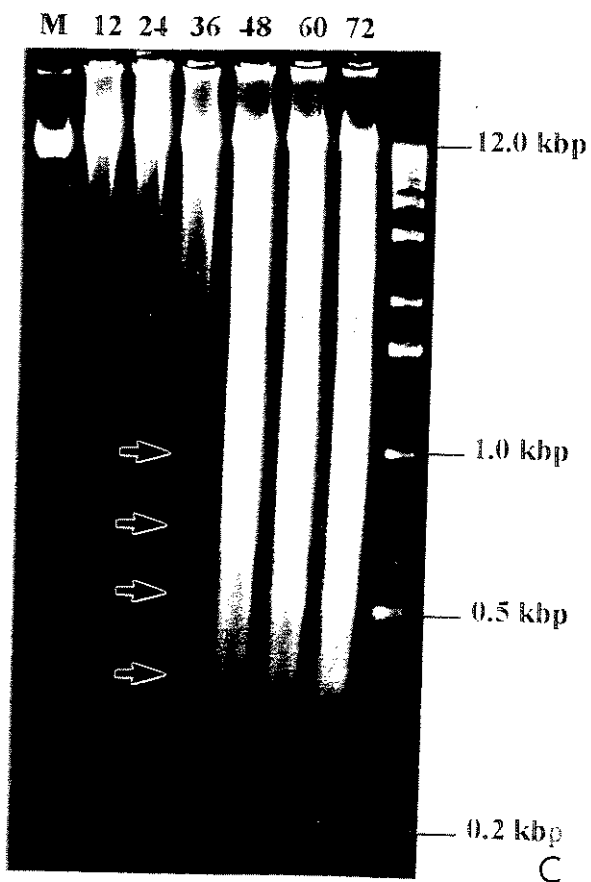
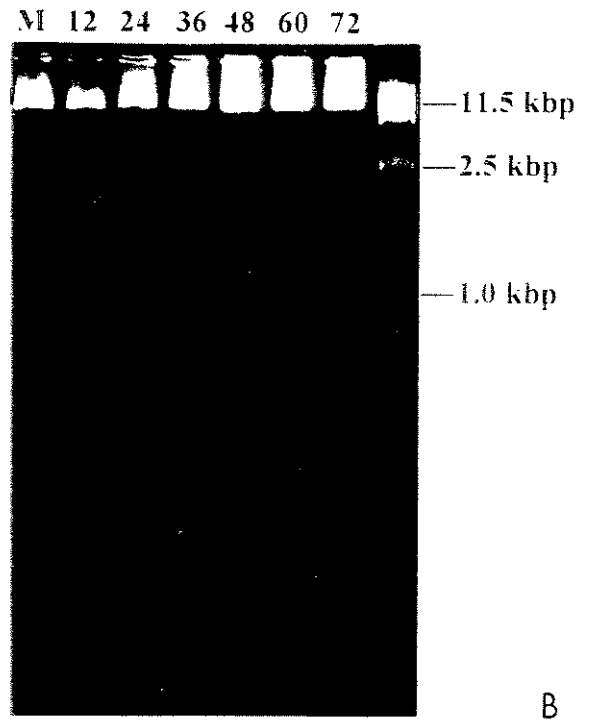
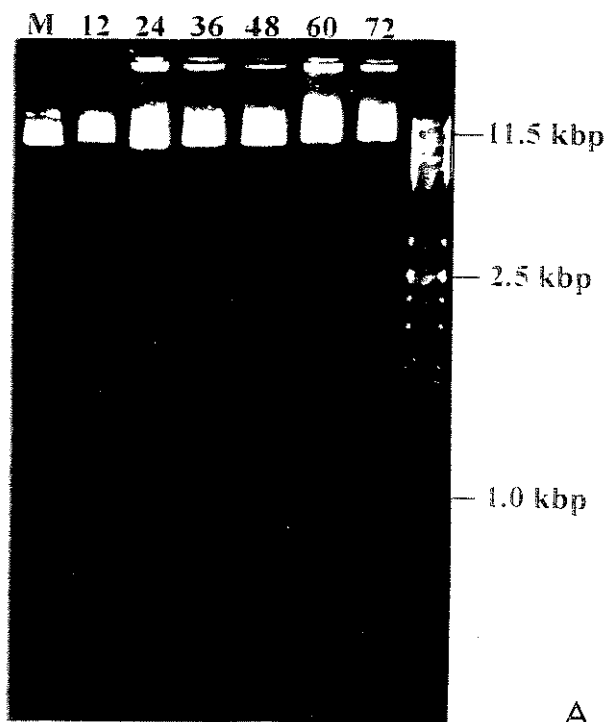


G



H

FIGURE 6*a-d* Insect cells DNA analysis by electrophoresis in 2% agarose gels. In each lane was loaded approximately 1µg of DNA extracted from mock or infected cells at a specific time post-infection. (a) UFL-AG-286 cells infected with AgNPV. (b) Tn-5B cells infected with vApAg. (c) UFL-AG-286 cells infected with vApAg. (d) UFL-AG-286 cells infected with vP35del. Arrows indicate oligonucleossomal fragments. M: mock-infected cells. Numbers above lanes indicate h p.i.



ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Miss R. Falcão of EMBRAPA-CENARGEN for the use of the Zeiss Omega 912 transmission electron microscope and Dr. Lois Miller for providing vP35del virus. This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) and Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (Pronex).

REFERENCES

- ALJANABI S.M. and MARTINEZ I., 1997. Universal and rapid salt extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 4692-4693.
- AMEISEN J.C., 1998. The evolutionary origin and role of programmed cell death in single-celled organisms: A new view of executioners, mitochondria, host-pathogen interactions, and the role of death in the process of natural selection. In: When cells die: A comprehensive evaluation of apoptosis and programmed cell death. Lockshin R. A., Zakeri Z. and Tilly J. L. eds., Wiley-Liss, Inc., pp. 03-56.
- ARENDS M.J. and WYLLIE A.H., 1991. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, **32**, 223-254.
- BIRNBAUM M.J., CLEM, R.J. and MILLER L.K., 1994. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with cys/his sequence motifs. *J. Virol.*, **68**, 2521-2528.

- CARTIER J.L., HERSHBERGER P.A. and FRIESEN P.D., 1994. Suppression of apoptosis in insect cells stably transfected with baculovirus *p35*: Dominant interference by N-terminal sequences *p35*¹⁻⁷⁶. *J. Virol.*, **68**, 7728-7737.
- CASTRO M.E.B., SOUZA M.L., ARAUJO S. AND BILIMORIA S., 1997. Replication of *Anticarsia gemmatilis* nuclear polyhedrosis virus in four lepidopteran cell lines. *J. Invertebr. Pathol.*, **69**, 40-45.
- CHEJANOVSKY H. and GERSHBURG E., 1995. The wild-type *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus induces apoptosis of *Spodoptera littoralis* cells. *Virology*, **209**, 519-525.
- CLEM R.J., 1997. Regulation of programmed cell death by baculoviruses. In: The Baculoviruses. Miller L.K. ed., Plenum Press, New York, pp. 237-266.
- CLEM R.J., FECHHEIMER M. and MILLER L.K., 1991. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science*, **254**, 1388-1390.
- CLEM R.J. and MILLER L.K., 1993. Apoptosis reduces both the in vitro replication and the in vivo infectivity of a baculovirus. *J. Virol.*, **67**, 3730-3738.
- CLEM R.J. and MILLER L.K., 1994. Control of programmed cell death by the baculovirus genes *p35* and *iap*. *Mol. Cell Biol.*, **14**, 5212-5222.
- CLEM R.J., ROBSON M. and MILLER L.K., 1994. Influence of infection route on the infectivity of baculovirus mutants lacking the apoptosis-inhibiting gene *p35* and the adjacent gene *p94*. *J. Virol.* **68**, 6759-6762.
- CROOK N.E., CLEM, R.J. and MILLER L.K., 1993. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J. Virol.*, **67**, 2168-2174.

- DU Q., LEHAVI D., FAKTOR O. QI Y. and CHEJANOVSKY N., 1999. Isolation of an apoptosis suppressor gene of the *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. *J. Virol.*, **73**, 1278-1285.
- GRANADOS R.R., GUOXUN L., DERSKSEN A.C.G. and McKENNA K.A., 1994. A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.*, **64**, 260-266.
- GRASELA J.J. and McINTOSH A.H., 1998. *In vitro* and *in vivo* host range of *Anticarsia gemmatilis* multiple nuclear polyhedrosis virus. *In Vitro Cell.Dev. Biol.*, **34**, 79-83.
- HERSHBERGER P.A., DICKSON J.A. and FRIESEN P.D., 1992. Site-specific mutagenesis of the 35-kilodalton protein gene encoded by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: Cell line-specific effects on virus replication. *J. Virol.*, **66**, 5525-5533.
- HERSHBERGER P.A., LaCOUNT D.J. and FRIESEN P.D., 1994. The apoptotic suppressor P35 is required early during baculovirus replication and is targeted to the cytosol of infected cells. *J. Virol.*, **68**, 3467-3477.
- HINK W.F., 1970. Established insect cell line from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Nature*, **226**, 466-467.
- JOHNSON D.W. and MARUNIAK J.E., 1989. Physical map of *Anticarsia gemmatilis* nuclear polyhedrosis virus (AgMNPV-2) DNA. *J. Gen. Virol.*, **70**, 1877-1883.
- KAMITA S.G., MAJIMA K. and MAEDA S., 1993. Identification and characterization of the p35 gene of the *Bombix mori* nuclear polyhedrosis virus that prevents virus-induced apoptosis. *J. Virol.*, **67**, 455-463.
- KERR J.F.R., WYLLIE A.H. and CURRIE A.R., 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, **26**, 239-257.

- LU A. and MILLER L.K., 1997. Regulation of baculovirus late and very late gene expression. In: The Baculoviruses. Miller L.K. ed., Plenum Press, New York, pp. 237-266.
- MARUNIAK, J. E., 1989. Molecular biology of *Anticarsia gemmatalis* baculovirus. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **84**: 107-111.
- MOSCARDI F., 1998. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. In: Controle microbiano de insetos. Alves S. B. ed., FEALQ, Piracicaba, pp. 509-540.
- OBERHAMMER F.A., WILSON J.W., DIVE C., MORRIS I.D., HICKMANN J.A., WAKELING A.E., WALKER P.R. and SIKORSKA M., 1993. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kilobase fragments prior to or in absense of internucleosomal fragmentation. *EMBO J.*, **12**, 3679-3684.
- O'REILLY D.R., MILLER L.K. and LUCKOW V.A., 1992. Baculovirus expression vectors. A laboratory manual. Freeman, San Francisco.
- PALLI S.R., CAPUTO G.F., SOHI S.S., BROWNRIGHT A.J., LADD T.R., COOK B.J., PRIMAVERA M., ARIF, B.M. and RETNAKARAN A., 1996a. CfMNPV blocks AcMNPV-induced apoptosis in a continuous midgut cell line. *Virology*, **222**, 201-213.
- PALLI S.R., SOHI S.S., COOK B.J., BROWNRIGHT A.J., CAPUTO G.F. and RETNAKARAN A., 1996b. RNA- and protein-synthesis inhibitors induce apoptosis in a midgut cell line from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *J. Insect Physiol.*, **42**, 1061-1069.
- POMBO V., VELLOSO L.M., RIBEIRO B.M. and BÁO S.N., 1998. Structural and ultrastructural changes during the infection of UFL-AG-286 cells with the baculovirus AgMNPV. *J. Invertebr. Pathol.*, **72**, 239-245.

- PRIKHOD'KO E.A. and MILLER L.K., 1996. Induction of apoptosis by baculovirus transactivator IE1. *J. Virol.*, **70**, 7116-7124.
- SIEBURTH P.J. and MARUNIAK J.E., 1988a. Growth characteristics of a continuous line from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro Cell Dev. Biol.*, **24**, 195-198.
- SIEBURTH P.J. and MARUNIAK J.E., 1988b. Susceptibility of an established cell line of *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) to three nuclear polyhedrosis viruses. *J. Invertebr. Pathol.*, **52**, 453-458.
- SOHI S.S., LALOUETTE W., MACDONALD J.A., GRINGORTEN J.L. and BUDAU C.B., 1993. Establishment of continuous midgut cell lines of spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). *In vitro Cell. Dev. Biol.*, **29A**, 56A.
- TEODORO J.G. and BRANTON P.E., 1997. Regulation of apoptosis by viral gene products. *J. Virol.*, **71**, 1739-1746.
- VAUGHN J.L., GOODWIN R.H., TOMPKINS G.J. and McCAWLEY P., 1977. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro*, **13**, 213-217.
- WILLIAMS G.V. and FAULKNER P., 1997. Cytological changes and viral morphogenesis during baculovirus infection. In: The Baculoviruses. Miller L.K. ed., Plenum Press, New York, pp 61-107.
- WILLIAMS G.V., ROHEL D.Z., KUZIO J. and FAULKNER P., 1989. A cytopathological investigation of *Autographa californica* Nuclear polyhedrosis virus p10 gene function using insertion-deletion mutants. *J. Gen. Virol.*, **70**, 187.
- WYLLIE A.H., 1997. Apoptosis: an overview. *Br. Med. Bull.*, **53**, 451-465.

3. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

Uma contribuição deste trabalho para o campo de estudo da regulação da apoptose por baculovírus foi ter mostrado detalhes ultraestruturais do comportamento de células de inseto em cultura durante a apoptose induzida por baculovírus, uma vez que os dados presentes na literatura mostram-se bastante escassos neste sentido. Esta caracterização revelou semelhanças gerais entre o conjunto fenotípico das células UFL-AG-286 em apoptose induzida por vApAg e vP35del e a morfologia clássica descrita para vertebrados (Kerr *et al.*, 1972), ocorrendo inclusive a fragmentação oligonucleossomal do DNA. É interessante salientar que as características morfológicas utilizadas como diagnóstico devem ser analisadas dentro do contexto da célula, podendo haver a ausência de uma ou mais características ou características diferentes. Isso tem sido mostrado para alguns tipos celulares de insetos (Schwartz *et al.*, 1993; Dai & Gilbert, 1997; Martau & Romer, 1998), havendo casos em que o emprego do termo apoptose torna-se discutível.

O nosso modelo mostra que a compactação da cromatina em células UFL-AG-286 em apoptose pode ser suprimida quando da ocorrência de replicação viral e produção de vírus ocluídos, fenômeno que causa grandes modificações na estrutura nuclear. Em outro contexto, como na apoptose induzida pelo vírus vP35del, onde o fenômeno é mais rápido e ocorre antes da replicação e produção de vírus ocluídos, esta mesma linhagem celular apresenta compactação cromatínica.

Outro fato interessante diz respeito à produção de vírus ocluídos durante a ocorrência de apoptose em células UFL-AG-286 induzida por vApAg. Estudos até então realizados com o vírus vAcAnh ou vírus *p35*, derivados de *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) em linhagens celulares de inseto mostravam ser a

apoptose um fator totalmente limitante da produção de vírus ocluídos. Para os modelos analisados em nosso estudo, mostramos que este fato decorre de características intrínsecas do vírus vApAg, uma vez que células UFL-AG-286 infectadas com um mutante *p35*⁻ derivado de AcMNPV, que induz morte rápida, também não produz vírus ocluídos.

De acordo com nossas observações, podemos inferir que a natureza da mutação ocorrida em vApAg venha a ser diferente de vAcAnh. De alguma forma, vApAg tem a capacidade de atrasar a morte de células UFL-AG-286 pela possível produção suficiente de elementos bloqueadores da apoptose no início da infecção. Em fases finais estes elementos não seriam suficientes ou deixariam de ser produzidos, levando à apoptose. À princípio, imaginamos que este fato não seria possível se houvesse deleção em genes que codificam inibidores da apoptose essenciais para o vírus, como é o caso de vAcAnh. Por outro lado, no caso de haver uma deleção em um gene antiapoptótico essencial, da mesma forma que para vAcAnh, a resposta apoptótica tardia poderia ser explicada por uma possível indução também tardia de apoptose pelo vírus AgMNPV.

Outro detalhe merecedor de menção é o fato de ter sido mostrada a resistência de células Tn-5B à indução de apoptose pelo vírus vApAg, corroborando assim observações anteriores de resistência à apoptose relativas a outra linhagem celular derivada de *Trichoplusia ni*, TN-368 e de normal infectividade de baculovírus AcMNPV *p35*⁻ neste inseto.

Assim, a partir da caracterização da citopatologia induzida pelo vírus vApAg em células UFL-AG-286 e Tn-5B realizada neste trabalho, restam inúmeras perguntas a serem respondidas com relação ao comportamento e infectividade deste vírus *in vivo*, à mutação ocorrida e possível função do gene mutado, dentre várias outras, as quais podem trazer

esclarecimentos importantes sobre a regulação da apoptose pelo vírus AgMNPV, sua relação coevolutiva com seus hospedeiros e relações filogenéticas com outros baculovírus.

Diante da variedade de estratégias apresentadas por diferentes vírus animais que os fazem capazes de interagir e interferir com a resposta apoptótica de suas células hospedeiras para favorecer a multiplicação de sua progênie é possível concluir que a apoptose é um mecanismo de defesa celular importante e conservado que teve de ser superado para que a evolução dos vírus fosse possível.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (Citadas na introdução e conclusão geral)

- ADAMS, J. M. & CORY, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science, v. 281, p. 1322-1326, 1998.
- ADAMS, J. R.; GOODWIN, R. H. & WILCOX, T. A. Electron microscopic investigations on invasion and replication of insect baculoviruses *in vivo* and *in vitro*. Biol. Cell., v. 28, p. 261-268, 1977.
- AFONSO, C. L.; NEILAN, J. H.; KUTISH, G. F. & ROCK, D. L. An african swine fever virus bcl-2 homolog, 5-HL, supresses apoptotic cell death. J. Virol., v. 70, p. 4858-4863, 1996.
- ALLEN, G. E. & KNELL, J. D. A nuclear polyhedrosis virus of *Anticarsia gemmatilis*. I. Ultrastructure, replication, and pathogenicity. Fla. Entomol., v. 60, p.233-240, 1977.
- AMEISEN, J. C. The evolutionary origin and role of programmed cell death in single-celled organisms: A new view of executioners, mitochondria, host-pathogen interactions, and the role of death in the process of natural selection. In: LOCKSHIN, R. A., ZAKERI, Z. & TILLY, J. L. When cells die: A comprehensive evaluation of apoptosis and programmed cell death. New York: Wiley-Liss, 1998. p. 03-56.
- ARIF, B. M. The structure of the viral genome. Curr. Top. Microbiol. Immunol, v. 131, p. 21-29, 1986.
- ATENCIA, R.; GARCÍA-SANZ, M.; PÉREZ-YARZA, G.; ASUMENDI, A.; HILARIO, E. & ARÉCHAGA J. A structural analysis of cytoskeleton components during the execution phase of apoptosis. Protoplasma, v. 198, p. 163-169, 1997.

- AYRES, M. D.; HOWARD, S. C.; KUZIO, J.; LOPEZ-FERBER, M. & POSSEE, R. D. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Virology, v. 202, p. 586-605, 1994.
- BARRETT, J. W.; BROWNRIGHT, A. J.; PRIMAVERA, M. J. & PALLI, S. R. Studies of the nucleopolyhedrovirus infection process in insects by using the green fluorescent protein as a reporter. J. Virol., v. 72, p. 3377-3382, 1998a.
- _____.; _____.; _____.; RETNAKARAN, A. & PALLI, S. R. Concomitant primary infection of the midgut epithelial cells and the hemocytes of *Trichoplusia ni* by *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. Tissue Cell, v. 30, p. 602-616, 1998b.
- BEIDLER, D. R.; TEWARY, M.; FRIESEN, P. D.; POIRIER, G. & DIXIT, V. M. The baculovirus p35 protein inhibits fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis. J. Biol. Chem., v. 270, p. 16256-16258, 1995.
- BERNARDI, P.; VASSANELLI, S.; VERONESE, P.; COLONNA, R.; SZABO, I. & ZORATTI, M. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. J. Biol. Chem., v. 267, p. 2934-2939, 1992.
- BERTIN, J.; ARMSTRONG, R. C.; OTTILIE, S.; MARTIN, D. A.; WANG, Y.; BANKS, S.; WANG, G. H.; SENKEVICH, T. G.; ALNEMRI, E. S.; MOSS, B.; LENARDO, M. J.; TOMASELLI, K. J. & COHEN, J. I. Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR-induced apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 94, p. 1172-1176, 1997.
- _____.; MENDRYSA, S. M.; LaCOUNT, D. J.; GAUR, S.; KREBS, J. F.; ARMSTRONG, R. C.; TOMASELLI, K. J. & FRIESEN, P. D. Apoptotic suppression by baculovirus P35 involves cleavage by and inhibition of a virus-induced CED-3/ICE-like protease. J. Virol., v. 70, p. 6251-6259, 1996.

- BILIMORIA, S. L. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. In: KURSTAK, E. Viruses of Invertebrates. New York: Marcel Dekker, 1991, p.1-72.
- BIRNBAUM, M. J.; CLEM, R. J. & MILLER, L. K. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with cys/his sequence motifs. J. Virol., v. 68, p. 2521-2528, 1994.
- BLACK, B. C.; BRENNAN, L. A.; DIERKS, P.M. & GARD, I.E. Commercialization of baculoviral insecticides. In: MILLER, L. K. The Baculoviruses. New York: Plenum Press, 1997. p. 237-266, 1997.
- BLISSARD, G. W. Baculovirus-insect cell interactions. Cytotechnology, v. 20, p. 73-93, 1996.
- _____. & ROHRMANN, G. F. Baculovirus diversity and molecular biology. Ann. Rev. Entomol., v. 35, p. 127-155, 1990.
- BOSE, R.; CHEN, P.; LOCONTI, A.; GRÜLLICH, C.; ABRAMS, J. M. & KOLESNICK, R. N. Ceramide generation by the reaper protein is not blocked by the caspase inhibitor, p35. J. Biol. Chem., v. 273, p. 28852-28859, 1998
- BROWN, S. B.; BAILEY, K. & SAVIL, J. Actin is cleaved during constitutive apoptosis. Biochem. J., v. 323, p. 233-237, 1997.
- BUMP, N. J.; HACKETT, M.; HUGUNIN, M.; SESHAGIRI, S.; BRADY, K.; CHEN, P.; FERENZ, C.; FRANKLIN, S.; GHAYUR, T.; LI, P.; LICARI, P.; MANKOVICH, J.; SHI, L.; GREENBERG, A. H.; MILLER, L. K. & WONG, W. W. Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. Science, v. 269, p. 1885-1888, 1995.
- CARNER, G. R. & TURNIPSEED, S. G. Potential of a nuclear polyhedrosis virus for control of the velvet caterpillar in soybean. J. Econ. Entomol., v. 70, p. 608-610, 1977.

- CARTIER, J. L.; HERSHBERGER, P. A. & FRIESEN, P. D. Suppression of apoptosis in insect cells stably transfected with baculovirus *p35*: Dominant interference by N-terminal sequences *p35*¹⁻⁷⁶. J. Virol., v. 68, p. 7728-7737, 1994.
- CASTRO, M. E. B.; SOUZA, M. L.; ARAUJO, S. & BILIMORIA, S. Replication of *Anticarsia gemmatilis* nuclear polyhedrosis virus in four lepidopteran cell lines. J. Invertebr. Pathol., v. 69, p. 40-45, 1997.
- CHARLTON, C. A. & VOLKMAN, L. E. Sequential rearrangement and nuclear polymerization of actin in baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. J. Virol., v. 65, p. 1219-1227, 1991.
- CHEJANOVSKY, H. & GERSHBURG, E. The wild-type *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus induces apoptosis of *Spodoptera littoralis* cells. Virology, v. 209, p. 519-525, 1995.
- CHINNAIYAN, A. M.; O'ROURKE, K.; TEWARI, M. & DIXIT, V. M. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. Cell, v. 81, p. 505-512, 1995.
- CHISHOLM, G. E. & HENNER, D. J. Multiple early transcripts and splicing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus virus IE-1 gene. J. Virol., v. 62, p. 3193-3200, 1988.
- CLEM, R. J. Regulation of programmed cell death by baculoviruses. In: MILLER, L. K. The Baculoviruses. New York: Plenum Press, 1997. p. 237-266.
- _____. & MILLER, L. K. Induction and inhibition of apoptosis by insect viruses. In: COPE, F. O. & TOMEI, L. D. Apoptosis II: The Molecular Basis of Cell Death. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994a. p. 89-110.

- _____. & _____. Control of programmed cell death by the baculovirus genes *p35* and *iap*. Mol. Cell Biol., v. 14, p. 5212-5222, 1994b.
- _____.; FECHHEIMER, M. & MILLER, L. K. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. Science, v. 254, p. 1388-1390, 1991.
- _____.; HARDWICK, J. M. & MILLER, L. K. Anti-apoptotic genes of baculoviruses. Cell Death Diff., v. 3, p. 9-16, 1996.
- _____.; 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*. J. Virol., v. 68, p. 6759-6762, 1994.
- COHEN, G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. Biochem. J., v. 326, p. 1-16, 1997.
- CORSO, I. C.; GAZZONI, D. L. & GATTI, I. M. Ocorrência de poliedrose nuclear em *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818, na região sul do Brasil. An. Soc. Entomol. Brasil, v. 6, p. 312-314, 1977.
- CORY, S & ADAMS, J. M. Matters of life and death: programmed cell death at Cold Spring Harbor. Biochim. Biophys. Acta, v. 1377, p. R25-R44, 1998.
- CROOK, N. E.; CLEM, R. J. & MILLER, L. K. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. J. Virol., v. 67, p. 2168-2174, 1993.
- DAI, J. D. & GILBERT, L. I. Programmed cell death of the prothoracic glands of *Manduca sexta* during pupal-adult metamorphosis. Insect Biochem. Molec. Biol., v. 27, p. 69-78, 1997.
- DARMON, A. J.; NICHOLSON, D. W. & BLEACKLEY, R. C. Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. Nature, v. 377, p. 446-448, 1995.

- DA-SILVEIRA, E. B. & RIBEIRO, B. M. Location and mapping of the putative surface glycoprotein gene (*gp67*) of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus (AgMNPV). V Simpósio de Controle Biológico (SICONBIOL). 1986, Foz do Iguaçu. Anais, p. 118.
- DATTA, R.; KOJIMA, H.; BANACH, D.; BUMP, N. J.; TALANIAN, R. V.; ALNEMRI, E. S.; WEICHSELBAUM, R. R.; WONG, W. W. & KUFEL, D. W. Activation of a CrmA-insensitive, p35-sensitive pathway in ionizing radiation-induced apoptosis. J. Biol. Chem., v. 272, p. 1965-1969, 1997.
- DEBBAS, M. & WHITE, E. Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. Genes Dev., v. 7, p. 546-554, 1993.
- DERKSEN, A. C. G. & GRANADOS, R. R. Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity. Virology, v. 167, p. 242-250, 1988.
- DEVERAUX, Q. L.; TAKAHASHI, R.; SALVESEN, G. S. & REED, J. C. X-linked IAP is direct inhibitor of cell-death proteases. Nature, v. 388, p. 300-304, 1997.
- _____.; ROY, N.; STENNICKE, H. R.; VAN ARSDALE, T.; ZHOU, Q.; SRINIVASULA, S. M.; ALNEMRI, E. S.; SALVENSEN, G. S. & REED, J. IAPs block apoptotic events induced by direct inhibition of distinct caspases. EMBO J., v. 17, p. 2215-2223, 1998.
- DOBBELSTEIN, M. & SHENK, T. Protection against apoptosis by the vaccinia virus SPI-2 (B13R) gene product. J. Virol., v. 70, p. 6479-6485, 1996.
- DU, Q.; LEHAVI, D.; FAKTOR, O.; QI, Y. & CHEJANOVSKY, N. Isolation of an apoptosis suppressor gene of the *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. J. Virol., v. 73, p. 1278-1285, 1999.

- DUVALL, E. & WYLLIE, A. H. Death and the cell. Immunol Today, v. 7, p. 115-119, 1986.
- ELLIS, H. M. & HORVITZ, H. R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. Cell, v. 44, p. 817-829, 1986.
- EKERT, P. G. & VAUX, D. Apoptosis and the immune system. Br. Med. Bull., v. 53, p. 591-603, 1997.
- ENGELHARD, E. K.; KAM-MORGAN, L. N. W.; WASHBURN, J. O. & VOLKMAN, L. E. The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 91, p. 3224-3227, 1994.
- ERNST, J. D.; YANG, L.; ROSALES, J. L. & BROADDUS, V. C. Preparation and characterization of an endogenously fluorescent annexin for detection of apoptotic cells. Anal. Biochem., v. 260, p. 18-23, 1998.
- FADOK, V. A.; VOELKER, D. R.; CAMPBELL, P. A.; COHEN, J. J.; BRATON, D. L. & HENSON, P. M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. J. Immunol., v. 148, p. 2207-2216, 1992.
- FAULKNER, P. & CARSTENS, E. B. An overview of the structure and replication of baculoviruses. Curr. Top. Microbiol. Immunol., v. 131, p. 1-19, 1986.
- FELIPE-ALVES, C. A.; RAZUC, F. B. & RIBEIRO, B. M. Localization and mapping of the putative DNA polymerase gene of *Anticarsia gemmatilis* nuclear polyhedrosis virus (AgMNPV). V Simpósio de Controle Biológico (SICONBIOL). 1986, Foz do Iguaçu. Anais, p. 70.

- FLIPSEN, J. T. M.; VAN LENT, J. W. M. ; GOLDBACH, R. W. & VLAK, J. M.
Expression of polyhedrin and p10 in the midgut of AcMNPV-infected *Spodoptera exigua* larvae: An immunoelectron microscopic investigation. J. Invert. Pathol., v. 61, p. 17-23, 1993.
- _____.; MARTENS, J. W. M.; VAN OERS, M. M.; VLAK, J. M. & VAN LENT, J. W. M.
Passage of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus through the midgut epithelium of *Spodoptera exigua* larvae. Virology, v. 208, p. 328-335, 1995
- FRASER, M. J. Ultrastructural observations of virion maturation in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infected *Spodoptera frugiperda* cell cultures. J. Ultrastr. Mol. Struct. Res., v. 95, p. 189-195, 1986.
- FRIESEN, P. D. Regulation of baculovirus early gene expression. In: MILLER, L. K. The Baculoviruses. New York: Plenum Press, 1997. p. 141-170.
- FUNK, C. J.& CONSIGLI, R. A. Phosphate cycling on the basic protein of *Plodia interpunctella* granulosis virus. Virology, v. 193, p. 396-402, 1993.
- _____.; BRAUNAGEL, S. C. & ROHRMANN, G. F. Baculovirus structure. In: MILLER, L. K. The Baculoviruses. New York: Plenum Press, 1997. p. 7-32.
- GARCIA-CANEDO, A. M. G. Estudo da variabilidade genética do vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatilis*. Campinas, 1995. Tese (Doutorado em Genética), Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- GRANADOS, R. R. Early events in the infection of *Heliothis zea* midgut cells by a baculovirus. Virology, v. 90, p. 170-174, 1978.
- _____. & LAWLER, K. A. *In vivo* pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. Virology, v. 108, p. 297-308, 1981.

- _____.; GUOXUN, L.; DERSEN, A. C. G. & McKENNA, K. A. A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol., v. 64, p. 260-266, 1994.
- GREEN, D. R. & KROEMER, G. The central executioners of apoptosis: Caspases or mitochondria? Trends Cell Biol., v. 8, p. 267-271, 1998.
- _____.& REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. Science, v. 281, p. 1309-1312, 1998.
- GRUBER, A.; STETTLER, P.; HEINEGER, P.; SCHUMPLI, D. & LANZREIN, B. Polydnavirus DNA of the braconid wasp *Chelonus inanitus* is integrated in the wasp genome and excised only in later pupal and adult stages of the female. J. Gen. Virol., v. 77, p. 2873-2879, 1996.
- HARDWICK, J. M. Viral interference with apoptosis. Sem. Cell Dev. Biol., v.9, p. 339-349, 1998
- HARRAP, K. A. The structure of nuclear polyhedrosis viruses. III. Virus assembly. Virology, v. 50, p. 133-139, 1972.
- HARVEY, A. J.; BIDWAL, A. P. & MILLER, L. K. Doom, a product of the *Drosophila mod* (*mdg4*) gene, induces apoptosis and binds to baculovirus inhibitor-of-apoptosis proteins. Mol. Cell. Biol., v. 17, p. 2835-2843, 1997.
- HAY, B. A.; WOLFF, T. & RUBIN, G. M. Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*. Development, v. 120, p. 2121-2129, 1994
- HENDERSON, S.; HUEN, D.; ROWE, M.; DAWSON, C.; JOHNSON, G. & RICKINSON, A. Epstein-Baer virus-coded BHRF-1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 90, p. 8479-8483, 1993.
- HENGARTNER, M. Death by crowd control. Science, v. 281, p. 1298-1299, 1998.

- 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. J. Virol., v. 66, p. 5525-5533, 1992.
- _____.; LaCOUNT, D. J. & FRIESEN, P. D. The apoptotic suppressor P35 is required early during baculovirus replication and is targeted to the cytosol of infected cells. J. Virol., v. 68, p. 3467-3477, 1994.
- HINK, W. F. Established insect cell line from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. Nature, v. 226, p. 466-467, 1970.
- HINSHAW, V. S.; OLSEN, C. W.; DYBDAHL-SISSOKO, N. & EVANS, D. Apoptosis: A mechanism of cell killing by influenza A and B viruses. J. Virol., v. 68, p. 3667-3673, 1994.
- HOCHMAN, A. Programmed cell death in prokaryotes. Critic. Rev. Microbiol., v. 23, p. 207-214, 1997.
- HORTON, H. M. & BURAND, J. P. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. J. Virol., v. 67, p. 1860-1868, 1993.
- HU, S.; VICENZ, C.; BULLER, M. & DIXIT, V. M. A novel family of viral death effector domain-containing molecules that inhibit both CD-95- and tumor necrosis factor receptor-1-induced apoptosis. J. Biol. Chem., v. 272, p. 9621-9624, 1997.
- HUANG, B.; EBERSTADT, M.; OLEJNICZAK, E. T.; MEADOWS, R. P. & FESIK, S. W. NMR structure and mutagenesis of the Fas (Apo 1/CD 95) death domain. Nature, v. 384, p. 638-641, 1996.
- JACOBSON, M. D.; WEIL, M. & RAFF, M. Programmed cell death in animal development. Cell, v. 88, p. 347-354, 1997.

- JARVIS, D. L. Baculovirus Expression Vectors. In: MILLER, L. K. The Baculoviruses. New York: Plenum Press, 1997. p. 237-266.
- JOHNSON, D. W. & MARUNIAK, J. E. Physical map of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus (AgMNPV-2) DNA. J. Gen. Virol., v. 70, p. 1877-1883, 1989.
- KAMITA, S. G.; MAJIMA, K. & MAEDA, S. Identification and characterization of the p35 gene of the *Bombix mori* nuclear polyhedrosis virus that prevents virus-induced apoptosis. J. Virol., v. 67, p. 455-463, 1993.
- KAWAMOTO, F.; KUMADA, N. & KOBALASHY, M. Envelopment of the nuclear polyhedrosis virus of the Oriental tussock moth, *Euproctis subflava*. Virology, v. 77, p. 867-871, 1977a.
- _____.; SUTO, C.; KUMADA, N. & KOBALASHY, M. Cytoplasmic budding of a nuclear polyhedrosis virus and comparative ultrastructural studies of envelopes. Microbiol. Immunol., v. 21, p. 255-265, 1977.
- KAYSER, W. J.; VUCIC, D. & MILLER, L. K. The *Drosophila* inhibitor of apoptosis D-IAP1 suppresses cell death induced by the caspase drICE. FEBS Lett., v. 440, p. 243-248, 1998.
- KEDDIE, B. A & VOLKMAN, L. E. Infectivity difference between the two phenotypes of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: Importance of 64K envelope glycoprotein. J. Gen. Virol., v. 66, p. 1195-1200, 1985.
- _____.; APONTE, G. W. & VOLKMAN, L. E. The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host. Science, v. 243, p. 1728-1730, 1989.

- KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H. & CURRIE, A. R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer, v. 26, p. 239-257, 1972.
- _____.; GOBÉ, G. C.; WINTEWFORD, C. M. & HARMON, B. V. Anatomical methods in cell death. In: SCHWARTZ, L. M. & OSBORNE, B. A. Cell Death, vol. 46: Methods in Cell Death. San Diego: Academic Press, 1995, p. 1-27.
- KIRKPATRICK, B. A.; WASHBURN, J. O.; ENGELHARD, E. K. & VOLKMAN, L. E. Primary infection of insect tracheae by *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. Virology, v. 203, p. 184-186, 1994.
- KOOPMAN, G.; REUTELINGSPERGER, C. P. M.; KUIJTEM, G. A. M.; KEEHEN, R. M. J.; PALS, S. T. & VAN OERS, M. H. J. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. Blood, v. 84, p. 1415-1420, 1994.
- KOYAMA, A. H. Induction of apoptotic DNA fragmentation by the infection of vesicular stomatitis virus. Virus Res., v. 37, p. 285-290, 1995.
- _____.; IRIE, H.; FUKUMORI, T.; HATA, S.; LIDA, S.; AKARI, H. & ADACHI, A. Role of virus-induced apoptosis in a host defense mechanism against virus infection. J. Med. Invest., v. 45, p. 37-45, 1998.
- LEE, J. -C. & CHAO, Y. -C. Apoptosis resulting from superinfection of *Heliothis zea* virus 1 is inhibited by p35 and is not required for virus interference. J. Gen. Virol., v. 79, p. 2293-2300, 1998.
- LINZER, D. I. & LEVINE, A. J. Characterization of a 54 K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. Cell, v. 17, p. 43-52, 1979.

- LIU, X.; KIM, C. N.; YANG, J.; JEMMERSON, R. & WANG, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome C. Cell, v. 86, p. 147-157, 1996.
- LOCKE, M. & HUIE, P. A function of plasma membrane reticular system. Tissue Cell, v. 15, p. 885-902, 1983.
- 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.
- MACEN, J. L.; GRAHAM, K. A.; LEE, S. F.; SCHREIBER, M.; BOSHKOV, L. K. & McFADDEN, G. Expression of the myxoma virus tumor necrosis factor receptor homologue and M11L genes is required to prevent virus-induced apoptosis in infected rabbit T lymphocytes. Virology, v. 218, p. 232-237, 1996.
- MACKINNON, E. A.; HENDERSON, J. F.; STOLZ, D. B. & FAULKNER, P. Morphogenesis of nuclear polyhedrosis virus under conditions of prolonged passage *in vitro*. J. Ultrastruc. Res., v. 49, p. 419-435, 1974.
- MARTAU, T. & ROMER, F. Degeneration of moulting glands in male crickets. J. Insect Physiol., v. 44, p. 981-989, 1998,
- MARTELLI, A. M.; BAREGGI, R.; BORTUL, R.; GRILL, V.; NARDUCCI, P. & ZWEYER, M. The nuclear matrix and apoptosis. Histochem. Cell Biol., v. 108, p. 1-10, 1997.
- MARTINOU, I.; FERNADEZ, P.-A.; MISSOTTEN, M.; WHITE, E.; ALLET, B.; SADOUL, R. & MARTINOU, J.-C. Viral proteins E1B19K and p35 protects sympathetic neurons from cell death induced by NGF deprivation. J. Cell Biol., v. 128, p. 201-208, 1995.

- MARUNIAK, J. E. Molecular biology of *Anticarsia gemmatalis* baculovirus. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 84, p. 107-111, 1989.
- MATOS, T. G. F. ; GIUGLIANO, L. G.; RIBEIRO, B. M. & BÁO, S. N. Structural and ultrastructural studies of *Anticarsia gemmatalis* midgut cells infected with the baculovirus AgNPV. Int. J. Insect Morphol. Embriol., no prelo.
- McEVOY, L.; WILLIAMSON, P. & SCHLEGEL, R. A. Membrane phospholipid asymmetry as a determinant of erythrocyte recognition by macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 83, p. 3311-3315, 1986.
- MEI, X.; HE, H.; ZHONG, H & DISTELHORST, C. W. Baculovirus p35 and Z-VAD-fmk inhibit thapsigargin-induced apoptosis of breast cancer cells. Oncogene, v. 15, p. 1207-1212, 1997.
- MIETZ, J. A.; UNGER, T.; HUIBREGTESE, J. M. & HOWLEY, P.M. The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein. EMBO J., v. 11, p. 5013-5020, 1992.
- MILLER, L. K. Introduction to the baculoviruses. In: _____. The Baculoviruses. New York: Plenum Press, 1997. p. 1-6.
- _____. An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. Trends Cell Biol., v. 9, p. 323-328, 1999.
- MILLS, J. C.; STONE, N. L.; ERHARDT, J. & PITTMAN, R. N. Apoptotic membrane blebbing is regulated by miosin light chain phosphorylation. J. Cell Biol., v. 140, p. 627-636, 1998.
- MOSCARDI, F. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. In: ALVES, S. B. Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 509-540.

- MUCHMORE, S. W.; SATTLET, M.; LIANG, H.; MEADOWS, R. P.; HARLAN, J. E.; YOON, H. S.; NETTESHEIM, D.; CHANG, B. S.; THOMPSON, C. B.; WONG, S. L.; NG, S. L. & FESIK, S. W. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. Nature, v. 381, p. 335-341, 1996
- MURPHY, F. A.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; GHABRIAL, A. W.; JARVIS, A. W.; MARTELLY, G.; MAYO, M. E. & SUMMERS, M. D. Virus Taxonomy: Classification and nomenclature of viruses, Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Arch. Virology, Supl. v. 10, p. 1-586, 1995.
- NAGATA, S. Apoptosis by death factor. Cell, v. 88, p. 355-365, 1997.
- _____ & GOLSTEIN P. The fas death factor. Science, v. 267, p. 1449-1456, 1995.
- OBERHAMMER, F. A.; WILSON, J. W.; DIVE, C.; MORRIS, I. D.; HICKMANN, J. A.; WAKELING, A. E.; WALKER, P. R. & SIKORSKA, M. Apoptotic death in epithelial cells: Cleavage of DNA to 300 and/or 50 kilobase fragments prior to or in absense of internucleosomal fragmentation. EMBO J., v. 12, p. 3679-3684, 1993.
- OLIE, R. A.; DURRIEU, F.; CORNILLON, S.; LOUGHRAN, G.; GROSS, J.; EARNSHAW, W. C. & GOLSTEIN, P. Apparent caspase independence of programmed cell death in *Dictyostelium*. Curr. Biol., v. 8, p. 955-958, 1998.
- OLTVAI, Z. N.; MILLIMAN, C. L. & KORSMEYER, S. J. Bcl-2 heterodimerizes *in vitro* with a conserved homolog BAX, that accelerates programmed cell death. Cell, v. 74, p. 609-619, 1993.
- PALLI, S. R.; SOHI, S. S.; COOK, B. J.; BROWNRIGHT, A. J.; CAPUTO, G. F. & RETNAKARAN, A. RNA- and protein-synthesis inhibitors induce apoptosis in a midgut cell line from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. J. Insect Physiol., v. 42, p. 1061-1069, 1996a.

- _____.; CAPUTO, G. F.; SOHI, S. S.; BROWNRIGHT, A. J.; LADD, T. R.; COOK, B. J.; PRIMAVERA, M.; ARIF, B. M. & RETNAKARAN, A. CfMNPV blocks AcMNPV-induced apoptosis in a continuous midgut cell line. Virology, v. 222, p. 201-213, 1996b.
- PEKOSZ, A.; PHILLIPS, J.; PLEASURE, D.; MERRY, D. & GONZALEZ-SCARANO, F. Induction of apoptosis by La Crosse virus infection and role of neuronal differentiation and human bcl-2 expression in its prevention. J. Virol., v. 70, p. 5329-5335, 1996.
- PENNEL, R. I. & LAMB, C. Programmed cell death in plants. The Plant Cell, v. 9, p. 1157-1168, 1997.
- PETRONILLI, V.; NICOLLI, A.; CONSTANTINI, P.; COLONNA, R & BERNARDI, P. Regulation of the permeability transition pore, a voltage-dependent mitochondrial channel inhibited by ciclosporin A. Biochim. Biophys. Acta, v. 1187, p. 255-259, 1994
- POMBO, V.; VELLOSO, L. M.; RIBEIRO, B. M. & BÁO, S.N. Structural and ultrastructural changes during the infection of UFL-AG-286 cells with the baculovirus AgMNPV. J. Invertebr. Pathol., v. 72, p. 239-245, 1998.
- PRIKHOD'KO, E. A. & MILLER, L. K. Induction of apoptosis by baculovirus transactivator IE1. J. Virol., v. 70, p. 7116-7124, 1996.
- _____. & _____. The baculovirus PE38 protein augments apoptosis induced by transactivator IE1. J. Virol., v. 73, p. 6691-6699, 1999.
- RABIZADEH, S.; LACOUNT, D. J.; FRIESEN, P. D. & BREDESEN, D. E. Expression of the baculovirus *p35* gene inhibits mammalian neural cell death. J. Neurochem., v. 61, p. 2318-2321, 1993.
- RAO, L.; DEBBAS, M.; SABBATINI, P.; HOCKENBERY, D.; KORSMEYER, S. & WHITE, E. The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. Pro. Natl. Acad. Sci. USA, v. 89, p. 7742-7746, 1992.

- RAY, C. A.; BLACK, R. A.; KRONHEIM, S. R.; GREENSTREET, T. A.; SLEATH, P. R.; SLAVESSEN, G. S. & PICKUP, D. J. Viral inhibition of inflammation: Cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1-beta converting enzyme. Cell, v. 69, p. 597-604, 1992.
- REDDY, J. T. & LOCKE, M. The size limited penetration of gold particles through insect basal laminae. J. Insect Physiol., v. 36, p. 397-408, 1990.
- RIBEIRO, B. M.; SOUZA, M. L. & KITAJIMA, E. W. Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus de insetos. In: ALVES, S. B. Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 481-507.
- RODRIGUES, J. C. M. Caracterização do gene ecdisteróide UDP-glicosil transferase do vírus de poliedrose nuclear múltipla *Anticarsia gemmatilis*. Brasília, 1996. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.
- ROTHER, M.; PAN, M.-G.; HENZEL, W. J.; AYRES, T. M. & GOEDDEL, D. V. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. Cell, v. 83, p. 1243-1252, 1995.
- ROY, N.; DEVERAUX, Q. L.; TAKAHASHI, R.; SALVESEN, G. S. & REED, J. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. EMBO J., v. 16, p. 6914-6925, 1997.
- SAH, N. K.; TANEJA, T. K.; PATHAK, N.; BEGUM, R.; ATHAR, M. & HASNAIN, S. E. The baculovirus antiapoptotic *p35* gene also functions via an oxidant-dependent pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 96, p. 4838-4843, 1999.
- SAVARY, S.; BECKAGE, N.; TAN, F.; PERIQUET, G. & DREZEN, J. M. Exision of the polydnavirus chromosomal EP1 sequence of the parasitoid *Cotesia congregata*

- (Braconidae, Microgasterinae) at potential recombinase binding sites. J. Gen. Virol., v. 78, p. 3125-3134, 1997.
- SAVIL, J. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. Br. Med. Bull., v. 53, p. 491-508, 1997.
- _____, FADOK, V.; HENSON, P. & HASLETT, C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. Immunol Today, v. 14, p. 131-136, 1993.
- SCHEFFNER, M.; WERNESS, B. A.; HUIBREGTSE, J. M.; LEVINE, A. J. & HOWLEY, P. M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. Cell, v. 63, p. 1129-1136, 1990.
- SCHREIBER, M.; SEDGER, L. & McFADDEN, G. Distinct domains of M-T2, the myxoma virus tumor necrosis factor (TNF) receptor homolog, mediate extracellular TNF binding and intracellular apoptosis inhibition. J. Virol., v. 71, p. 2171-2181, 1997.
- SCHWARTZ, L. M.; SMITH, S. W.; JONES, M. E. E. & OSBORNE, B. A. Do all programmed cell death occur via apoptosis? Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 90, p. 980-984, 1993.
- SESHAGIRI, S. & MILLER, L. K. Baculovirus inhibitors of apoptosis (IAPs) block activation of Sf-caspase-1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 94, p. 13606-13611, 1997.
- SHISLER, J. L.; YANG, C.; WALTER, B.; WARE, C. F. & GOODING, L. R. The adenovirus E3-10.4k/14.5k complex mediates loss of cell surface Fas (CD95) and resistance to Fas-induced apoptosis. J. Virol., v. 71, p. 8299-8306, 1997.
- SIEBURTH, P. J. & MARUNIAK, J. E. Growth characteristics of a continuous line from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). In Vitro Cell Dev. Biol., v. 24, p. 195-198, 1988a.

- _____. & _____. Susceptibility of an established cell line of *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) to three nuclear polyhedrosis viruses. J. Invertebr. Pathol., v. 52, p. 453-458, 1988b.
- SMITH, G. E. & SUMMERS, M. D. Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases. Virology, v. 89, p. 517-527, 1978.
- SOHI, S. S.; LALOUETTE, W.; MACDONALD, J. A.; GRINGORTEN, J. L. & BUDAU, C. B. Establishment of continuous midgut cell lines of spruce budworm (Lepdoptera: Tortricidae). In vitro Cell. Dev. Biol., v. 29A, p. 56A, 1993.
- STOLZ, D. B.; PAVAN, C. & DA CUNHA, A. B. Nuclear polyhedrosis virus: A possible example of *de novo* intranuclear membrane morphogenesis. J. Gen. Virol., v. 19, p. 145-150, 1973.
- STRAND, M. R. & PECH, L. L. *Microplitis demolitor* polydnavirus induces apoptosis of a specific haemocyte morphotype in *Pseudoplusia includens*. J. Gen. Virol., v. 76, p. 283-291, 1995.
- SUGIMOTO, A.; FRIESEN, P. D. & ROTHMAN, J. H. Baculovirus *p35* prevents developmentally programed cell death and rescues a *ced-9* mutant in the nematode *Caenorhabditis elegans*. EMBO J., v. 13, p. 2023-2028, 1994.
- SUMMERS, M. D. Electron microscopic observations on granulosis virus entry, uncoating and replication processes during infection of the midgut cells of *Trichoplusia ni*. J. Ultrastruc. Res., v. 35, p. 606-625, 1971.
- SUSIN, S. A.; ZAMZAMI, N.; CASTEDO, M.; DAUGAS, E.; WANG, H. G.; GELEY, S.; FASSY, F.; REED, J. C. & KROEMER, G. The central executioner of apoptosis: multiple conections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95 and ceramide-induced apoptosis. J. Exp. Med., v. 186, p. 25-37, 1997.

- _____.; _____.; _____.; HIRSH, T.; MARCHETTI, P.; MACHO, A.; DAUGAS, E.; GEUSKENS, M. & KROEMER, G. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. J. Exp. Med., v. 184, p. 1-11, 1996.
- TAKIZAWA, T.; MATSUKAWA, S.; HIGUCHI, Y.; NAKAMURA, S.; NAKANISHI, Y. & FUKUDA, R. Induction of programmed cell death (apoptosis) by influenza virus infection in tissue culture cells. J. Gen. Virol., v. 74, p. 2347-2355, 1993.
- TANADA, Y. & HESS, R. T. Development of a nuclear polyhedrosis virus in midgut cells and penetration of the virus into the hemocoel of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. J. Invertebr. Pathol., v. 28, p. 67-76, 1976.
- TARODI, B.; SUBRAMANIAN, T. & CHINNADURAI, G. Epstein-Baar virus BHRF-1 protein protects against cell death induced by DNA-damaging agents and heterologous viral infection. Virology, v. 201, p. 404-407, 1994
- TARTAGLIA, L. A.; AYRES, T. M.; WONG, G. H. W. & GOEDEL, D. V. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. Cell, v. 74, p. 845-853, 1993.
- TEODORO, J. G. & BRANTON, P. E. Regulation of apoptosis by viral gene products. J. Virol., v. 71, p. 1739-1746, 1997.
- THOME, M.; SCHNEIDER, P.; HOFMANN, K.; FICKENSHER, H.; MEINL, E.; NIEPEL, F.; MATTMANN, C.; BURNS, K.; BODMER, J. L.; SCHROTER, M.; SCAFFIDI, C.; KRAMMER, P. H.; PETER, M. E. & TSCHOPP, J. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. Nature, v. 386, p. 517-521, 1997.
- THOMPSON, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science, v. 267, p. 1456-1462, 1995.
- THORNBERRY, N. A. & LAZEBNIK, Y. Caspases: Enemies within. Science, v. 281, p. 1312-1316, 1998.

- UCKER, D. S.; OBERMILLER, P. S.; ECKHART, W.; APGAR, J. P.; BERGER, N. A. & MEYERS, J. Genome digestion is a dispensable consequence of physiological cell death mediated by cytotoxic T lymphocytes. Mol. Cell Biol., v. 12, p. 3060-3069, 1992.
- 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 Biochem. Sci., v. 23, p. 159-162, 1998.
- VAN DER WILK, F; VAN LENT, J. W. M. & VLAK, J. M. Immunogold detection of polyhedrin, p10 and virion antigens in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. J. Gen. Virol., v. 68, p. 2615-2623, 1987.
- VAUGHN, J. L & DOUGHERTY, E. M. The replication of baculoviruses. In: MARAMOROSCH, K. & SHERMAN, K. Viral Insecticides for Biological Control. Long Island: Academic Press, 1985, p. 569-633.
- _____; GOODWIN, R. H.; TOMPKINS, G. J. & McCAWLEY, P. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). In Vitro, v. 13, p. 213-217, 1977.
- VILLA, P.; KAUFMANN, S. H. & EARNSHAW, W. C. Caspases and caspases inhibitors. Trends Biochem. Sci., v. 22, p. 388-393, 1997
- VLAK, J. M.; KLINKENBERG, F. A.; ZAAL, K. J. M.; USMANY, M.; KLINGE-ROODE, E. C.; GEERVLIET, J. B. F.; ROOSIEN, J. & VAN LENT, J. W. M. Functional studies on the p10 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus using a recombinant expression a p10- β -galactosidase fusion gene. J. Gen. Virol., v. 69, p. 765-776, 1988.
- VOLKMAN, L. E. The 64K envelope protein of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Curr. Top. Microbiol. Immunol., v. 131, p. 103-118, 1986.

- _____. Nucleopolyhedrovirus interactions with their insect hosts. Adv. Virus Res., v. 48, p. 313-348, 1997.
- _____. & KNUDSON, D. L. *In vitro* replication of baculoviruses. In: GRANADOS, R. R. & FEDERICI, B. A. The Biology of Baculoviruses, vol. I, Biological Properties and Molecular Biology. Boca Raton: CRC, 1986. p. 110-127.
- _____. & ZAAL, K. M. J. *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus: Microtubules and replication. Virology, v. 175, p. 292-302, 1990.
- _____.; SUMMERS, M. D. & HSIEH, C. H. Occluded and non-occluded nuclear polyhedrosis virus grown in *Trichoplusia ni*: Comparative neutralization, comparative infectivity, and *in vitro* growth studies. J. Virol., v. 19, p. 820-832, 1976.
- _____.; GOLDSMITH, P. A.; HESS, R. T. & FAULKNER, P. Neutralization of budded *Autographa californica* NPV by a monoclonal antibody: Identification of the target antigen. Virology, v. 133, p. 354-362, 1984.
- VUCIC, D.; KAISER, W. J.; & MILLER, L. K. Inhibition of apoptosis proteins physically interact with and block apoptosis induced by *Drosophila* proteins HID and GRIM. Mol. Cell. Biol., v. 18, p. 3300-3309, 1998.
- _____.; _____; HARVEY, A. J. & MILLER, L. K. Inhibition of reaper-induced apoptosis by interaction with inhibitor of apoptosis proteins (IAPs). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 14, p. 10183-10188, 1997.
- WALKER, P. R.; KOKILEVA, L.; LEBLANC, J. & SIKORSKA, M. Detection of the initial stages of DNA fragmentation in apoptosis. BioTechniques, v. 15, p. 1032-1040, 1993.

- 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. 61-107.
- _____, ROHEL, D.Z.; KUZIO, J. & FAULKNER, P. A cytopathological investigation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p10 gene function using insertion-deletion mutants. *J. Gen. Virol.*, v. 70, p. 187, 1989.
- WILSON, M. E. & CONSIGLI, R. A. Characterization of a protein kinase associated with purified capsids of the granulosis virus infecting *Plodia interpunctella*. *Virology*, v. 143, p. 516-525, 1985.
- WYLLIE, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, v. 284, p. 555-556, 1980.
- 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*, v. 377, p. 248-251, 1995.
- YANG, J.; LIU, X.; BHALLA, K.; KIM, C. N.; IBRADO, A. M.; CAI, J.; PENG, T.-I.; JONES, D. P. & WANG, X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome C from mitochondria blocked. *Science*, v. 275, p. 1129-1132, 1997.
- YEW, P. R. & BERK, A. J. Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature*, v. 357, p. 82-85, 1992.
- YOUNG, J. C.; MACKINNON, E. A. & FAULKNER, P. The architecture of the virogenic stroma in isolated nuclei of *Spodoptera frugiperda* cells *in vitro* infected by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Struct. Biol.*, v. 110, p. 141-153, 1993.
- YOUNG, L. S.; DAWSON, C. W. & ELIOPOULOS, A. G. Viruses and apoptosis. *Br. Med. Bull.*, v. 53, p. 509-521, 1997.

- YUAN, J.; SHAHAM, S.; LEDOUX, S.; ELLIS, H. M. & HORVITZ H. R. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. Cell, v. 75, p. 641-652, 1993.
- ZANOTTO, P. M. A.; KESSING, B. D. & MARUNIAK, J. E. Phylogenetic interrelationships among Baculoviruses: Evolutionary rates and host associations. J. Invertebr. Pathol., v. 62, p. 147-164, 1993.
- _____.; SAMPAIO, M. J. A.; JOHNSON, D. W.; ROCHA, T. L. & MARUNIAK, J. E. The *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene region: sequence analysis, gene product and structural comparisons. J. Gen. Virol., v. 73, p. 1049-1056, 1992.
- ZHOU, Q.; KREBS, J. F.; SNIPAS, S. J.; PRICE, A.; ALNEMRI, E. S.; TOMASELLI, K. J. & SALVESEN, G. S. Interactions of the baculovirus anti-apoptotic protein p35 with caspases. Specificity, kinetics and characterization of the caspase/p35 complex. Biochemistry, v. 37, p. 10757-10765, 1998.
- ZHU, H. SHEN, Y. & SHENK, T. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. J. Virol., v. 69, p. 7960-7970, 1995.