

**Boletim de Pesquisa 43**

---

**e Desenvolvimento** ISSN 1676 - 1340

Outubro, 2004

**APOPTOSE EM CÉLULAS DE *Bombyx mori* (BM-5) INDUZIDA POR  
*Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus**

República Federativa do Brasil  
*Luiz Inácio Lula da Silva*  
Presidente

**Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

*Roberto Rodrigues*  
Ministro

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

**Conselho de Administração**

*José Amauri Dimárzio*  
Presidente

*Clayton Campanhola*  
Vice-Presidente

*Alexandre Kalil Pires*  
*Dietrich Gerhard Quast*  
*Sérgio Fausto*  
*Urbano Campos Ribeiral*  
Membros

**Diretoria-Executiva da Embrapa**

*Clayton Campanhola*  
Diretor-Presidente

*Gustavo Kauark Chianca*  
*Herbert Cavalcante de Lima*  
*Mariza Marilena T. Luz Barbosa*  
Diretores-Executivos

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

*José Manuel Cabral de Sousa Dias*  
Chefe-Geral

*Maurício Antonio Lopes*  
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

*Maria Isabel de Oliveira Penteado*  
Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

*Maria do Rosário de Moraes*  
Chefe-Adjunto de Administração

# **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 43**

**APOPTOSE EM CÉLULAS DE *Bombyx mori* (BM-5)  
INDUZIDA POR *Anticarsia gemmatalis*  
nucleopolyhedrovirus**

Maria Elita Batista de Castro  
William Sihler  
Zilda Maria de Araújo Ribeiro  
Marlinda Lobo de Souza

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) – Brasília, DF CEP 70770-900 –

Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

### Comitê de Publicações

**Presidente:** *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

**Secretário-Executivo:** *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

**Membros:** *Arthur da Silva Mariante*

*Maria Alice Bianchi*

*Maria de Fátima Batista*

*Maurício Machain Franco*

*Regina Maria Dechechi Carneiro*

*Sueli Correa Marques de Mello*

*Vera Tavares de Campos Carneiro*

**Supervisor editorial:** *Maria da Graça S. P. Negrão*

**Normalização Bibliográfica:** *Maria Alice Bianchi e Maria Iara Pereira Machado*

**Editoração eletrônica:** *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2004): 150 unidades

A 644 Apoptose em células de *Bombyx mori* (BM-5) induzida por *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus / Maria Elita Batista de Castro ... [et al.] – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004.

15 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 43; 1676-1340)

1. *Bombyx mori* – células - apoptose. 2. Bicho da seda. 3. *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. I. Castro, Maria Elita Batista de. II. Série. 595.78 – CDD 21

## Sumário

Resumo .....	6
Abstract.....	7
Introdução.....	8
Materiais e Métodos .....	9
Resultados e Discussão .....	10
Referências Bibliográficas .....	11

**APOPTOSE EM CÉLULAS DE *Bombyx mori* (BM-5) INDUZIDA  
POR *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus**

**Maria Elita Batista de Castro<sup>1</sup>**  
**William Sihler<sup>2</sup>**  
**Zilda Maria de Araújo Ribeiro<sup>3</sup>**  
**Marlinda Lobo de Souza<sup>1</sup>**

**Resumo**

A susceptibilidade da linhagem celular BM-5 de *Bombyx mori* ao vírus de *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV-2D) foi avaliada, baseando-se em uma análise comparativa dos efeitos citopáticos e da síntese de proteínas virais detectados nas células BM-5 com os observados em células hospedeiras UFL-AG-286, uma linhagem de *Anticarsia gemmatalis*. O sistema de infecção BM-5/AgMNPV, observado por microscopia óptica, mostrou alterações morfológicas como hipertrofia celular, vacuolização do citoplasma, lise prematura das células, formação de corpos apoptóticos e ausência de poliedros. Além disso, o perfil eletroforético do DNA total das células apresentou fragmentos de tamanhos oligonucleosomais típicos de apoptose. Ao contrário da infecção de células hospedeiras (UFL-AG-286) com AgMNPV, que produziram altos níveis de partículas infecciosas e de síntese de peptídeos virais, células BM-5 não foram permissivas ao vírus AgMNPV. Estas células apresentaram uma infecção abortiva não sendo detectada síntese de proteínas virais mesmo em tempos muito tardios da infecção. A inibição da replicação viral com ausência de peptídeos virais deve ser uma consequência da ocorrência de apoptose ou ainda de restrições em etapas essenciais do ciclo de replicação do vírus.

---

<sup>1</sup>Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>2</sup>Biólogo, MSc, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>3</sup>Bióloga, MSc, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

## **APOPTOSIS IN *Bombyx mori* cells (BM-5) INDUCED BY *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus**

### **Abstract**

The susceptibility of the cellular line BM-5 from *Bombyx mori* to the *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV-2D) was evaluated based upon a comparative analysis of the cytopathic effects and viral protein synthesis detected in the BM-5 cells with those observed in natural host cells UFL-AG-286, an *Anticarsia gemmatalis* cell line. The infection system of BM-5/AgMNPV when observed by optic microscopy showed morphological alterations such as cell hypertrophy, vacuolization of the cytoplasm, premature lysis of the cells, formation of apoptotic bodies, and absence of polyhedra. Moreover, the electrophoretic profile of the total DNA from these cells presented nucleosome-sized fragments typical of apoptosis. In contrast to the infection of host cells (UFLAG 286) with AgMNPV, which produced high levels of infectious particles and viral polypeptide synthesis, BM-5 cells were not permissive to the AgMNPV virus. These cells presented an abortive infection with out detection of viral protein synthesis even at very late times of infection. The viral replication inhibition and absence or reduction of viral peptides might be a consequence of the occurrence of apoptosis or yet of restrictions in essential steps of the virus replication cycle.

## Introdução

Os vírus de inseto do gênero *Nucleopolyhedrovirus* (NPV), família *Baculoviridae*, possuem grandes genomas compostos de DNA fita dupla circular, variando de 80 a 200 kb (BLISSARD et al., 2000). O DNA é envolto por um capsídeo protéico em forma de bastonete, constituindo os nucleocapsídeos. Esses últimos são formados no núcleo de células infectadas e subseqüentemente envelopados formando vírions, que são as unidades infectivas dos baculovirus.

Durante o ciclo de infecção os baculovirus apresentam duas formas fenotipicamente distintas: BV – “budded virus” e PDV – “polyhedra-derived-virus” (GRANADOS e WILLIAMS, 1986). Os BVs ocorrem por “brotamento” da partícula viral através da membrana citoplasmática da célula hospedeira para o meio extracelular. Os PDVs possuem uma membrana sintetizada *de novo* no núcleo da célula infectada e são envelopados com um ou mais nucleocapsídeos por envelope, ocluídos em cristais protéicos denominados corpos de oclusão (“polyhedral inclusion bodies” – PIB). Embora esses vírions, BV e PDV, sejam genotipicamente idênticos, eles desempenham papéis distintos no ciclo de vida do vírus. Diferem quanto à morfologia e composição protéica, origem dos envelopes virais, e infectividade (BLISSARD e ROHRMANN, 1990; BRAUNAGEL e SUMMERS, 1994; BLISSARD, 1996).

Linhagens celulares de insetos têm sido utilizadas para estudo de infecção *in vitro*, no que se refere à especificidade de vírus e espectro de hospedeiros. Essas linhagens apresentam susceptibilidades diferentes quanto à permissividade para replicação viral (VAUGHN e DOUGHERTY, 1985). Uma linhagem é dita permissiva quando há replicação produtiva, isto é, todas as etapas do ciclo viral ocorrem, culminando na produção de corpos de oclusão e eventual lise da maioria das células infectadas. Linhagens não-permissivas são aquelas onde o vírus pode ou não induzir determinados efeitos citopáticos, mas na fase final da infecção não há produção de poliedros (CARPENTER e BILIMORIA, 1983; LIU, 1987). Em alguns sistemas celulares, os baculovirus podem induzir apoptose, um tipo de morte celular programada prematuramente, podendo reduzir ou eliminar a produção da progênie viral (CLEM et al., 1991; CLEM, 1997; TEODORO e BRANTON, 1997).

Este trabalho tem como objetivo investigar a possível ocorrência de apoptose em células BM-5, com base em informações anteriores de replicação do AgMNPV em sistemas celulares (CASTRO et al., 1997), onde a linhagem BM-5 apresentou uma infecção abortiva com lise celular muito semelhante à observada em sistemas de células

em apoptose. Para comprovação dessa informação, o sistema BM-5/AgMNPV foi analisado principalmente quanto aos efeitos citopáticos observados por microscopia óptica, fragmentação de DNA e síntese de proteínas virais.

## **Materiais e Métodos**

**Linhagens celulares e vírus:** As linhagens celulares, *Anticarsia gemmatalis* UFL-AG-286 (SIEBURTH e MARUNIAK, 1988) e *Bombyx mori* BM-5 (GRACE, 1967) foram mantidas a 27°C, nos meios de cultura TC-100 e TNMFH (GIBCO BRL Life Technologies), suplementados com 10% soro bovino fetal, respectivamente. O vírus utilizado foi o clone viral AgMNPV-2D (JOHNSON e MARUNIAK, 1989).

**Infecção de células:** Células UFL-AG-286 e BM-5 foram sedimentadas em frascos T-25 ( $2 \times 10^6$  células/frasco) e incubadas com 1ml de inóculo do vírus AgMNPV-2D por 1 hora para adsorção. Após esse período, o inóculo foi retirado e 5ml de meio completo foram adicionados ao sistema e a incubação mantida a 27°C. Os diferentes estágios de infecção foram monitorados em microscópio de inversão Olympus (IMT-2).

**Purificação de DNA total:** Em diferentes tempos de infecção (6, 12, 24 e 48h.p.i.), células foram lisadas com tampão SDS 1%; EDTA 0,1M; Tris 0,4M, pH 8.0 e armazenadas a -20°C. Para purificação do DNA, 1mg/ml de proteinase K foi adicionado aos lisados, e então incubados a 37°C por 12 horas. Em seguida, o DNA foi extraído com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), precipitado com acetato de sódio 3M, pH 5.6 e etanol absoluto (-20°C), e ressuspensão em 50µl de tampão TE (Tris-HCl 10mM, pH 8.0; EDTA 1mM). As amostras foram tratadas com 0.4 mg/ml de RNase A (37°C/30min) e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5%. Após a corrida, o gel foi corado com 0,5µg/ml de brometo de etídeo para visualização e verificação da fragmentação de DNA.

**Síntese de proteínas:** Células BM-5 ( $2 \times 10^6$  células/poço de 35 mm<sup>2</sup>) foram infectadas com AgMNPV-2D para observação da síntese de proteínas. Após a infecção, as células foram lavadas com tampão salino fosfato (PBS, pH 6.2) (140mM NaCl, 40mM KCl, 1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10,5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e mantidas neste tampão por 30min antes de completar cada período de infecção (6, 12, 24 e 48hpi.). Em seguida, as células foram submetidas a um pulso de 1 hora com 100µCi de L[<sup>35</sup>S] metionina, ressuspensas, coletadas por centrifugação (2500rpm/5 min), lavadas com PBS e armazenadas a -80°C. Para análise das amostras, os sedimentos foram dissolvidos em 100µl de tampão de amostra (SDS

2%, glicerol 15%, azul de bromofenol 0,002%,  $\beta$ -mercaptoetanol 1%), fervidos por 3min e então mantidos no gelo por 15min. Deste sistema, 20 $\mu$ l foram fracionados por eletroforese em gel de poliacrilamida-sódio dodecil sulfato 14% (SDS-PAGE). O gel foi tratado com solução “amplify” (Amersham, Life Science), sob condições recomendadas pelo fabricante, seco sob vácuo e exposto ao filme raio-X (Kodak AR-5X-Omat) a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## Resultados e Discussão

Células BM-5 apresentaram características morfológicas de lise quando infectadas com o vírus AgMNPV-2D, como preliminarmente descrito em nosso trabalho (CASTRO, et al., 1997). A análise de microscopia óptica mostrou que após 6 horas de infecção, as células BM-5 apresentaram hipertrofia tornando-se um pouco mais arredondadas. Em tempos posteriores da infecção, as alterações morfológicas tornaram-se mais acentuadas, destacando a formação de vacúolos e ramificações, seguidas de lise em aproximadamente 70% das células infectadas (48hpi.) (Fig. 1). Essas células apresentaram lise típica de apoptose, não sendo constatada a presença de partículas virais (PIBs) em qualquer estágio da infecção. Por outro lado, em sistemas UFL-AG-286 com AgMNPV-2D, conhecidos como altamente produtivos, grande número de poliedros (PIBs) foram observados nos núcleos das células (Fig. 2).

Pela análise do DNA total de células BM-5 infectadas com AgMNPV-2D e não infectadas (controle) em gel de agarose, pode-se observar a presença de fragmentos do tamanho de oligonucleosomos (Fig. 3), similares àqueles detectados em células exibindo o fenômeno de apoptose (CLEM et al., 1991). Como esperado, o DNA de células BM-5 (controle) e de células em estágios iniciais de infecção permaneceram intactos na região de alto peso molecular.

Com relação à cinética da síntese de proteínas, observou-se que enquanto em infecções UFL-AG-286/AgMNPV-2D eram detectados altos níveis de síntese de peptídeos virais (poliedrina 33kDa) e conseqüente diminuição de síntese de proteínas celulares, em infecções BM-5/AgMNPV-2D não se detectou a presença de peptídeos virais. Embora neste sistema de infecção não tenha sido observada qualquer expressão viral, a síntese de proteínas celulares foi severamente reduzida (Fig.4). Portanto, células BM-5 não foram permissivas ao vírus AgMNPV-2D, resultando em uma infecção abortiva. A inibição da replicação viral com ausência de peptídeos virais deve ser uma conseqüência da ocorrência de apoptose ou ainda de restrições em etapas determinantes do ciclo de

replicação do vírus, tais como incompatibilidade de fatores hospedeiros e/ou níveis insuficientes ou falta de produtos virais essenciais para expressão gênica.

## Referências Bibliográficas

BLISSARD, G. W. Baculovirus-insect cell interactions. **Cytotechnology**, v. 20, p. 73- 93, 1996.

BLISSARD, G. W.; BLACK, B.; CROOK, N.; KEDDIE, B. A.; POSSEE, R. D.; RHORMANN, G. F.; THEILMANN, D.; VOLKMAN, L. **Baculoviridade**. In: REGENMORTEL VAN, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. B. (Ed.). Virus taxonomy classification and nomenclature of viruses: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, 2000. p. 195-202.

BLISSARD, G. W.; RHORMANN, G. F. Baculovirus diversity and molecular biology. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, CA, v. 35, p. 127-155, 1990.

BRAUNAGEL, S. C.; SUMMERS, M. D. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, PDV, and ECV viral envelopes and nucleocapsids: structural proteins, antigens, lipid and fatty acid profiles. **Virology**, New York, v. 202, p. 315 – 328, 1994.

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

CASTRO, M. E. B; SOUZA, M. L.; ARAUJO, S.; BILIMORIA, S. L. Replication of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus in four lepidopteran cell lines. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 69, p. 40-45, 1997.

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

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

GRACE, T. D. C. Establishment of line of cells from the silkworm *Bombyx mori*. **Nature**, London, v. 216, p. 613, 1967.

GRANADOS, R. R.; WILLIAMS, K. A. ***In vivo* infection and replication of baculoviruses**. In: GRANADOS, R. R.; FEDERICI, B. A. (Ed.). *The Biology of Baculoviruses: biological properties and molecular biology*. Boca Raton: CRC, 1986. v. 1, p. 89-108.

JOHNSON, D. W.; MARUNIAK, J. E. Physical map of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus (AgMNPV-2) DNA. **Journal of General Virology**, London, v. 70, p. 1877-1883, 1989.

LIU, H. S. **Host specific expression of baculovirus, *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus, in insect cell lines**. 1987. não paginado. Tese (Doutorado) - Texas Tech University, Lubbock, TX.

SIEBURTH, P. J.; MARUNIAK, J. E. Growth characteristics of a continuous cell line from velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: *Noctuidae*). **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, Gaithersburg, US, v. 24, p. 195-198, 1988.

TEODORO, J. G.; BRANTON, P. E. Minireview: regulation of apoptosis by viral gene products. **Journal of Virology**, Washington, v. 71, p. 1739-1746, 1997.

VAUGHN, J. L.; DOUGHERTY. **The replication of baculoviruses**. In: MARAMOROSCH, K; SHERMAN, K. E. (Ed.). *Viral insecticides for biological control*. Orlando: Academic Press, 1985. p. 569-633.

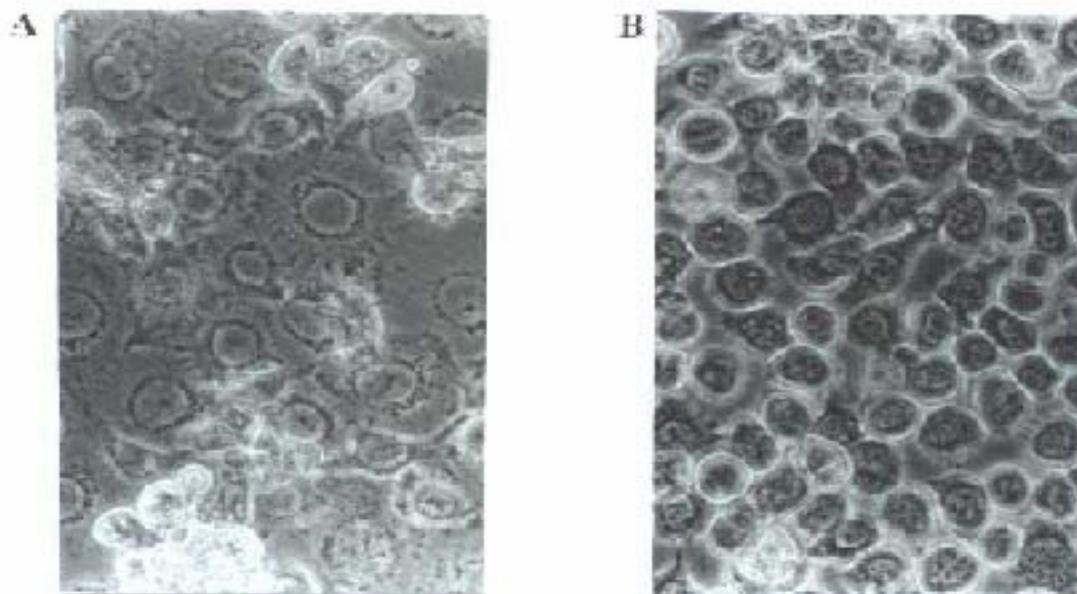


Fig. 1– Células de *Bombyx mori* BM-5 infectadas com *Anticarsia gemmatilis* MNPV (A); células BM-5 controle (B).

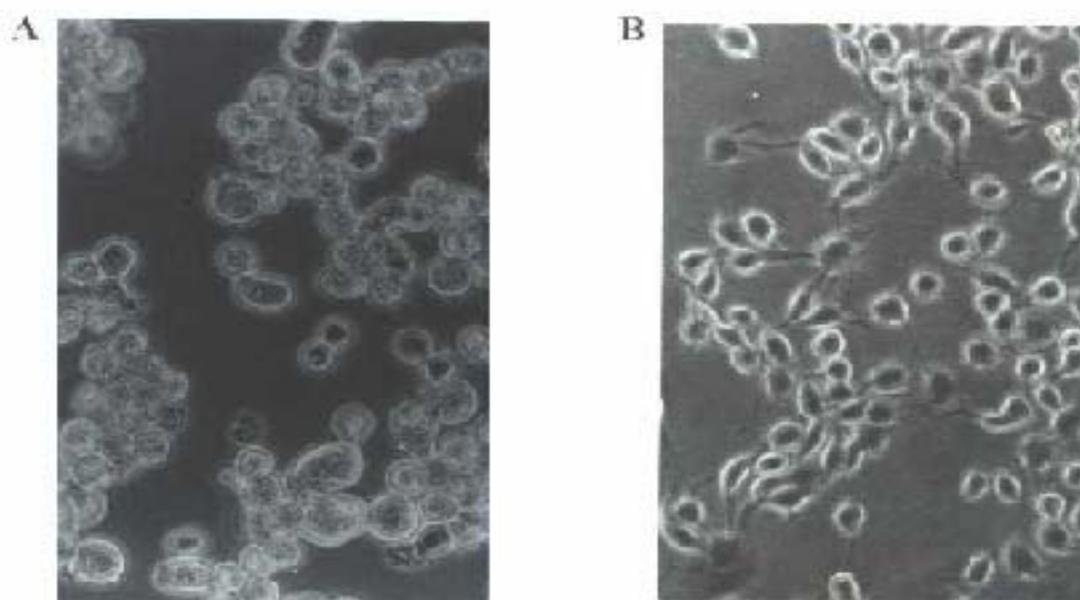
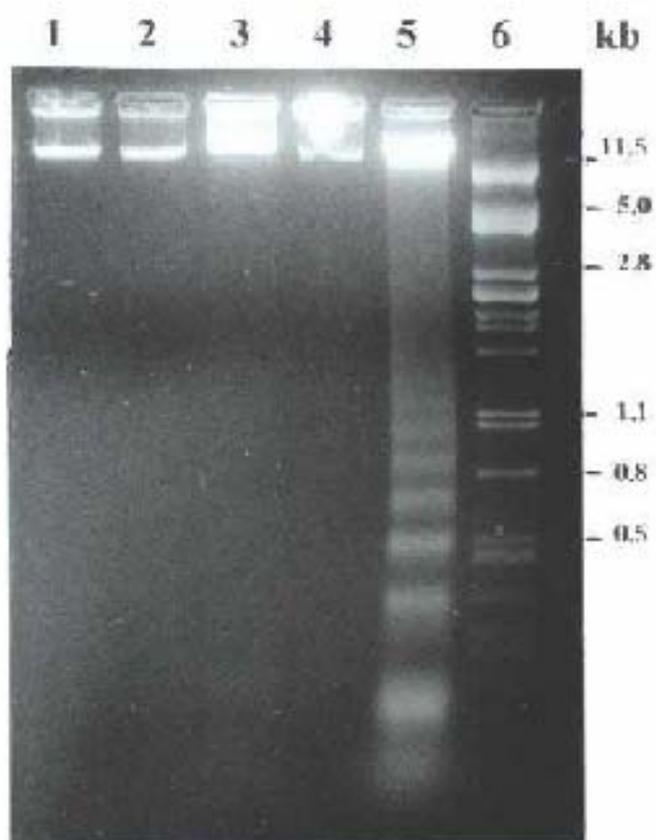
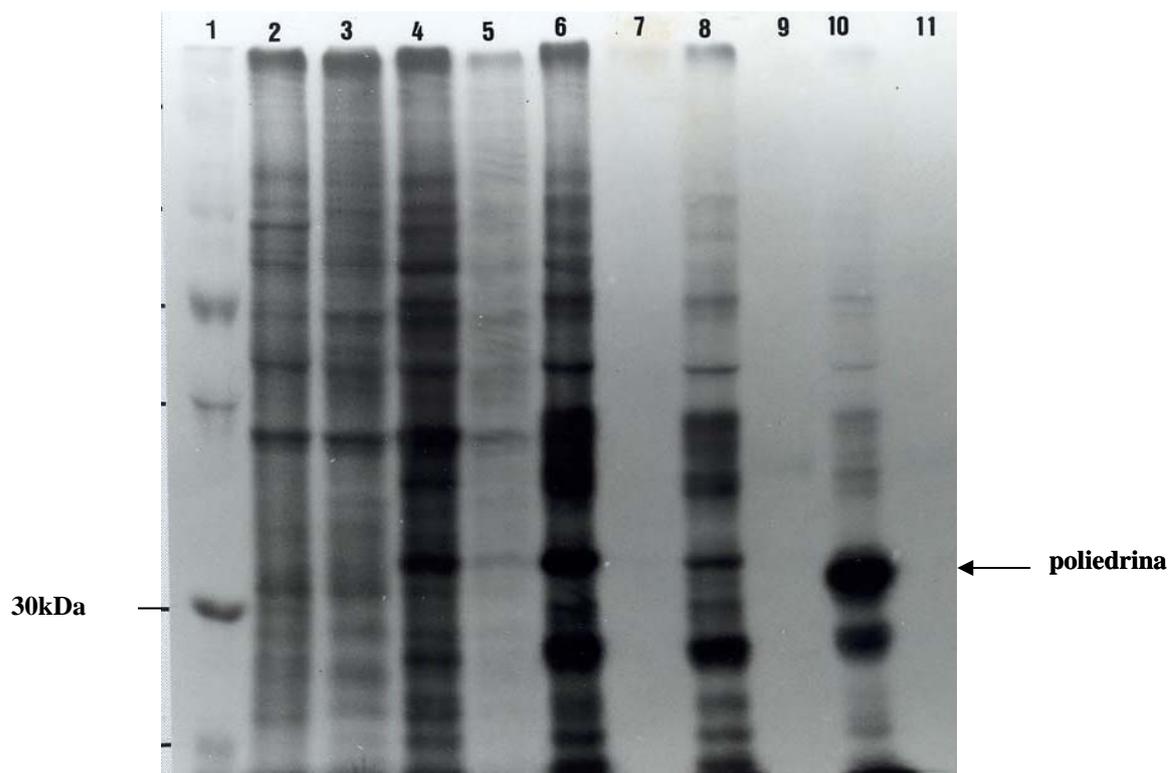


Fig. 2– Células de *Anticarsia gemmatilis* UFLAG 286 infectadas com *Anticarsia gemmatilis* MNPV (A); células UFL-AG-286 controle (B).



**Fig. 3**– Análise de DNA total de células BM-5 infectadas com *Anticarsia gemmatalis* MNPV. Eletroforese em gel de agarose 1,5%, (1) BM-5 controle, (2) 6h p.i., (3) 12h p.i., (4) 24h p.i., (5) 48h p.i., (6) DNA  $\lambda$ /PstI.



**Fig. 4 – Cinética de síntese de proteínas de células UFL-AG-286 e BM-5 infectadas com *Anticarsia gemmatalis* MNPV. (1) peso molecular, (2) UFL-AG-286 controle, (4) 6hp.i., (6) 12h.p.i., (8) 24hp.i., (10) 48hp.i.; e (3) BM-5 controle, (5) 6hp.i., (7) 12hp.i., (9) 24hp.i., (11) 48hp.i.**