

**Redução na morte celular pela expressão transiente do gene *iap-3* de
Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) sob a ação
de diferentes agentes indutores de apoptose**

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

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Ernesto Paterniani
Helio Tollini
Marcelo Barbosa Saintive
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Silvio Crestana
Diretor Presidente

José Geraldo Eugênio de França
Kepler Euclides Filho
Tatiana Deane de Abreu Sá
Diretores Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Sousa Dias
Chefe-Geral

Maurício Antônio 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 112

Redução na morte celular pela expressão transiente do gene *iap-3* de *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) sob a ação de diferentes agentes indutores de apoptose

**Maria Elita Batista de Castro
Elisa Filgueiras Soares
Zilda Maria de Araújo Ribeiro
Bergmann Moraes Ribeiro**

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) 3348-4739 Fax:

(61) 3340-3666 <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 Iara Pereira Machado*

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

1ª edição

1ª impressão (2005):

R 312 Redução na morte celular pela expressão transiente do gene *iap-3* de *Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) sob a ação de diferentes agentes indutores de apoptose / Maria Elita Batista de Castro ... [et. al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.

20p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos

Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; 112)

1. *Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV). 2. Gene *iap-3*. 3. Apoptose - indutores. I. Castro, Maria Elita Batista de. II. Soares, Elisa Filgueiras. III. Ribeiro, Zilda Maria de Araújo. IV. Ribeiro, Bergmann Morais. V. Série.

632.96 – CDD 21

Sumário

Resumo	6
Abstract.....	8
Introdução.....	9
Materiais e Métodos	11
Resultados e Discussão	13
Efeito da expressão do gene <i>iap-3</i> de AgMNPV em células de <i>A. gemmatalis</i> UFL-AG-286 tratadas com indutores apoptóticos	13
Análise de fragmentação de DNA internucleosomal.....	16
Referências Bibliográficas	17

Redução da morte celular pela expressão transiente do gene *iap-3* de *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) sob a ação de diferentes agentes indutores de apoptose.

Maria Elita Batista de Castro¹
Elisa Filgueiras Soares²
Zilda Maria de Araújo Ribeiro³
Bergmann Morais Ribeiro⁴

Resumo

Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) é o baculovirus mais usado como bioinseticida em programas de controle biológico no mundo. O vírus mutante vApAg é derivado de AgMNPV e induz apoptose em células de *A. gemmatalis*. Apoptose pode ser um mecanismo de defesa do hospedeiro em resposta a uma infecção viral, onde as células infectadas se suicidam numa tentativa de evitar que a infecção viral se alastre pelo organismo. Os baculovirus possuem genes (*p35* e *iap*) codificadores de proteínas anti-apoptóticas e, pela expressão dos mesmos, são capazes de se replicar eficientemente nas células do hospedeiro. No presente trabalho, analisou-se o efeito da expressão do gene *iap-3* de AgMNPV na morte celular, em presença de diferentes indutores apoptóticos. Este gene foi clonado no plasmídeo pBluescript sob o comando do promotor *ie-1* de AgMNPV. O plasmídeo recombinante construído foi então utilizado para a transfecção, mediada por lipossomos, em células de *A. gemmatalis* UFL-AG-286. Três tipos de agentes (respectivamente, biológico, químico e físico) foram utilizados para induzir apoptose nas células de inseto: o vírus mutante vApAg, actinomicina D e radiação ultravioleta. O efeito da expressão transiente do gene *iap-3*, quanto a sua atividade anti-apoptótica, foi determinado pela observação das alterações morfológicas das células por microscopia de luz, contagem de células viáveis com azul de tripan e análise da fragmentação do DNA em eletroforese em gel de agarose 1,5%. O gene *iap-3* foi capaz de inibir apoptose induzida pelo vírus mutante vApAg, resultando em uma viabilidade celular de 27% em relação aos 7% do controle positivo. A viabilidade celular das células tratadas com actinomicina D também aumentou quando houve a transfecção do gene *iap-3*, de 31% para 83%. Entretanto, o gene *iap-3* não foi capaz de inibir apoptose induzida pela radiação UV, obtendo uma viabilidade celular de apenas 19% comparado a 13% do controle positivo. Estes resultados estão de acordo com as alterações morfológicas observadas nas células e foram confirmados pela análise da fragmentação de DNA. A atividade anti-apoptótica do

¹Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

²Bióloga, MSc, Universidade de Brasília/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³Bióloga, MSc, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴Biólogo, PhD, Universidade de Brasília

gene *iap-3* verificada contra o vírus indutor de apoptose vApAg e o indutor químico actinomicina D demonstra a sua funcionalidade. Até o presente, apenas o gene *iap-3* de AgMNPV foi localizado e caracterizado quanto a sua atividade anti-apoptótica

Palavras-chave: AgMNPV, gene *iap-3*, indutores de apoptose.

Financiamento: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Cell death reduction by transient expression of *Anticarsia gemmatalis* MNPV-*iap3* gene under action of different apoptosis inducing agents.

Abstract

Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) is the world most used baculovirus as bioinsecticide in biological control programs. The mutant virus vApAg is derived from AgMNPV and induces apoptosis in *A. gemmatalis* cells. Apoptosis can be a host defense mechanism in response to a viral infection, where infected cell undergo suicide in an attempt to avoid the spreading of infection throughout the organism. Baculovirus possess genes (*p35* and *iap*) coding for anti-apoptotic proteins and due to their expression they are capable of replicating efficiently in their host cells. In the present work, the effect of the expression of the AgMNPV-*iap 3* gene on the cell death was analyzed in presence of different apoptotic inducers. This gene was cloned into plasmid pBluescript under the control of the AgMNPV *ie-1* promoter. The constructed recombinant plasmid was then used for transfections in *A. gemmatalis* UFL-AG-286 cells mediated by liposomes. Three types of agents (biological, chemical and physical, respectively) were utilized to induce apoptosis on the insect cells: the mutant vApAg, actinomycin D and ultraviolet radiation. The effect of the transient expression of the gene *iap-3* concerning to its anti-apoptotic activity, was determined by the observation of the morphologic alterations of the cells using an inverted light microscope, counting of viable cells with trypan blue and analysis of DNA fragmentation in 1.5% agarose gels. The *iap-3* gene was capable of inhibiting apoptosis induced with the mutant virus vApAg, resulting in a cellular viability of 27% in relation to 7% of the positive control. The cellular viability of the cells treated with actinomycin D also increased when the *iap-3* was transfected into insect cells, from 31% to 83%. However, the *iap-3* gene was not capable of inhibiting apoptosis induced by UV radiation, with a cellular viability of only 19% compared to 13% of the positive control. These results are in accordance with the observed morphologic alterations in the cells and had been confirmed by the analysis of the DNA fragmentation. The anti-apoptotic activity of the gene *iap-3* verified against the mutant virus, vApAg, and the chemical inductor, actinomycin D, demonstrates its functionality. To date, only the *iap-3* of AgMNPV was localized and characterized regarding its anti-apoptotic activity.

Introdução

Apoptose é um mecanismo de defesa do hospedeiro em resposta a uma infecção viral, em que as células se suicidam, reduzindo ou até eliminando a progênie viral. Assim, os vírus desenvolveram estratégias para evitar ou atrasar a apoptose celular (CLEM, 1997). Em baculovirus, existem dois genes virais que inibem a apoptose em células infectadas: *p35* e *iap*.

A proteína P35 é encontrada apenas nos baculovirus (seis espécies de baculovirus já foram descritos) e ela inibe a atividade das caspases, bloqueando a apoptose (BUMP et al., 1995 revisado por CLEM, 1997). As proteínas IAP constituem uma família cujos membros são descritos em baculovirus, insetos, nematóides e humanos e são capazes de inibir a ativação das pro-caspases (HUANG et al., 2000; SESHAGIRI e MILLER, 1997). Estas proteínas possuem uma região amino-terminal, denominada de seqüência BIR (“baculoviral iap repeat”), que parece ser essencial para a atividade anti-apoptótica (MILLER, 1999; VUCIC et al., 1997), e uma região carboxi-terminal, um domínio de ligação a zinco denominado “RING finger”, que parece estar envolvido na ubiquitinação da própria proteína IAP (YANG et al., 2000) e provavelmente das caspases a ela ligadas (YANG et al., 2000; WILSON et al., 2002; BERGMANN et al., 2003). Alguns baculovirus possuem mais de um gene *iap*; porém, nem todos parecem possuir atividade anti-apoptótica (VILAPLANA e O’REILLY, 2003).

Estudos de infecção com o baculovirus *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) e mutantes derivados de AcMNPV contendo deleções no gene inibidor de apoptose *p35* foram importantes para elucidar os possíveis mecanismos que levam à apoptose. Em trabalhos com indução de apoptose por baculovirus foi descoberto que actinomicina D, um inibidor da síntese de RNA, é capaz de induzir rapidamente apoptose em células de *Spodoptera frugiperda* (SF-21), um evento similar à apoptose induzida pelo vírus mutante vAcAnh (AcMNPV com gene *p35* deletado). A proteína P35 foi mostrada ser também capaz de bloquear a apoptose induzida por um agente não viral na ausência de outros genes virais (CARTIER et al., 1994; CLEM e MILLER, 1994).

Recentemente, durante a construção de um recombinante de *Anticarsia gemmatalis* MNPV foi detectado um vírus mutante, vApAg, capaz de induzir apoptose em suas células hospedeiras de *Anticarsia gemmatalis* (UFL-AG-286) e de se replicar normalmente em células de *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1-4) (SILVEIRA et al., 1999; CASTRO e RIBEIRO, 2001). Ao investigar o baculovírus não recombinante, AgMNPV, um gene da família IAP, *iap-3*, foi localizado e seqüenciado, possuindo 864 nucleotídeos que codificam uma proteína de 287 aminoácidos contendo os domínios BIR (“baculoviral iap repeats”) e o domínio “RING finger” (CARPES et al., 2005). Com o sequenciamento do genoma completo de AgMNPV, outros genes da mesma família (*iap1* e *iap2*) foram identificados, porém a sua atividade ainda não foi determinada.

O uso de genes anti-apoptóticos como ferramentas para estudos de interação vírus-hospedeiro tem sido muito útil para entender, por exemplo, os mecanismos pelos quais os baculovírus têm a capacidade de entrar nas células, mas replicar somente em certas células de insetos, ou mesmo estudar os efeitos da apoptose na replicação e patogênese dos baculovírus. Assim, a identificação e caracterização desses genes no baculovírus *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) são investigações bastante interessantes, principalmente devido à sua importância como bioinseticida em programas de controle biológico contra a lagarta da soja. Há mais de 20 anos têm-se desenvolvido no Brasil o maior programa de controle biológico com aplicação do bioinseticida “Baculovirus anticarsia” em cerca de 1,5 milhões de hectares de plantações de soja (MOSCARDI et al., 2002).

Dentro deste enfoque, no presente trabalho, verificou-se o efeito da expressão do gene *iap-3* de AgMNPV na inibição de apoptose de células de *A. gemmatalis* UFL-AG-286 induzida por três tipos de agentes, respectivamente biológico, químico e físico: vírus mutante vApAg, actinomicina D e radiação ultravioleta.

Materiais e Métodos

Construção do plasmídeo recombinante pIE1IAPAg: para clonagem do gene inibidor de apoptose *iap-3* de AgMNPV, o plasmídeo pIE1, que contém o promotor *ie-1* de AgMNPV clonado no plasmídeo pBluescript, foi digerido com a enzima *Sall* e tratado com a fosfatase alcalina CIAP (“calf intestinal alkaline phosphatase”) (GIBCO-BRL), a 37°C por 1h. Em seguida, a enzima foi desativada por extração com fenol e o DNA precipitado com etanol. Este plasmídeo foi usado então para a ligação do gene *iap-3*, isolado do plasmídeo pIAPAg com a enzima *Sall*. A reação de ligação foi feita na proporção de 3:1 (inserto: vetor), a 14°C por 16h, com a enzima T4 DNA ligase (GIBCO-BRL) e seu respectivo tampão 10X. A mistura da ligação foi usada para transformar células competentes de *E.coli* (linhagem XL-1-Blue) e os clones positivos foram selecionados (pIE1IAPAg).

Transfecção de células mediada por lipossomos – em todos os experimentos de transfecção os plasmídeos pIE1IAPAg e pBS foram usados nas concentrações de 2, 5 ou 7µg de DNA em 100µl de meio TC-100 sem soro. Células de *Anticarsia gemmatalis*, UFL-AG-286, foram sedimentadas na concentração final de 1×10^5 células/poço (placa de 6 poços) completando para um volume final de 2ml de meio TC-100 suplementado com soro fetal bovino 10% e incubadas em seguida a 27°C por 24h. As soluções de DNA do plasmídeo recombinante pIE1IAPAg foram preparadas com 10µl de Cellfectin (Invitrogen), um reagente que contém lipossomos. Esse mesmo procedimento foi feito para transfecções-controle com o plasmídeo pBS, sem inserto. As soluções de DNA com Cellfectin foram misturadas e incubadas à temperatura ambiente por 15min. Em seguida, as células foram lavadas com 2ml de meio TC-100 sem soro e as soluções de DNA foram adicionadas às células completando com 800µl de meio sem soro. Após 5 horas de incubação, o meio foi substituído por meio TC-100 completo e as células transfectadas mantidas a 27°C até completar 24 horas pós-transfecção (hp.t.). Cada experimento foi realizado em triplicata.

Indução de apoptose por agentes biológico, químico e físico - (a) agente biológico - mutante vApAg: Células UFL-AG-286 transfectadas com o plasmídeo recombinante pIE1IAPAg e células com transfecções-controle (plasmídeo pBS) foram infectadas em 24hp.t. com o vírus indutor de apoptose vApAg com uma multiplicidade de infecção (MOI) igual a 5. Após 1h de adsorção viral, as células foram lavadas com 2ml de meio sem soro e incubadas em 2ml de meio completo a 27°C por 48h. Como controle positivo foram utilizadas células UFL-AG-286 infectadas com o vírus vApAg, nas mesmas condições, e como controle negativo foram utilizadas células UFL-AG-286 não infectadas. Em 48hp.i., células UFL-AG-286 transfectadas e infectadas e os controles foram observadas em um microscópio de luz invertida (Olympus) e fotografadas, sendo em seguida coletadas por centrifugação a 1000xg/5min. e ressuspendidas em PBS(pH 6.2).

(b) Actinomicina-D: Células UFL-AG-286 transfectadas com o plasmídeo recombinante pIE1IAPAg, após 24 horas, foram submetidas ao tratamento com actinomicina-D, um indutor de apoptose, na concentração de 1µg/ml em um volume total de 1ml de meio TNMFH sem soro por poço. Essas células foram incubadas a 27°C por 20h. Como controles foram usadas células UFL-AG-286 não tratadas e células UFL-AG-286 não transfectadas tratadas com 1µg/ml de actinomicina-D.

(c) Radiação ultravioleta: Células UFL-AG-286 transfectadas com o plasmídeo recombinante pIE1IAPAg, após 24 horas, foram submetidas à radiação ultravioleta, um agente causador de apoptose, em um transiluminador padrão durante 2 minutos, o meio TC-100 completo foi então colocado e as células incubadas a 27°C por 20h. Como controles foram usadas células UFL-AG-286 sem radiação e células UFL-AG-286 não transfectadas submetidas à radiação ultravioleta.

Análise de apoptose - a observação das células foi feita 48 h pós-infecção (p.i.) ou a 20 h após tratamento com actinomicina D ou UV por microscopia óptica de contraste de fase. A quantificação da inibição de apoptose foi feita por

contagem de células viáveis diferenciadas por azul de tripan (0,04%) com a ajuda de um hemacitômetro. A determinação da inibição de apoptose foi realizada por análise da fragmentação do DNA celular.

Purificação de DNA total - Células UFL-AG-286 que foram transfectadas com 2µg do plasmídeo pIE1IAPAg e tratadas com os indutores de apoptose, e as células do controle positivo e do controle negativo, em 48hp.i. foram centrifugadas a 1000xg por 10min. e o sobrenadante em 10.000xg por 15min. As células e/ou corpos apoptóticos foram tratados com tampão de lise (Tris 100mM, pH7.5; EDTA 2.5mM; TritonX-100 0,2%) por 1h em temperatura ambiente e o DNA total extraído com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), precipitado com acetato de sódio 3M, pH 5.6 e etanol (-20°C), ressuspensão em 50µl de tampão TE (Tris-HCl 10mM, pH 8.0; EDTA 1mM), e tratadas com RNase (50 µg/ml). As amostras foram 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.

Resultados e Discussão

Efeito da expressão do gene *iap-3* de AgMNPV em células de *A. gemmatalis* UFL-AG-286 tratadas com indutores apoptóticos

Alterações morfológicas- O plasmídeo recombinante pIE1IAPAg foi utilizado para transfecção das células UFL-AG-286 para verificar a atividade anti-apoptótica do gene *iap-3* de AgMNPV. Células transfectadas com pIE1IAPAg e infectadas com vApAg, observadas a 48 hp.i., exibiram características de lise celular, porém bastante reduzida quando comparada ao controle positivo. Essa redução pode ser detectada pela baixa densidade de corpos apoptóticos visualizados por microscopia óptica (Fig.1C). Os controles utilizados nesses ensaios de expressão apresentaram as seguintes características morfológicas: células UFL-AG-286 infectadas com vApAg (controle positivo) - exibiram mudanças morfológicas com características típicas de apoptose (Fig.1B); células

transfectadas com o plasmídeo pBS sem inserto e infectadas com o vírus vApAg – mostraram características similares ao controle positivo (figura não mostrada); células UFL-AG-286 (controle negativo) - não apresentaram mudanças morfológicas (Fig.1A).

Células tratadas com o indutor químico actinomicina-D também exibiram, 20 h após o tratamento, características típicas de apoptose, porém em menor intensidade que as células infectadas com vApAg. No sistema celular de transfecção com pIE1IAPAg e tratamento com actinomicina-D, as células entraram em apoptose em uma quantidade visivelmente mais baixa que o controle positivo (células UFL-AG-286 com actinomicina-D) (Fig. 3).

A inibição verificada nesses ensaios de expressão, mesmo sendo uma inibição parcial, está em conformidade com informações publicadas de que os baculovirus podem se beneficiar com a expressão de genes anti-apoptóticos, como os genes homólogos a *iap*, para promover sua replicação (CLEM, 1997; MAGUIRE et al., 2000), de maneira que as proteínas codificadas por esses genes agem diretamente na via de sinalização de apoptose ou na ativação de caspases, impedindo que a célula se auto-destrua (TSCHOPP et al., 1998).

Células expostas à radiação ultravioleta apresentaram, 20h após o tratamento, as mesmas características de lise celular que as células submetidas aos outros agentes indutores de apoptose. Entretanto, a transfecção das células com o plasmídeo pIE1IAPAg não foi capaz de inibir apoptose causada por UV, sendo possível observar apenas uma baixa quantidade de células que não haviam entrado em apoptose (Fig. 5).

Viabilidade celular: Entre os indutores de apoptose utilizados, o mais efetivo foi o vírus mutante vApAg, que resultou numa porcentagem de viabilidade celular de apenas 7,3%, ou seja, 92,7% das células entraram em apoptose quando infectadas. Nas células transfectadas com o plasmídeo pIE1IAPAg e infectadas com vApAg, o gene *iap-3* apresentou uma atividade anti-apoptótica, resultando em um aumento na porcentagem de células viáveis a medida que se aumentava a quantidade de DNA plasmidial. Como a viabilidade celular do

controle positivo (células UFL-AG-286 infectadas com vApAg) foi mais baixa comparando com os outros indutores apoptóticos testados, as porcentagens de células viáveis transfectadas com o plasmídeo pIE11APAg e infectadas com vApAg também foram mais baixas. Apesar disso, a diferença estatística foi significativa do controle positivo, e não houve diferença significativa entre as concentrações de DNA do plasmídeo contendo o gene *iap-3*. Assim, foi observado que a expressão transiente do gene *iap-3* foi eficaz na inibição de apoptose mesmo na presença do indutor vApAg, independente das concentrações de DNA plasmidial utilizadas (Fig.2).

A indução de apoptose em células UFL-AG-286 pelo inibidor de síntese de RNA actinomicina-D não é o único exemplo de células que entram no programa de morte celular quando tratados com inibidores de síntese de RNA, as células SF-21, de *Spodoptera frugiperda*, também entram em apoptose (CLEM e MILLER, 1994). A actinomicina-D age por mecanismos diferentes de outros inibidores de síntese de RNA, como α -amanitina e DRB (“dichlorobenzimidazole”) que agem principalmente inibindo a RNAPolimerase II: a actinomicina-D age se ligando ao DNA e inibindo a síntese de RNA (GOLDBERG et al., 1962). O gene *iap-3* foi capaz de inibir a apoptose de células tratadas com actinomicina-D, que apresentaram uma viabilidade de mais de 80% com a maior concentração de DNA plasmidial transfectada. Porém, esse resultado deve ser comparado com o controle positivo (células UFL-AG-286 tratadas com actinomicina-D), onde a porcentagem de células que entraram em apoptose não foi tão alta quando comparada aos outros tratamentos com indutores de apoptose (vApAg e radiação ultravioleta), resultando em 31,2% de viabilidade celular (Fig. 4).

A radiação ultravioleta é absorvida pelos cromóforos endógenos das células levando a formação de espécies reativas oxidantes (fotoprodutos) que dão início a mutagênese e apoptose (ZHUANG e KOICHEVAR, 2003). O mecanismo envolvido na eliminação de lesões no DNA induzidos pela luz ultravioleta é o reparo de excisão de nucleotídeos (SLOUN et al., 1999). A apoptose induzida nas células UFL-AG-286 submetidas à radiação ultravioleta resultou em uma viabilidade celular bem menor que o teste com actinomicina-D, com 15,8% de células viáveis;

entretanto, a viabilidade foi maior comparada ao teste com o vírus mutante vApAg. O gene *iap-3* não foi capaz de inibir a apoptose nas células tratadas com a luz ultravioleta. A porcentagem de viabilidade celular nas células transfectadas com DNA do plasmídeo contendo o gene *iap-3* foi similar ao controle positivo (células UFL-AG-286 tratadas com luz ultra-violeta) (Fig. 6). O pequeno aumento observado na viabilidade celular não teve diferença significativa com relação ao controle positivo para ser considerado como uma inibição de apoptose. A radiação ultravioleta deve ativar um mecanismo de apoptose, diferente daquele induzido pelo vírus mutante vApAg ou pelo indutor químico actinomicina-D, em que o gene *iap-3* não é capaz de agir e por isso não consegue bloquear esse tipo de apoptose. A literatura relata que as proteínas IAP de humanos conseguem inibir as caspases 3 e 7 maduras (DEVERAUX et al., 1997, 1998; ROY et al., 1997), entretanto, o efeito inibitório é bem mais fraco que aquele observado pela proteína P35: enquanto P35 consegue atingir um efeito inibitório máximo estando na mesma molaridade que as caspases, as IAP precisam estar em uma molaridade em excesso para atingir um nível de inibição de apoptose razoável (CHANG e YANG, 2000). A razão da expressão transiente do gene *iap-3* nas células transfectadas e submetidas à luz ultravioleta não ser capaz de inibir apoptose também poderia ser atribuída à pequena quantidade de proteína expressa nessas células, o que ainda poderia explicar a incompleta inibição de apoptose observada nas células transfectadas com o plasmídeo contendo o gene *iap-3* e infectadas com o vírus vApAg.

Análise de fragmentação de DNA internucleosomal - Células UFL-AG-286 transfectadas com o plasmídeo pIE1IAPAg, contendo o gene inibidor de apoptose (gene *iap-3*), apresentaram níveis de inibição diferentes para cada indutor de apoptose utilizado. Ensaio de transfecção utilizando o indutor vApAg, o DNA das células se manteve intacto, não sendo detectada fragmentação típica de apoptose com fragmentos oligonucleossomais como observado no controle positivo (células UFL-AG-286 infectadas com vApAg) (Fig.7). Com o indutor actinomicina-D o produto da expressão do gene *iap-3* não foi capaz de inibir

totalmente a apoptose induzida pelo agente, apresentando uma fragmentação parcial do DNA (Fig. 8). E com o indutor radiação ultravioleta a análise de DNA mostrou um perfil de degradação, indicando que a apoptose não foi inibida (Fig. 9).

Os resultados mostram que a expressão transiente do gene *iap-3* de AgMNPV foi eficaz na inibição de apoptose mesmo na presença dos indutores apoptóticos vírus vApAg e inibidor de síntese de RNA actinomicina D, mas não foi capaz de reduzir significativamente a apoptose induzida pela radiação UV, provavelmente por esse indutor ativar um diferente mecanismo na via de apoptose. Portanto, o gene *iap-3* é funcional para a atividade anti-apoptótica em alguns mecanismos de indução de apoptose específicos e é requerido para replicação produtiva do vírus em células de sua linhagem hospedeira. Outros genes *iap* já foram identificados em AgMNPV (*iap-1* e *iap-2*) (WOLFF et al., 2005), porém não se tem descrito quanto a sua atividade funcional.

Referências Bibliográficas

BERGMANN, A.; YANG, A. Y.; SRIVASTAVA, M. Regulators of IAP function: coming to grips with the grim reaper. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, p. 717-724, 2003.

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**, n. 269, p. 1885-1888, 1995.

CARPES, M. P.; CASTRO, M. E. B.; SOARES, E. F.; VILLELA, A. G.; PINEDO, F. J. R.; RIBEIRO, B. M. The inhibitor of apoptosis gene (*iap-3*) of *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) encodes a functional IAP. **Archives of Virology**, Wien, Austria, v. 150, p. 1549-1562, 2005.

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. **Journal of Virology**, v. 68, p. 7728-7737, 1994.

CASTRO, M. E. B. e RIBEIRO, B. M. Production of viral progenie in insect cells undergoing apoptosis induced by a mutant *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. **Microbiological Research**, v. 156, p. 369-376, 2001.

CHANG, H. Y.; YANG, X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 821-846, 2000.

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

DEVERAUX, Q. L.; ROY, N.; STENNICKE, H. R.; ARSDALE, T. van; ZHOU, Q.; SRINIVASULA, S. M.; ALNEMRI, E. S.; SALVESEN, G. S.; REED, J. C. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. **EMBO Journal**, v. 17, p. 2215-2223, 1998.

DEVERAUX, Q. L.; TAKAHASHI, R.; SALVESEN, G. S.; REED, J. C. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell death proteases. **Nature**, n. 388, p. 300-304, 1997.

GOLDBERG, I. H.; RABINOWITZ, M.; REICH, E. Basis of actinomycin action, I. DNA binding and inhibition of RNA-polymerase synthetic reactions by actinomycin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 48, p. 2094-2101, 1962.

HUANG, Q. H.; DEVERAUX, Q. L.; MAEDA, S.; SALVESEN, G. S.; STENNICKE, H. R.; HAMMOCK, B. D.; REED, J. C. Evolutionary conservation of apoptosis mechanisms: lepidopteran and baculoviral inhibitor of apoptosis proteins are

inhibitors of mammalian caspase-9. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 1427-1432, 2000.

MAGUIRE, T.; HARRISON, P.; HYINK, O.; KALMAKOFF, J.; WARD, V. K. The inhibitors of apoptosis of *Epiphyas postvittana nucleopolyhedrovirus*. **Journal of General Virology**, Reading, UK, v. 81, p. 2803-2811, 2000.

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

MOSCARDI, F.; MORALES, L.; SANTOS, B. Prospects for the use of viral pesticides. In: ANNUAL MEETING OF THE SIP, 35., Foz do Iguaçu, 2002. **Anais...** Foz do Iguaçu: [S.I.], 2002

ROY, N.; DEVERAUX, Q. L.; TAKAHASHI, R.; SALVESEN, G. S.; REED, J. C. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. **EMBO Journal**, v. 16, p. 6914-6925, 1997.

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.

SILVEIRA, E. B.; RIBEIRO, B. M.; BÁO, S. N. Morphological studies of apoptosis in insect cells infected with vApAg, an *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus mutant. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 31, p. 543-554, 1999.

SLOUN, P. P. van; JANSEN, J. G.; WEEDA, G.; MULLENDERS, L. H. F.; ZEELAND, A. A. van; LOHMAN, P. H. M.; VRIELING, H. The role of nucleotide excision repair in protecting embryonic stem cells from genotoxic effects of UV-induced DNA damage. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 27, p. 3276-82, 1999.

TSCHOPP, J.; THOME, M.; HOFMANN, K.; MEINL, E. The fight of viruses against apoptosis. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 8, p. 82-87, 1998.

VILAPLANA, L.; O'REILLY, D. R. Functional interaction between *Cydia pomonella* granulovirus IAP proteins. **Virus Research**, v. 92, p. 107-111, 2003.

VUCIC, D.; KAISER, W. J.; 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. 94, p. 10183-10188, 1997.

WILSON, R.; GOYAL, L.; DITZEL, M.; ZACHARIOU, A.; BAKER, D. A.; AGAPITE, J.; SELLER, H.; MEIER, P. The DIAP1 RING finger mediates ubiquitination of Dronc and is indispensable for regulating apoptosis. **Nature Cell Biology**, New York, v. 4, p. 445–450, 2002.

WOLFF, J. L. C.; RIBEIRO, B. M.; GARCIA-MARUNIAK, A.; MARUNIAK, J. E.; MOSCARDI, F.; SOUZA, M. L.; CASTRO, M. E. B.; ZANOTTO, P. M. A. O genoma completo do baculovirus *Anticarsia gemmatalis* nucleopoliedrovirus e implicações para o controle biológico. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 9., Recife, 2005. **Anais...** Recife: [s.n.], 2005. p.51.

YANG, Y.; FANG, S.; JENSEN, J. P.; WEISSMAN, A. M.; ASWELL, J. D. Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. **Science**, n. 288, p. 874-877, 2000.

ZHUANG, S.; KOCHEVAR, I. E. Ultraviolet A radiation induces rapid apoptosis of human leukemia cells by Fas ligand-independent activation of the Fas death pathways. **Photochemistry and Photobiology**, Augusta, USA, v. 78, p. 61-67, 2003.