UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Eni Braga da Silveira'

OS HEMÓCITOS LARVAIS DE Anticarsia gemmatalis (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E SUA INTERAÇÃO COM BACULOVÍRUS

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Estrutural na área de Biologia Celular.

Orientadora: Prof^a Dr^a Sônia Nair Báo

Co-Orientador: Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Silveira, Eni Braga da

Os hemócitos larvais de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) e sua interação com baculovírus / Eni Braga da Silveira. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientadora: Sônia Nair Báo Co-orientador: Bergmann Morais Ribeiro Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas . Instituto de Biologia.

Apoptose. 2. Baculovírus. 3. Lepidoptera.
I. Báo, Sônia Nair. II. Ribeiro, Bergmann Morais.
III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

S39h

Campinas, 11 de fevereiro de 2005

BANCA EXAMINADORA

Prof^{a.} Dr^{a.} SÔNIA NAIR BÁO (Orientadora)

Dr^{a.} MARIA ELITA BATISTA DE CASTRO

Prof^{a.} Dr^{a.} ELISA APARECIDA GREGÓRIO

Prof. Dr. JOSÉ LUIZ CALDAS WOLFF

Prof^{a.} Dr^{a.} MARIA LUIZA SILVEIRA MELLO

Prof^{a.} Dr^{a.} MARIA ALICE DA CRUZ HÖFLING

Prof. Dr. ELLIOT WATANABE KITAJIMA

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Debaixo d'água tudo era mais bonito mais azul mais colorido só faltava respirar Mas tinha que respirar Debaixo d'água se formando como um feto sereno confortável amado completo sem chão sem teto sem contato com o ar

Mas tinha que respirar Todo dia Todo dia, todo dia Todo dia

Debaixo d'água por enquanto sem sorriso e sem pranto sem lamento e sem saber o quanto esse momento poderia durar Mas tinha que respirar Debaixo d'água ficaria para sempre ficaria contente longe de toda gente para sempre no fundo do mar

Mas tinha que respirar Todo dia Todo dia, todo dia Todo dia

Debaixo d'água protegido salvo fora de perigo aliviado sem perdão e sem pecado sem fome sem frio sem medo sem vontade de voltar

Mas tinha que respirar Todo dia Todo dia, todo dia Todo dia

Arnaldo Antunes

"Ser chamado de "Doutor" é, como se sabe, uma das utopias mais fascinantes de qualquer brasileiro, vivo ou morto."

Nelson Rodrigues

vi

Aos que amo e que me amam.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB), sob orientação da Profa. Dra. Sônia Nair Báo e co-orientação do Prof. Dr. Bergmann Morais 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 Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF);
- Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX);
- Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP);
- Universidade de Brasília (UnB);
- Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

AGRADECIMENTOS

Com a citação de **alguns nomes**, manifesto o meu reconhecimento e gratidão a **todas as pessoas e instituições** que contribuiram para tornar esta "fascinante utopia" em algo tão real, a ponto de pesar nos ombros e na consciência.

À **UnB** e à **UNICAMP**, que me forneceram meios para transpor diferenças, ganhar o mundo, as pessoas e, sobretudo, ganhar a mim mesma;

Aos meus mestres e amigos, **Sônia** e **Bergmann**, que sempre me agraciaram com boas oportunidades, confiança, incentivo e apoio irrestritos. Toda a minha gratidão, admiração, carinho e respeito!

Ao meu "fiel escudeiro" **Bruno**, pelo auxílio crucial, paciência, dedicação e pela oportunidade preciosa de compartilhar do seu processo de formação acadêmica e amadurecimento pessoal nos últimos quatro anos;

Ao **Laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia–UnB**, por ser a casa de portas sempre abertas, onde desenvolvi todo o trabalho. Agradeço especialmente ao querido pioneiro, **Prof. Kitajima**, que me abriu estas portas pela primeira vez;

À **Profa. Dra. Shirley** e à **Profa. Dra. Maria Júlia**, coordenadoras da pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural–UNICAMP neste período;

Aos professores da pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural-UNICAMP;

Ao **CNPq**, pela concessão de bolsa durante os dois primeiros anos de curso;

Ao **Sidney**, sempre solícito e à **Liliam**, excepcional e imprescindível pela sua dedicação, competência, gentileza e paciência imensuráveis na lida com pessoas e papéis;

Ao **Dr. Flávio Moscardi** e, especialmente, à **Dra. Maria Elita B. Castro** (Embrapa), pela receptividade e gentileza em ceder ovos e larvas de *Anticarsia gemmatalis*;

Ao **Prof. Dr. Rollie J. Clem** (Kansas State University), pioneiro no estudo da regulação da apoptose por baculovírus, por tão preciosa fonte de inspiração e informação, pela gentileza em ceder inóculos dos vírus vHSGFP e vHSGFP/P35del e pela revisão gramatical do primeiro artigo publicado;

Ao amigo **Prof. Dr. Ricardo Azevedo** e ao **Luciano Paulino** (UnB), pela gentileza em permitir o uso de equipamento e pelo auxílio durante as medições dos hemócitos;

Ao amigo **Gustavo**, companheiro querido de trabalho, de festas (muitas!) e de alguns "bodes" também, cujo auxílio nas análises estatísticas do primeiro artigo foi fundamental;

Ao amigo **Carlos Maximiliano (Chuck),** pela colaboração em experimentos da fase inicial do trabalho e por trazer o Bruno para o nosso grupo de pesquisa;

À Sra. Heloísa Frazão (Embrapa), pela gentileza em permitir a utilização do microscópio invertido de fluorescência;

À **Profa. Dra. Elisa Aparecida Gregório** (UNESP-Botucatu), pela atenção, receptividade e pelo envio de bibliografia para estudo dos hemócitos de insetos;

À Profa. Dra. Cláudia Renata (UnB), pelas lições (particulares!) de Virologia;

Ao meu melhor amigo de todos os tempos, **Prof. Rodrigo Machado**, pelo afeto gigantesco e, de quebra, pela revisão gramatical do segundo artigo publicado;

Ao admirável **Prof. Dr. James Maruniak** (University of Florida), pelo seu entusiasmo científico contagiante e pela revisão gramatical dos dois últimos artigos;

À companheira de trabalho Fabiane, sempre disposta a ajudar;

À **Rede Sarah de Hospitais do Aparelho Locomotor**, pela oportunidade de exercer a minha profissão e especialidade de maneira digna;

À **minha mãe** e ao **meu pai**, pelo que fui, sou e serei. A dedicação e o amor destes dois foram tão grandiosos que os permitiu arrancar boas escolhas para os filhos de onde não havia, aparentemente, chance de escolha;

Aos **meus irmãos**, únicos em minha vida nesta experiência de ter vindo do mesmo pai e da mesma mãe;

À amiga e companheira de trabalho **Isabel**, pelo muito que tem me ensinado desde o início (há treze anos!), pela solidariedade e incentivo de cada dia;

À amiga **Carla**, pela imensa generosidade e por sempre me "cutucar" com as suas idéias desafiadoras. Neste ano correremos a meia!

À amiga **Leonora**, sempre disposta a compartilhar o seu entusiasmo e *know-how* na busca do auto-conhecimento e da felicidade;

À velha amiga **Raquel Mello**, pela torcida, entusiasmo, acolhida carinhosa e solução rápida de problemas em Campinas;

A todos os companheiros do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia– UnB nestes treze anos (muita gente inesquecível!!!!);

Aos companheiros da pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural– UNICAMP;

A todos os meus amigos, fundamentais sem exceção, cada qual à sua maneira, por perto ou distantes fisicamente, por acreditarem em mim, pelo afeto, enriquecimento moral, intelectual e (por que não?!) espiritual, além da imensa diversão que me proporcionam. O que sou também é um pouco de cada um de vocês!

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIAÇÕESxiii						
RESUMO xv						
ABSTRACT xviii						
1. INTRODUÇÃO 1						
1.1. Os baculovírus						
1.2. O BACULOVÍRUS Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus						
(AgMNPV)14						
1.3. Apoptose						
1.4. REGULAÇÃO DA APOPTOSE POR BACULOVÍRUS: AS PROTEÍNAS P35 E IAP						
1.5. Imunidade em insetos						
1.6. Imunidade contra vírus						
1.7. Contexto: O baculovirus mutante vApAg						
1.8. Objetivos						
2. ARTIGOS PUBLICADOS						
2.1. CHARACTERIZATION OF LARVAL HAEMOCYTES FROM THE VELVETBEAN						
CATERPILLAR Anticarsia gemmatalis (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)						
2.2. MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF Anticarsia gemmatalis M						
nucleopolyhedrovirus INFECTION IN HAEMOCYTES FROM ITS NATURAL LARVAL HOST,						

	THE	VELVETBEAN	CATERPILLAR	Anticarsia	gemmatalis	(HÜBNER)	
	(LEPIDOPTERA:NOCTUIDAE)						
3. ARTIGOS SUBMETIDOS À PUBLICAÇÃO 78							
	3.1. A	POPTOSIS IN HEN	10CYTES FROM T	THE VELVET BE	EAN CATERPILL	AR Anticarsia	
	gemma	atalis (HÜBNER)	(LEPIDOPTERA:	NOCTUIDAE)	INDUCED BY	VAPAG, AN	
	Antica	rsia gemmatalis 1	nultiple nucleopo	lyhedrovirus M	UTANT	78	
	3.2. IN VIVO APOPTOSIS INDUCTION AND REDUCTION OF INFECTIVITY BY AN Autograph						
	californica multiple nucleopolyhedrovirus P35 ⁻ RECOMBINANT IN HEMOCYTES FROM						
	THE V	ELVETBEAN CAT	ERPILLAR Antican	rsia gemmatali	is (Hübner) (LEPIDOPTERA:	
	Νοςτι	JIDAE)					
4. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS 146							
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 151							

AcMNPV Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus

- AgMNPV Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus
- BV Vírus extracelular
- CDH Contagem diferencial de hemócitos
- CTH Contagem total de hemócitos
- DNA Ácido desoxirribonucleico
- Gh1 Granulócito tipo 1
- Gh2 Granulócito tipo 2
- GV Granulovírus
- h p. i. Horas pós-infecção
- IAP Proteína inibidora de apoptose
- LPS Lipopolissacarídeos
- MCP Morte celular programada
- MNPV Multiple nucleopolyhedrovirus
- NPV Nucleopolyhedrovirus
- OB Corpo de oclusão
- ODV Vírus derivado de corpo de oclusão
- Oe Oenocitóide
- OV Vírus ocluído

PAMP Padrões moleculares associados a patógenos

- PFU Unidades formadoras de placa (unidades infecciosas)
- PGLC Peptídeoglicanos
- Pl Plasmatócito
- PO Fenoloxidase
- Pr Prohemócito
- PRR Pattern recognition receptor
- ProPO Pro-fenoloxidase-monofenil-L-dopa
- REG Retículo endoplasmático granular
- RNA Ácido ribonucléico
- RNAds RNA fita-dupla
- RNAss RNA fita-simples
- ROS Espécies reativas de oxigênio
- SNPV Single nucleopolyhedrovirus
- Sph Esferulócito
- TNF Fator de necrose tumoral

RESUMO

A família *Baculoviridae* é constituída por vírus de fita-dupla de DNA que infectam artrópodes, larvas de lepidópteros em sua maioria. No início da década de 90, descobriu-se que baculovírus possuem genes (p35 e iap) capazes de inibir a apoptose em células hospedeiras, uma estratégia para garantir a replicação viral. O mutante vApAg, derivado de Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) e que possui um transposon interposto no gene *iap3*, induz apoptose em uma linhagem celular derivada de Anticarsia gemmatalis, havendo produção de progênie viral. Já o vírus vP35del, derivado de Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) e que possui o gene p35 deletado, também induz apoptose na mesma linhagem celular, porém sem sinais de produção de progênie. Neste trabalho, investigou-se a ocorrência de apoptose in vivo induzida por vApAg e pelo recombinante $p35^{-}$ derivado de AcMNPV – vHSGFP/P35del em larvas de A. gemmatalis. Utilizou-se como modelo de estudo hemócitos infectados via injeção intrahemocélica de vírus extracelulares. Os hemócitos de A. gemmatalis foram caracterizados e o processo infeccioso de AgMNPV, vApAg, vHSGFP e vHSGFP/P35del nestas células foi estudado com base em técnicas morfológicas, tendo sido, ainda, observadas a mortalidade e alterações no desenvolvimento larval induzidas pelos vírus. Foram observados seis tipos de hemócitos: prohemócitos (pr), plasmatócitos (pl), granulócitos tipo 1 (gh1), granulócitos tipo 2 (gh2), oenocitóides (oe) e esferulócitos (sph), os quais apresentam semelhança geral com o conjunto de hemócitos de outros lepidópteros, inclusive com relação ao seu número total (CTH), às proporções dos diferentes tipos ao

longo do desenvolvimento (CDH) e à atividade de fenoloxidase. A inativação do gene *iap-3* de AgMNPV resulta em apoptose para um número considerável de hemócitos em até 72 horas pós-infecção, com a produção de vírus extracelulares e ocluídos. O tempo médio de morte para larvas infectadas com 100 e 1000 PFU de vApAg é cerca de 2,5 dias maior que para as mesmas doses de AgMNPV. A deleção do gene p35 de AcMNPV resulta em uma apoptose de hemócitos discreta, entre 24 e 72 horas pós-infecção, com alguma produção de vírus extracelulares, havendo redução na proporção de hemócitos infectados ao longo do tempo e redução na infectividade das larvas. Para vHSGFP, uma dose da ordem de 10⁵ vezes maior que de AgMNPV foi necessária para causar uma mortalide próxima a 100%. Desta forma, A. gemmatalis consiste em um hospedeiro semi-permissivo a AcMNPV. Ao contrário de AgMNPV e vApAg, vHSGFP e vHSGFP/P35del, em geral, não causam liquefação dos insetos. Algumas larvas sobreviventes à infecção por vHSGFP e, principalmente, por vHSGFP/P35del, originam pupas anômalas inviáveis. Todos os tipos de hemócitos de A. gemmatalis são susceptíveis à infecção pelos quatro vírus. Pl e gh1 são mais susceptíveis enquanto gh2 raramente são infectados. Sph são especialmente tolerantes aos vírus derivados de AcMNPV, podendo constituir um dos fatores determinantes da baixa infectividade destes vírus em A. gemmatalis. Gh1 e pl fagocitam células, fragmentos celulares, corpos apoptóticos, vírus extracelulares e ocluídos. Hemócitos infectados parecem ser alvos de uma resposta citotóxica causadora de necrose. Os resultados deste trabalho reforçam a hipótese de que a apoptose constitui uma estratégia anti-viral importante em insetos, tendo em vista que os mesmos não possuem imunidade adquirida. A compreensão de aspectos da relação patógeno-hospedeiro, especialmente no que diz respeito aos mecanismos de imunidade de insetos contra vírus, pode contribuir para a

otimização dos baculovírus como agentes de controle biológico de pragas e como vetores de expressão de genes heterólogos, bem como colaborar para a descoberta de novos antivirais e para o controle da transmissão de vírus por insetos.

ABSTRACT

The Baculoviridae family is composed by double-strand DNA viruses that infect arthropods, generally lepidoptera larvae. In the beginning of the 90's, it was shown that baculoviruses possess genes (p35 e iap) that inhibit apoptosis in host cells - a strategy to guarantee viral replication. The mutant vApAg, derived from Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV), which has the iap-3 gene interrupted by a transposon, induces apoptosis in a cell line derived from Anticarsia gemmatalis, with progeny production. The virus vP35del, derived from Autographa californica multiple *nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), which has a deletion in the gene p35, also induces apoptosis in the same cell line, however there is no progeny production. In this work, we have investigated apoptosis in vivo induced by vApAg and by a p35⁻ recombinant derived from AcMNPV - vHSGFP/P35del in A. gemmatalis larvae. Hemocytes were the model chosen for study and the infection occurred by intrahaemocoelic injection of budded viruses. The hemocytes were characterized and the infective processes of AgMNPV, vApAg, vHSGFP and vHSGFP/P35del in these cells were studied based on morphological approaches. It was also observed larval mortality and the effects on larval development caused by these viruses. Six types of hemocytes were observed: prohemocytes (pr), plasmatocytes (pl), granular hemocytes type 1 (gh1), granular hemocytes type 2 (gh2), oenocytoids (oe) and spherulocytes (sph). They presented great similarity to the hemocytes pool from other lepidoptera, including the total number of these cells in circulation (THC), the proportions of each type during larval development (DHC) and phenoloxidase activity.

The inactivation of the *iap-3* gene in AgMNPV resulted in apoptosis induction for a great number of hemocytes until 72 hours post infection, with the production of budded and occluded viruses. The mean time to death was delayed in 2.5 days in average for insects inoculated with 100 and 1000 PFU of vApAg, when compared to the same doses of AgMNPV. The deletion of p35 in AcMNPV resulted in a milder apoptosis, between 24 and 72 hours post infection, with some production of budded viruses. It caused a reduction in the proportion of infected hemocytes along the time of infection and reduced larval infectivity. For vHSGFP, a viral dose in the order of 10⁵ times higher than for AgMNPV is needed to cause a mortality ratio around 100%. Therefore, we consider A. gemmatalis as a semi-permissive host to AcMNPV. The recombinants vHSGFP and vHSGFP/P35del generally do not cause melting of insects, what normally occurs for insects infected by AgMNPV and vApAg. Some surviving larvae infected by vHSGFP and, mainly by vHSGFP/P35del, originate anomalous pupae. All hemocytes types from A. gemmatalis were susceptible to infection by the viruses studied. Pl and gh1 are the most susceptible cells, while gh2 are rarely infected. Sph are especially resistant to AcMNPV-derived viruses. This can constitute one of the factors that determine the low infectivity of AcMNPV in A. gemmatalis larvae. Gh1 and pl phagocytose cells, cell fragments, apoptotic bodies, budded viruses and occluded viruses. Infected hemocytes appear to be targets for a cytotoxic response that causes necrosis. These results reinforce the hypothesis of apoptosis as an important anti-viral strategy in insects, which do not present acquired immunity. A better comprehension of host-pathogen relationships, specially the ones related to insect immunity against viruses, may contribute to an optimization of baculoviruses as biological

control agents and heterologous expression vectors, as well as to the discovery of new antiviral drugs and to the control of virus transmission by insect.

1.1. OS BACULOVÍRUS

1.1.1. ASPECTOS GERAIS E CLASSIFICAÇÃO

Registros de mais de 2000 anos revelam o conhecimento humano acerca de doenças de insetos de importância econômica, como o bicho-da-seda (*Bombyx mori*), e de epizootias causadas por baculovírus em populações de insetos florestais e de lavouras. Porém, somente após a Segunda Guerra Mundial, os agentes causadores de tais doenças foram identificados como membros de uma família de vírus e, ainda bem mais recentemente, é que se deu início a descobertas sobre o progresso da infecção no hospedeiro, identificação de genes virais, seus produtos e funções dos mesmos (revisado por Federici, 1997).

Os baculovírus infectam principalmente insetos da ordem Lepidoptera em sua fase larval, com centenas de espécies confirmadas como hospedeiras (Miller, 1997). Além dos lepidópteros, os baculovírus também infectam insetos das ordens Hymenoptera e Diptera, sendo ainda incerta a sua ocorrência em insetos de outras ordens, bem como em outros artrópodes.

Em geral, as espécies de baculovírus são tidas como possuidoras de um espectro de hospedeiros restrito, porém esta característica tem se mostrado bastante variável. Algumas espécies apresentam hospedeiro único ou hospedeiros restritos a um gênero. Por outro lado, alguns baculovírus infectam espécies em mais de uma família de lepidópteros, como por exemplo, *Mamestra brassicae nucleopolyhedrovirus* (MbNPV), que infecta espécies em

quatro famílias de lepidópteros e *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), com mais de 32 hospedeiros descritos, distribuídos em 15 famílias de lepidópteros (Cory & Myers, 2003). A susceptibilidade relativa de diferentes hospedeiros a uma espécie de baculovírus pode variar bastante, sendo dependente de fatores como estágio do desenvolvimento larval (Engelhard & Volkman, 1995), dieta (Hoover *et al.*, 2000) e estratégias de defesa do hospedeiro (Washburn *et al.*, 1995, 2001; Trudeau *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002).

A especificidade de infecção e conseqüente segurança com relação a organismos não-alvo fazem dos integrantes desta família agentes de grande potencial para o manejo integrado de pragas. Dezenas de espécies de baculovírus têm sido utilizadas no mundo com este propósito, estando disponíveis como formulações comerciais (Black *et al.*, 1997; Moscardi, 1999). Baculovírus recombinantes têm sido desenvolvidos no intuito de diminuir o tempo de morte do hospedeiro e, conseqüentemente, os danos causados às culturas. A inserção de genes de toxinas, deleção ou inativação de genes virais, como o *egt* (Ecdisteróide UDP-glicosil transferase), têm gerado resultados favoráveis neste sentido (Inceoglu *et al.*, 2001; Pinedo *et al.*, 2003).

Além de bioinseticidas, os baculovírus são utilizados como vetores de expressão de genes heterólogos, importantes para a pesquisa básica e com grande potencial para a indústria farmacêutica (produção de vacinas, p. ex.) (Kaba *et al.*, 2004). 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, garantindo a produção de grandes quantidades de proteína funcional com processamento pós-traducional complexo, por ser um sistema de expressão eucariótico (O'Reilly *et al.*, 1992; Petchampai *et al.*, 2004). Trabalhos de modificação genética de linhagens celulares de inseto têm sido desenvolvidos visando o aprimoramento deste sistema para a produção de proteínas humanas mais "autênticas", principalmente com relação à N-glicosilação (Jarvis, 2003).

Os baculovírus também têm potencial de utilização como vetores de terapia gênica. Estes vírus são capazes de infectar células de mamíferos, liberando o material genético no núcleo, sem a ocorrência de replicação viral ou efeitos citopáticos, aliado a uma alta taxa de produção de proteínas heterólogas (Liang *et al.*, 2003; Tani *et al.*, 2003).

A família *Baculoviridae* (do latim, *baculum*) é caracterizada morfologicamente pelo nucleocapsídeo em forma de bastão (30-60 nm x 250-300 nm), envolvido por uma membrana, constituindo dois fenótipos virais distintos que se alternam no ciclo de replicação. O fenótipo presente na natureza, capaz de infectar hospedeiros após a sua ingestão, são os vírus ocluídos (OV, do inglês *occluded viruses*) ou corpos de oclusão (OB, do inglês, *occlusion bodies*). Nestes, um ou vários nucleocapsídeos envoltos por uma membrana estão imersos em uma matriz protéica cristalina. Uma vez livres desta matriz, estes vírions constituem os chamados vírus derivados de corpos de oclusão (ODV, do inglês, *occlusion derived viruses*). O segundo fenótipo, responsável pelo estabelecimento da infecção sistêmica, é constituído pelos vírus extracelulares (BV, do inglês, *budded viruses*). Neste caso, um ou eventualmente mais de um nucleocapsídeo são envolvidos por um envelope derivado da membrana plasmática da célula hospedeira (Blissard *et al.* 2000).

Ao contrário da constituição protéica e morfologia, o genoma é o mesmo para os dois fenótipos, sendo constituído por uma molécula de DNA fita-dupla, circular, *supercoiled*, contendo entre 80 e 180 pkb (pares de kilobases) (Smith & Summers, 1978; Blissard et al., 2000).

Na atualidade, a família *Baculoviridae* é subdividida em dois gêneros, tendo como base a morfologia e a constituição dos OB: *Granulovirus* (vírus da granulose) (GV, do inglês, *granulosis virus*) e *Nucleopolyhedrovirus* (vírus da poliedrose nuclear) (NPV, do inglês, *nuclear polyhedrosis virus*) (Blissard *et al.*, 2000). Os GV infectam somente lepidópteros e formam corpos de oclusão (grânulos) com tamanho aproximado entre 0,15 e 0,5 µm, cuja montagem ocorre após o rompimento da membrana nuclear e fusão dos conteúdos nuclear e citoplasmático. Os grânulos contêm um ou dois nucleocapsídeos, sendo constituídos principalmente pela proteína granulina. Para os NPV, o corpo de oclusão (poliedro) é maior, com diâmetro entre 0,15 e 15 µm, constituído principalmente pela proteína poliedrina. Ao contrário dos GV, o corpo de oclusão dos NPV contém vários nucleocapsídeos e a sua montagem ocorre no núcleo (revisado por Federici, 1997; Ribeiro *et al.*, 1998).

As espécies do gênero *Nucleopolyhedrovirus* são ainda agrupadas de acordo com dois critérios. O primeiro, e mais tradicional, diz respeito ao número de nucleocapsídeos que compõem os ODV. Para os MNPV (*multiple* NPV), vários nucleocapsídeos são envoltos por uma membrana, enquanto que para os SNPV (*single* NPV), há somente um nucleocapsídeo por envelope. Há ainda espécies nas quais esta característica pode variar, sendo classificadas simplesmente como NPV (revisado por Ribeiro *et al.*, 1998; Blissard *et*

al., 2000). O segundo critério advém de estudos filogenéticos baseados no gene da poliedrina (*polh*), na sequência de aminoácidos codificada por este gene e, posteriormente, em outros genes conservados, resultando em dois grupos de NPV (NPV I e NPV II), onde não há separação entre SNPV e MNPV (Zanotto *et al.*, 1993; revisado por Herniou *et al.*, 2003). Estudos mais recentes, envolvendo a análise de seqüências completas de treze espécies de baculovírus e de dois genes em trinta e nove espécies, mostram uma grande divergência entre NPV de lepidópteros, himenópteros e dípteros, sugerindo uma revisão da classificação da família, com a possibilidade de reconhecimento de até dois novos gêneros (Herniou *et al.*, 2003, 2004).

Convencionou-se nomear as espécies de baculovírus iniciando com o nome científico do hospedeiro do qual o vírus tenha sido isolado pela primeira vez, acompanhado das palavras granulovirus (GV), multiple nucleopolyhedrovirus (MNPV), single nucleopolyhedrovirus (SNPV) ou nucleopolyhedrovirus (NPV), de acordo com os critérios citados acima.

No gênero *Nucleopolyhedrovirus*, o vírus mais conhecido é *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), espécie-tipo, cujo genoma foi o primeiro a ser sequenciado (Ayres, *et al.*, 1994), sendo conseqüentemente o modelo principal utilizado em estudos de NPV.

1.1.2. A patogênese dos NPV em larvas de lepidópteros

Os baculovírus que infectam insetos fora da ordem Lepidoptera descritos até o momento são todos SNPV e causam, em sua maioria, uma infecção restrita ao epitélio intestinal. Os que infectam lepidópteros, estabelecem uma infecção transitória no intestino, posteriormente atingindo outros órgãos e tecidos, principalmente hemócitos, corpo gorduroso, matriz traqueal e músculos. Os NPV de lepidópteros são mais numerosos, e, conseqüentemente, mais estudados (revisado por Federici, 1997).

Os estudos da patogênese de baculovírus têm sido otimizados graças ao uso de vírus recombinantes contendo genes marcadores como *lacZ* e *gfp*. A expressão das proteínas marcadoras permite a localização, quantificação e estudo dos focos de infecção mesmo em tempos iniciais, quando estes são muito pequenos, em número reduzido, com efeitos citopáticos pouco perceptíveis. A maior parte destes estudos tem sido realizada para a espécie-tipo AcMNPV em diversos hospedeiros (Engelhard *et al.* 1994; Kirkpatrick *et al.*, 1994; Washburn *et al.*, 1995, 1996, 2000, 2003a, b; Barret *et al.*, 1998a, b; Trudeau *et al.*, 2001; Clarke & Clem, 2002, 2003a; Haas – Stapleton *et al.*, 2003).

A principal via de infecção ocorre pela ingestão dos OB, que se encontram disseminados na natureza, cujos vírions presentes em seu interior são capazes de permanecer viáveis por vários anos (Funk *et al.*, 1997). Além da ingestão, a infecção pode ocorrer via transmissão vertical (Fuxa *et al.*, 2002), artificialmente, pelos espiráculos (Kirkpatrick *et al.*, 1994) ou por injeção intrahemocélica.

Após ingestão, os OB são dissolvidos no interior do intestino médio da lagarta devido ao pH alcalino e ação de proteases, liberando os ODV (Granados & Lawler, 1981; Horton & Burand, 1993). No lúmen do intestino médio os ODV 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. Os poros da membrana peritrófica podem ter diâmetros em torno de 30 nm em larvas de lepidópteros, não permitindo a passagem das partículas virais por simples difusão (revisado por

Volkman, 1997). Uma enzima liberada juntamente com os nucleocapsídeos durante a dissolução dos corpos de oclusão (Enhancina), descoberta inicialmente em GV, tem capacidade de causar danos à integridade e elasticidade desta membrana, facilitando o acesso do vírus às células intestinais (Derksen & Granados, 1988; Wang & Granados, 1998; Popham *et al.*, 2001). Mais recentemente, uma quitinase codificada pelo genoma de AcMNPV (ChiA), envolvida na lise tecidual ao final da infecção, mostrou-se eficiente para permeabilizar a membrana peritrófica de *B. mori*, causando mortalidade nas larvas, o que revela a potencialidade desta enzima como um elemento capaz de otimizar estratégias de controle de insetos (Rao *et al.*, 2004).

Um modelo proposto por Barrett e colaboradores (1998b) reúne evidências obtidas em seu trabalho e hipóteses anteriormente postuladas na tentativa de explicar o estabelecimento da infecção sistêmica a partir da infecção oral por NPV (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 ODV liberados no lúmen do intestino aderem às microvilosidades do epitélio e entram nas células colunares pela fusão do envelope viral com a membrana plasmática, o que foi demonstrado como sendo mediado pela proteína ODV-específica P74 (Haas-Stapleton *et al.*, 2004). Nestas células, uma parte destes vírus é direcionada ao núcleo para transcrição de genes e replicação viral e outra parte realiza transcitose, adquirindo elementos virais codificados por genes precoces (*gp64*, por exemplo) ao brotar na membrana plasmática. Estes vírus ganham acesso à hemolinfa através de possíveis interrupções da membrana basal ou de mecanismos enzimáticos de ruptura desta, podendo infectar hemócitos. As células cilíndricas intestinais infectadas são normalmente repostas, garantindo a absorção de nutrientes, importantes para o progresso da infecção e produção de progênie viral (Volkman & Keddie, 1990). No entanto, este fenômeno pode ser determinante de resistência ou tolerância espécie-específica, como no caso da lagarta *Pseudaletia unipuncta*, altamente tolerante a AcMNPV por infecção oral. Por infecção intrahemocélica, esta espécie apresenta susceptibilidade similar àquela apresentada por *Trichoplusia ni*, um hospedeiro altamente permissivo a AcMNPV (revisado por Volkman, 1997).

De forma alternativa, os ODV em transcitose ou BV produzidos no epitélio intestinal podem infectar células de ramificações finais do sistema traqueal em íntimo contato com o intestino e, posteriormente, hemócitos aderidos aos traqueoblastos, sem a necessidade de transposição da membrana basal. A replicação viral nos hemócitos e traqueócitos resulta na produção de BV, os quais se espalham pelo organismo, realizando a infecção célula a célula, atingindo outros tecidos, como a epiderme e corpo gorduroso. Um estudo recente de órgãos isolados de *B. mori* cultivados e infectados com recombinantes de *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV) contendo o gene *gfp* traz evidências adicionais da importâcia do sistema traqueal para estabelecimento da infecção sistêmica por baculovírus (Rahman & Gopinathan, 2004).

Em uma fase mais tardia da infecção são produzidos os OB, que são acumulados no núcleo, chegando a centenas em uma célula. Além dos OB, agregados fibrilares são acumulados no núcleo e citoplasma, levando a uma hipertrofia celular e tecidual. A distensão física das células e a ação de proteases virais levam ao rompimento das mesmas, da membrana basal e, por último, da cutícula, resultando na liquefação do inseto e dispersão dos OB no ambiente (revisado por Federici, 1997).

Lagartas doentes em virtude de uma infecção por baculovírus apresentam sintomas típicos como perda de apetite, parada no desenvolvimento larval, diminuição de movimentos, geotropismo negativo e coloração esbranquiçada (devido ao acúmulo de OB) (revisado por Ribeiro *et al.*, 1998). De acordo com a combinação de alguns fatores como idade da larva e dose viral, entre outros, a morte pode ocorrer a partir de 24 h de infecção (revisado por Federici, 1997).

Além da mortalidade, os baculovírus podem afetar a dinâmica de uma população de insetos por danos subletais, como redução da fecundidade, tamanho, vigor, viabilidade de ovos e alterações no desenvolvimento (revisado por Cory & Myers, 2003).

1.1.3. REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS NPV E CITOPATOLOGIA

Graças ao desenvolvimento de linhagens contínuas de células de inseto permissivas aos NPV, 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 precoce (*early*), ocorre antes e a tardia (*late*), ocorre logo após o início da replicação. Os genes precoces são expressos por volta de 2 a 7 h p. i., sendo que parte destes genes não necessita da síntese prévia de produtos virais para a sua expressão. Esta parte, que é expressa logo após a decapsidação viral, é constituída pelos genes "imediatamente precoces" (*immediate early*). Após a expressão destes ocorre expressão dos genes "tardiamente precoces" (*delayed early*). Os produtos de genes precoces têm função na regulação transcricional de outros genes, replicação do DNA viral e inibição da apoptose, entre outras funções regulatórias. Alguns genes precoces 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; Williams & Faulkner, 1997).

A fase tardia é caracterizada pela produção de BV, OB e pela inibição da expressão gênica do hospedeiro, ocorrendo a expressão de genes estruturais para a montagem de partículas. Esta fase pode ser subdividida em "tardia" (*late*), cujos genes são transcritos entre 6 e 24 h p. i., e "muito tardia" (*very late*), que ocorre a partir de 18 h p. i. até 72 h p. i., quando a célula é lisada. A fase muito tardia é caracterizada pela expressão abundante de poliedrina, a principal proteína dos OB, e pela proteína P10. Esta última é a principal constituinte dos agregados fibrilares os quais, associados a microtúbulos, acumulam-se no núcleo e citoplasma, provavelmente participando da lise celular e formação de poliedros (revisado por Lu & Miller, 1997; Williams & Faulkner, 1997; Patmanidi *et al.*, 2003).

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

BV são duas mil vezes mais infecciosos em cultura de células do que ODV (Keddie & Volkman, 1985), sendo, desta forma, utilizados para estudos da replicação *in vitro*. Este fenótipo também é utilizado para infecção intrahemocélica pelo mesmo motivo.

BV ganham acesso ao citoplasma através de um mecanismo de endocitose adsortiva. As partículas são internalizadas em vesículas recobertas por clatrina, ocorrendo

posteriormente fusão entre a membrana do envelope viral e da vesícula endocítica, liberando o nucleocapsídeo no citoplasma. A fusão é mediada por uma glicoproteína do envelope, sendo dependente de pH ácido. Esta glicoproteína é a GP64, para NPV do grupo I e a proteína F para NPV do grupo II (revisado por Blissard, 1996; Willians & Faulkner, 1997; Lung *et al.*, 2002).

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). Após decapsidação e acesso do DNA viral ao núcleo, ocorre a transcrição de genes imediatamente precoces por uma RNA polimerase da célula hospedeira, sendo que mRNAs virais podem ser detectados no citoplasma em até 30 minutos pós-infecção (Chisholm & Henner, 1988). Uma vez que a transfecção de DNA viral resulta em infecções produtivas *in vitro*, é consenso que nenhuma proteína associada ao capsídeo seja necessária para a transcrição de genes imediatamente precoces (revisado por Willians & Faulkner, 1997).

No início da replicação do DNA viral e expressão de genes tardios, 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). Grupamentos heterocromáticos são deslocados para a periferia do núcleo ao mesmo tempo em que surge na sua porção central o estroma virogênico, um material granular frouxo que serve de microambiente para a montagem e maturação de partículas virais, o que ocorre em torno de 10 h p. i. (Vaughn & Dougherty, 1985; Volkman & Knudson, 1986).

A marginação da cromatina coincide com a diminuição da replicação, transcrição e tradução de genes da célula hospedeira, eventos que chegam a ser totalmente abolidos em

torno de 24 h p. i. Da mesma forma que o aparecimento do estroma virogênico, a inibição da síntese de componentes celulares é dependente da replicação do DNA viral e expressão de genes tardios (revisado por Willians & Faulkner, 1997).

Por volta de 16-18 h p. i., o estroma virogênico amadurece, apresentando um aspecto mais condensado e subcompartimentalizado. Estão presentes massas fibrilares eletron-densas ricas em DNA, RNA e proteínas do capsídeo, espaçadas por regiões granulares eletron-lucentes (espaço intraestromal) contendo grande quantidade de nucleocapsídeos (Summers, 1971; Young *et al.*, 1993).

Inicialmente, os nucleocapsídeos maduros são direcionados para a formação de BV. Para AcMNPV o título máximo de BV 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 observado através de microscopia eletrônica que os BV brotam do núcleo dentro de vesículas de transporte originadas por evaginações do envelope nuclear. Estas vesículas terminam por desaparecer ao longo do trajeto, uma vez que os nucleocapsídeos são visualizados desprovidos de membrana em porções citoplasmáticas mais distais com relação ao núcleo, não havendo até o momento algum modelo capaz de explicar o fenômeno (revisado por Willians & Faulkner, 1997). Por fim, os nucleocapsídeos brotam da célula alinhando a sua porção apical com porções da membrana plasmática enriquecidas com glicoproteínas de superfície, as quais, juntamente com elementos da membrana plasmática da célula hospedeira, irão constituir o envelope viral (Adams *et al.*, 1977; Volkman *et al.*, 1984; Volkman, 1986; Lung *et al.*, 2002).

Entre 10 e 16 h p. i. as proteínas poliedrina e P10 podem ser detectadas no citoplasma através de imunocitoquímica, sendo que, com 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 48 h p.i., os transcritos de *p10* e *poliedrina* chegam a constituir 90% do total de RNA viral e os polipeptídeos correspondentes, 50% do total proteico da célula (revisado por Willians & Faulkner, 1997).

Após 24 h p. i., a produção de BV decresce, dando espaço para a produção de OV (Stolz *et al.*, 1973; Volkman *et al.*, 1976). A maturação do estroma virogênico e consequente progressão da hipertrofia nuclear levam ao aparecimento de um compartimento periestromal distinto, nomeado região anelar (*ring zone*), rico em vesículas ou fragmentos membranosos trilamelares. A origem destas membranas ainda não foi totalmente esclarecida, havendo dúvidas com relação à participação do envelope nuclear ou síntese *de novo* para a sua formação (revisado por Willians & Faulkner, 1997). Na região anelar ocorre envelopamento dos vírions derivados do estroma virogênico e montagem dos OB (Stolz *et al.*, 1973).

Acredita-se que a regulação da produção e acúmulo de proteínas específicas de OV 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 OB, fenômeno cujos mecanismos regulatórios não foram ainda identificados (Vaughn & Dogherty, 1985). Por último, os OB são envolvidos por uma estrutura bilamelar, composta de proteínas (PP34 ou proteína cálix) e principalmente carboidratos, chamada cálix. Esta estrutura, cuja origem também é obscura, aparece na zona anelar associada aos acúmulos fibrilares de P10 (Mackinnon *et al.*, 1974; van der Wilk *et al.*, 1987). O final do ciclo infeccioso é marcado pela lise celular e liberação dos OB, caracterizado pelo aparecimento de vesiculações citoplasmáticas associadas à membrana plasmática e à membrana nuclear externa (revisado por Willians & Faulkner, 1997).

1.2. O BACULOVÍRUS Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV)

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

Um NPV associado a *A. gemmatalis (Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* - AgMNPV) foi coletado pela primeira vez no Brasil em 1972, na região de Campinas-SP (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).

O extrato bruto de larvas infectadas ou formulações comerciais já disponíveis são utilizados para controle em campo. Fatores como pH, volume e horário de aplicação podem influenciar na eficiência do bioinseticida (Batista Filho *et al.*, 2001; Silva & Moscardi, 2002).

Na atualidade, o controle da lagarta-da-soja pelo baculovírus AgMNPV, desenvolvido pela Embrapa Soja (Londrina-PR) há mais de 20 anos, constitui o maior programa mundial de uso de vírus para controle de insetos-praga. Este bioinseticida tem sido empregado em uma área superior a um milhão e quinhentos mil hectares por ano, representando uma redução de aproximadamente 70% nos custos de produção e diminuição

do uso de inseticidas químicos na ordem de 1,6 milhões de litros por ano (revisado por Ribeiro *et al.*, 1998; Moscardi, 1999).

Estudos do baculovírus AgMNPV relacionados à sua interação com hospedeiros, bem como à sua biologia molecular têm sido realizados por diversos grupos de pesquisa, muitos deles no Brasil.

Carner e colaboradores (1979), em um estudo sobre o espectro de hospedeiros de AgMNPV, mostraram que larvas de *A. gemmatalis* e *Heliothis virescens* são altamente susceptíveis à infecção oral com poliedros, enquanto doses consideravelmente maiores são necessárias para matar *Heliothis zea*, *T. ni*, *Pseudoplusia includens*, *Spodoptera exigua* e *Spodoptera ornithogalli*. Também foi demonstrado que *Plathypena scabra* e *Spodoptera frugiperda* não são susceptíveis. Posteriormente, Grasela & McIntosh (1998) confirmaram a maior susceptibilidade de larvas de *A. gemmatalis* a AgMNPV em comparação a larvas de *Helicoverpa zea*, *H. virescens e T. ni* (em ordem decrescente de susceptibilidade).

Uma linhagem celular derivada de formas embrionárias de *A. gemmatalis*, UFL-AG-286, foi desenvolvida (Sieburth & Maruniak, 1988a), constituindo importante ferramenta para os estudos de AgMNPV por ser altamente susceptível a este vírus e permitir a sua replicação (Sieburth & Maruniak, 1988b). Além de UFL-AG-286, AgMNPV é capaz de replicar em algumas linhagens derivadas de *S. frugiperda*, *T. ni*, *B. mori*, *H. virescens* e *Helicoverpa armigera* (Castro *et al.*, 1997; Grasela & McIntosh 1998; Sieburth & Maruniak, 1988b).

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 (Pombo *et al.*, 1998).

Estudos da citopatologia de AgMNPV em células intestinais de lagartas *A. gemmatalis* sugerem que as células cilíndricas do epitélio intestinal sejam alvo de infecção secundária (Matos *et al.*, 1999).

Recentemente, a rota de infecção de AgMNPV em seu hospedeiro natural (*A. gemmatalis*) foi mapeada utilizando vírus recombinantes contendo o gene marcador *lacZ* (Soares & Ribeiro, 2004). Focos em células colunares do intestino médio, bem como em traqueócitos e hemócitos, surgem após 3 horas de infecção. Após 12 horas, são visualizados no corpo gorduroso, ectoderma e gânglio nervoso, tornando-se mais numerosos ao longo do tempo. Focos no intestino não são visualizados após 24 e 48 horas, provavelmente devido à descamação epitelial, ressurgindo após 72 horas de infecção, quando a infecção sistêmica encontra-se estabelecida.

Um vírus recombinante derivado de AgMNPV, cujo gene *egt* foi inativado (vAgEGT Δ -*lacZ*), é capaz de antecipar a morte de larvas de *A. gemmatalis* em cerca de 2 dias em comparação com o vírus selvagem, sendo a concentração letal necessária para matar 50% das larvas em condições experimentais (LC₅₀) reduzida a aproximadamente 25% daquela para AgMNPV. No entanto, a produção de poliedros por larva infectada foi reduzida em torno de 50%, uma conseqüência da morte mais rápida (Pinedo *et al.*, 2003).

Estudos de dois isolados de AgMNPV mostraram um aumento no número de variantes genômicos ao longo do tempo, bem como aumento no número de regiões variáveis geradas 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. A diferença entre o número de repetições é a responsável pela divergência entre os dois isolados (Garcia-Maruniak *et al.*, 1996).

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 kb (kilobases) em disposição circular (Johnson & Maruniak, 1989). Com base neste mapa, foi realizado o sequenciamento total do genoma do baculovírus AgMNPV (Wolff *et al.*, 2004).

Estudos filogenéticos baseados na sequência do gene *poliedrina* e de seu promotor em AgMNPV revelaram grande homologia deste vírus com AcMNPV, *Orgyia pseudotsugata multiple nucleopolyhedrovirus* (OpMNPV) e BmNPV, sugerindo a sua inclusão no grupo dos NPV I (Zanotto *et al.*, 1992; 1993). Estudos posteriores baseados na sequência de outros genes, bem como na organização genômica de AgMNPV, conhecida após o total sequenciamento, confirmam esta classificação (Wolff *et al.*, 2004).

Além do gene *poliedrina* e de seu promotor, AgMNPV também apresenta grande homologia com OpMNPV com relação à proteína P10, principal formadora dos agregados fibrilares (Razuck *et al.*, 2002), enzima DNA polimerase (Dalmolin *et al.*, 2002) e também com relação à glicoproteína de superfície GP64 (Pilloff *et al.*, 2003). Com relação ao gene *egt*, observou-se homologia com AcMNPV e *Choristoneura fumiferana multiple nucleopolyhedrovirus* (CfMNPV) (Rodrigues *et al.*, 2001). AgMNPV ainda possui em comum com CfMNPV os genes *p22.2* e *v-trex*, os quais, até o momento, não foram

descritos em outros baculovírus (Slack *et al.*, 2004). Para o gene *helicase*, AgMNPV apresenta maior homologia com *Epiphyas postvitanna multiple nucleopolyhedrovirus* (EppoMNPV) e *Choristoneura fumiferana defective multiple nucleopolyhedrovirus* (CfDefMNPV) (de Lima *et al.*, 2004), havendo ainda grande semelhança entre estes vírus com relação à disposição das ORF (do inglês, *open reading frames*) ao longo do genoma (Wolff *et al.*, 2004).

Diferenças de AgMNPV com relação a outros vírus do grupo NPV I são a ausência do gene *v-cath*, e *ChiA* (Slack *et al.*, 2004). Além de AgMNPV, AcMNPV, OpMNPV, BmNPV, CfMNPV, CfDEFMNPV e EppoMNPV, o grupo dos NPV I é constituído por *Antheraea pernyi nucleopolyhedrovirus* (AnpeNPV), *Hyphantria cunea nucleopolyhedrovirus* (HycuNPV), *Anagrapha falcifera multiple nucleopolyhedrovirus* (AnfaMNPV), *Rachoplusia ou nucleopolyhedrovirus* (RaouNPV) e *Perina nuda nucleopolyhedrovirus* (PenuNPV) (revisado por Slak *et al.*, 2004).

1.3. Apoptose

1.3.1. DEFINIÇÃO E IMPORTÂNCIA

A morte celular programada (MCP) é um fenômeno de autodestruição celular, dirigido por uma cascata de reações finamente regulada em resposta a um estímulo. É um componente central para o desenvolvimento e manutenção da homeostase, estando também envolvida em processos patológicos. Desta forma se dá a eliminação de células redundantes, velhas, danificadas, defeituosas, infectadas por vírus ou com potencial maligno. Falhas neste sistema, que levem a uma morte celular suprimida ou exarcebada, estão relacionadas a doenças como o câncer, doenças auto-imunes, neurodegenerativas, infecções virais, lesões tóxicas e isquêmicas, dentre outras (revisado por Thompson, 1995; Kam & Ferch, 2000).

A MCP ainda faz parte de estratégias da resposta imune de mamíferos (revisado por Ekert & Vaux, 1997) e diferenciação celular (revisado por Jacobson *et al.*, 1997). Ao morrer, alguns tipos celulares como queratinócitos e células do cristalino, por exemplo, tornam-se completamente diferenciados, prontos para o desempenho da sua função.

Em plantas, de forma semelhante aos animais, a MCP tem importância durante o desenvolvimento e morfogênese, especialização celular, senescência e defesa contra patógenos, sendo o mecanismo responsável pela resposta 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 MCP teria importância para a diferenciação e adaptação a hostilidades ambientais. Da mesma forma que para os pluricelulares, a apoptose em unicelulares apresenta uma natureza favorecedora da coletividade, otimizando a sobrevivência da colônia em detrimento da morte de alguns indivíduos inadequadamente diferenciados ou parasitados, cuja permanência seria prejudicial (revisado por Hochman, 1997; Ameisen, 1998; James & Green, 2004).

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 à MCP, descritos inicialmente para alguns tipos celulares de vertebrados em condições patológicas e não-patológicas. Este conjunto de eventos 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 (Kerr et al., 1972; Wyllie, 1980; Duvall & Wyllie, 1986).

Em virtude destas características, a apoptose foi considerada como o oposto da necrose, tida como um tipo de morte celular brusca e acidental, que foge a quaisquer mecanismos de regulação, havendo ruptura da membrana plasmática, extravasamento do conteúdo celular e resposta inflamatória. No entanto, diferentes tipos de MCP além da apoptose clássica, têm sido descritos na atualidade, o que vem quebrando a dicotomia apoptose/necrose estabelecida ao longo dos últimos trinta anos. Existem evidências de que, além da apoptose, a degeneração celular por autofagia e a própria necrose sejam programadas, definindo a morte celular isoladamente ou em combinação com mecanismos apoptóticos (revisado por Guimarães & Linden, 2004), havendo grande variação de possíveis vias de estímulo, ativação, execução e alterações morfológicas (revisado por Ashe & Berry, 2003).

O conjunto fenotípico da apoptose descrito acima 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 citado, na ausência ou com resposta inflamatória mínima (revisado por Savil, 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 (Fadok *et al.*, 1992). Além da fosfatidilserina, outros sinalizadores para fagocitose presentes na membrana de células apoptóticas são a anexina I, molécula de adesão intercelular 3 (ICAM-3) e carboidratos modificados. Estes são passíveis de reconhecimento por diferentes tipos de receptores presentes na membrana de macrófagos, bem como por opsoninas, que potencializam a fagocitose. Alguns dos receptores de macrófagos estão engajados na ligação à célula-alvo, outros estão envolvidos com modificações do citoesqueleto para a formação do fagossomo (revisado por Fadeel, 2003).

A fragmentação do DNA através de endonucleases específicas também é um evento associado à apoptose, podendo ocorrer a quebra em fragmentos de alta massa molecular (50 a 300 pkb) e oligonucleossomais (200 pb 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 da apoptose desde a década de 80, embora se saiba que em alguns tipos celulares esta característica possa estar ausente (Wyllie, 1980; Ucker *et al.*, 1992; Walker *et al.*, 1993).

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

1.3.2. PRINCIPAIS MOLÉCULAS ENVOLVIDAS E ASPECTOS MECANÍSTICOS BÁSICOS

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 levando à 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, bem como vias de execução e regulação, relacionados principalmente a mamíferos, *Drosophila melanogaster* e *C. elegans*.

A observação de que as modificações celulares durante a apoptose são bastante conservadas entre 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 esta "execução" à uma família de proteases de cisteína conhecidas como caspases ("c" refere-se a cisteína no sítio ativo, "aspase" refere-se ao aspartato que é reconhecido nos sítios de clivagem de substratos) (Yuan *et al.*, 1993).

Atualmente são conhecidas por volta de 14 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, transdução de sinais e do ciclo celular, entre outras. Além disso, um sub-grupo de caspases atua como ativadora de pró-citocinas no processo inflamatório (revisado por Cory & Adams, 1998; Thornberry & Lazebnic, 1998; Ashe & Berry, 2003).

As caspases são produzidas constitutivamente, sendo encontradas na célula na forma zimogênica (procaspases). Existem caspases chamadas "iniciadoras", que clivam e, conseqüentemente, ativam outras caspases, chamadas "efetoras". (revisado por 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 pelo mecanismo de proximidade induzida (revisado por Thornberry & Lazebnic, 1998). Evidências atuais revelam que a proximidade induzida promove inicialmente a dimerização das moléculas precursoras, o que seria o principal desencadeador da ativação de caspases iniciadoras (revisado por Boatright & Salvesen, 2003).

Uma outra família de proteínas, de extrema importância para a regulação da apoptose, é a família Bcl-2. Esta é composta por várias proteínas, algumas agindo como inibidoras e outras como estimuladoras da morte celular. Ao todo, cerca de 26 membros desta família foram identificados em mamíferos, os quais possuem 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. Membros de diferentes subfamílias podem heterodimerizar por interação entre os domínios BH1, BH2 e BH3 onde um elemento pode neutralizar a função do outro. Isto sugere que a concentração relativa destes elementos dentro da célula seja um fator de regulação do programa de morte (Oltvai *et al.*, 1993).

De acordo com a origem do estímulo, as vias sinalizadoras da apoptose podem ser classificadas como extrínsecas e intrínsecas (revisado por Ashe & Berry, 2003).

Vias extrínsecas são dependentes da atividade de um receptor de membrana plasmática, que desencadeia a apoptose pela interação com um ligante. Uma via sinalizadora extrínseca bem caracterizada é iniciada pelo receptor FAS, pertencente a superfamília de receptores TNF (*tumor necrosis factor*). Este receptor possui um domímio extracelular rico em resíduos de cisteína, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático chamado *death domain* (DD) (Nagata, 1997). Quando em contato com o ligante (FasL), ocorre agrupamento dos DD de vários receptores CD95 (Huang *et al.*, 1996) e consequente ligação ao DD 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 na procaspase-8, uma caspase iniciadora. O recrutamento e aglomeração de procaspases inicia a cascata de clivagem.

Vias intrínsecas são desencadeadas frente a perturbações da homeostase celular, o que resulta na formação de sinalizadores para a morte no interior da própria célula. A mitocôndria é um componente-chave das vias intrínsecas, compartimentalizando um número de proteínas envolvidas na apoptose. Após o estímulo, a mitocôndria torna-se permeabilizada seletivamente, liberando estes elementos que irão atuar em vias de indução de apoptose e, conseqüentemente, levando à ativação de caspases. Alguns destes elementos são caspases propriamente ditas; o citocromo C, que promove a ativação da procaspase 9; AIF (*apoptosis-inducing factor*), uma flavoproteína que é translocada para o núcleo e que pode causar apoptose independente de caspases; EndoG, uma endonuclease direcionada ao núcleo, também independente da atividade de caspases; Smac/DIABLO (*second mitochondrial activator of caspase/direct IAP-binding protein of low isoelectric point*) e

Omi/Htr A2, que removem o efeito inibitório de proteínas IAP (proteína inibidora de apoptose) sobre a atividade de caspases (revisado por Ashe & Berry, 2003; Lorenzo & Susin, 2004).

Um dos possíveis mecanismos antiapoptóticos de membros da família Bcl-2, uma vez associados à 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 pro-apoptótico Bax parece induzir a liberação deste por formar poros na membrana mitocondrial externa, podendo causar, inclusive, morte independente da ação de caspases em leveduras e mamíferos, quando expresso em grande quantidade (Green & Reed, 1998).

1.3.3. 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, evitanto 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 passíveis de serem reconhecidos e gerar resposta apoptótica. A ocorrência de apoptose em células infectadas por vírus ameaça o ciclo de replicação viral através de pelo menos dois mecanismos:

1. Morte prematura da célula hospedeira antes da replicação viral;

2. Ativação de resposta imune vírus-específica causada pela apresentação de antígenos por macrófagos que tenham fagocitado células apoptóticas infectadas por vírus (Koyama *et* al., 2000).

Os vírus, por sua vez, podem apresentar três tipos gerais de estratégias 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:

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 apóptótica celular (Koyama *et al.*, 1998, 2000).

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 (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; Pekosz *et al.*, 1996; Koyama *et al.*, 1998).

A presença de genes antiapoptóticos tem sido demonstrada 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 estas múltiplas estratégias, podem ser comentadas algumas:

• 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 papillomavirus* (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 à 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* (CPXV) (Ray *et al.*, 1992). A proteína Crma, codificada por CPXV, possui sítio de clivagem para caspases funcionando como um pseudo-substrato que forma um complexo estável com esta enzima, inativando-a. Além das caspases, foi verificado que Crma inativa a enzima Granzima-B (revisado por Chang & Yang, 2000).

• Inibidores de vias mediadas por receptores TNF: Inibidores que interagem com vias apoptóticas mediadas por receptores da família TNF são codificados por *Myxoma virus* (MYXV), um vírus imunodepressor (Macen *et al.*, 1996; Schereiber *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 (Hu *et al.*, 1997).

• Proteínas que interagem com a mitocôndria: Em geral estas proteínas levam ao bloqueio da liberação do citocromo C pela mitocôndria, inibindo a morte celular. Esta estratégia é descrita para Human cytomegalovirus (proteína vMIA), herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (proteína K7), MYXV (proteína M 11L), Epstein-Barr virus (proteína BHRF1, citada acima) e adenovírs (proteína E1B19K) (revisado por Irusta *et al.*, 2003).

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 a produção de progênie viral. 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 nãoenvelopados não-líticos (Teodoro & Branton, 1997).

A apoptose é também importante evento relacionado à patologia da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida). Uma das explicações para a grande perda de células T CD4⁺ pode ser a indução inapropriada de apoptose em células nãoinfectadas, uma vez que somente uma pequena percentagem de células mononucleares do sangue periférico é ativamente infectada, havendo inclusive a indução de apoptose em outros tipos celulares, como neurônios e células tronco da linhagem hematopoiética. (revisado por Young *et al.*, 1997; Roshal *et al.*, 2001).

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 bracovirus* (MdBV). Sabe-se 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 MdBV 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, conseqüentemente, do vírus (Strand & Pech, 1995).

1.4. REGULAÇÃO DA APOPTOSE POR BACULOVÍRUS: AS PROTEÍNAS P35 E IAP

A percepção inicial de que baculovírus poderiam induzir apoptose em células hospedeiras deve-se ao surgimento casual de um mutante do baculovírus *Autographa californica multiple 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 *S. frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), as quais são permissivas ao vírus AcMNPV selvagem.

A ocorrência de *blebbing* na membrana plasmática, condensação cromatínica, fragmentação nuclear, formação de corpos apoptóticos e clivagem internucleossomal do DNA 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 em células de invertebrados (Clem, *et al.*, 1991; Clem & Miller, 1994a).

A replicação normal deste vírus na linhagem celular TN-368 (derivada de *T. ni*) (Hink, 1970), viabilizou a produção de inóculo viral e a análise molecular do mesmo, além de fornecer incentivo adicional para o estudo do ponto de vista da especificidade de infecção (Clem & Miller, 1994a).

Ensaios 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 seis espécies de baculovírus, não havendo homólogos celulares: AcMNPV (Clem *et al.*, 1991), BmNPV (Kamita *et al.*, 1993), *Spodoptera littorallis multiple nucleopolyhedrovirus* (SpliMNPV) (Du *et al*, 1999), *Trichoplusia ni multiple nucleopolyhedrovirus* (TnMNPV) (Dai *et al.*, 1999), *Spodoptera litura multiple nucleopolyhedrovirus* (SpltMNPV) (Pang *et al.*, 2001) e *Hyphantria cunea nucleopolyhedrovirus* (HyCuNPV) (Cao *et al.*, 2002). No entanto, vários estudos têm mostrado sua capacidade de bloquear a apoptose em largo espectro de organismos (revisado por Clem, 1997), bem como de bloquear a apoptose induzida por estímulos diversos em diferentes linhagens de células de lepidópteros (Bose *et al.*, 1998; Lee & Chao, 1998; Sah *et al.*, 1999).

P35 possui um sítio de clivagem para caspases exposto em uma das várias porções hidrofílicas da molécula, constituindo um substrato que após a clivagem forma um complexo estável com a enzima, inativando-a (Bertin *et al.*, 1996).

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

Atualmente surgiram evidências de que P35 seja capaz de neutralizar radicais livres em células de mamíferos e de insetos, bloqueando a apoptose por evitar a liberação de

citocromo C pela mitocôndria. O mecanismo exato ainda não foi descrito (Sahdev *et al.*, 2003).

Ensaios de m*arker 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, 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), tendo sido o primeiro representante deste grupo de genes descrito em *Cydia pomonella granulovirus* (CpGV) (Crook *et al.*, 1993).

A presença de genes *iap* foi revelada para todos os baculovírus até hoje seqüenciados. Alguns baculovírus possuem mais de um gene *iap*, no entanto, nem todos parecem possuir atividade antiapoptótica (Vilaplana & O'Reilly, 2003).

IAP codificadas por baculovírus apresentam capacidade de interferir em mecanismos de ativação de caspases (Seshagiri & Miller, 1997). IAP de baculovírus e de *D. 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). Dois IAP de uma mesma espécie de baculovírus, no caso CpGV, podem interagir funcionalmente, havendo efeito estimulatório de um sobre o outro (Vilaplana & O'Reilly, 2003).

A atividade e regulação de proteínas IAP encontra-se melhor esclarecida para membros celulares desta família de proteínas, os quais revelam-se como inibidores diretos de caspases efetoras, inibidores da ativação de caspases iniciadoras (Deveraux *et al.*, 1997; 1998; Roy *et al.*, 1997) e interferentes na via sinalizadora TNF (Rothe *et al.*, 1995).

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 IAP, e na extremidade N-terminal, uma ou até três sequências conhecidas como BIR (*baculoviral IAP repeats*), presentes em todos os IAP. Estes dois motivos apresentam sequências características de ligação a metais, tendo sido demonstrado experimentalmente sua ligação a zinco (revisado por Clem, 1997). Ao menos uma BIR é essencial para a atividade antiapoptótica destas proteínas (revisado por Miller, 1999). O motivo RING está relacionado à atividade de ligase de ubiquitina, a qual pode promover a auto-ubiquitinação de IAP e das proteínas com as quais interage. A ubiquitinação e conseqüente degradação proteassomal de proteínas pró-apoptóticas pode consistir em mais um mecanismo anti-apoptótico de IAP (Green *et al.*, 2004; Hao *et al.*, 2004).

IAP são super-expressas em alguns tipos de câncer e leucemias. Pequenos peptídeos capazes de interagir com o domínio BIR2 de XIAP antagonizam o efeito anti-apoptótico desta proteína, sendo alvos de pesquisas para a terapêutica de neoplasias (Tamm *et al.*, 2003).

Li e colaboradores (1998), mostram que IAP podem ter outras funções além do bloqueio da apoptose, como participação na citocinese e formação do fuso mitótico.

Desta forma, em algumas linhagens celulares de inseto, a apoptose induzida por 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). No entanto, apesar da presença de *p35*, AcMNPV não é capaz de bloquear a apoptose em linhagens celulares específicas e em larvas de *Spodoptera litura* (Chejanovsky & Gershburg, 1995; Palli *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2002). Assim, 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 quase que completamente desconhecidos. Sabe-se que a ligação de AcMNPV $p35^{-}$ à membrana de células SF-21 ou a entrada do mesmo na célula não é o suficiente para desencadear a apoptose (Lacount & Friesen, 1997). Por outro lado, inibidores da síntese de DNA inibem a apoptose neste modelo, sugerindo que a indução ocorra na fase tardia do ciclo de replicação viral (Clem & Miller, 1994b). O transativador *ie-1* (fator importante para o início da síntese de DNA viral) é capaz de induzir a apotose em células SF-21, tendo o seu efeito aumentado pela coexpressão de *pe38* (Prikhod'ko & Miller, 1996; 1999).

1.5. IMUNIDADE EM INSETOS

1.5.1. ASPECTOS GERAIS E EVOLUTIVOS

Patógenos são uma ameaça constante à sobrevivência de diferentes hospedeiros, desta forma, o desenvolvimento de mecanismos de imunidade eficientes tem um alto valor adaptativo para os organismos.

Os estudos de imunologia comparativa têm revelado uma complexidade crescente dos mecanismos de imunidade ao longo da evolução, chegando a uma extrema sofisticação nos mamíferos. No entanto, conjuntos de mecanismos de complexidade tão variada guardam identidade quanto a três funções básicas a desempenhar:

- 1. Distinção do próprio e do não-próprio;
- 2. Eliminação ou neutralização de invasores;
- 3. Reconhecimento e eliminação de componentes próprios alterados.

Considerando os mecanismos presentes em vertebrados superiores, a imunidade pode ser dividida em dois conjuntos gerais de mecanismos: a imunidade inata e a imunidade adquirida.

A imunidade inata independe de exposição prévia a algum antígeno, constituindo uma resposta abrangente e imediata. Ela é constituída por barreiras físicas para a entrada de patógenos (revestimentos corporais), fagocitose, síntese e secreção de fatores antimicrobianos, RNA de interferência (RNAi) e morte celular programada. A imunidade inata não envolve mecanismos de memória celular, sendo as respostas ativadas principalmente pelo reconhecimento de substâncias estranhas ao organismo, como

lipoproteínas e carboidratos próprios de microorganismos, por exemplo (revisado por Fallon & Sun, 2001; Beutler, 2004).

A imunidade adquirida, que surgiu há aproximadamente 450 milhões de anos com os primeiros peixes providos de mandíbula, é baseada em mecanismos de rearranjos gênicos e expansão clonal, gerando memória celular pela produção de uma gama amplamente diversificada de receptores e de anticorpos específicos para reconhecimento de diferentes antígenos, principalmente proteínas. Isto resulta em uma resposta mais rápida e efetiva no caso de novas exposições ao mesmo antígeno ao longo da vida (revisado por Hoffmann *et al.*, 1999; Alberts *et al.* 2002).

Organismos unicelulares, invertebrados, fungos e plantas possuem somente imunidade inata. Esta "imunidade primitiva" tem despertado a atenção dos pesquisadores por apresentar aspectos estruturais e funcionais muito semelhantes para grupos diversos de organismos, o que significa uma conservação ao longo de centenas de milhões de anos de evolução (Hoffmann *et* al., 1999; Schulenburg *et al.*, 2004). Por outro lado, é inegável a variação nas estratégias da imunidade inata entre os invertebrados. A irradiação destes nos diferentes filos animais, gerando as mais variadas estratégias de vida e ocupação de habitats diversos, demanda variações na imunidade. Variações importantes podem ser encontradas até mesmo dentro de uma mesma ordem de insetos (p. ex. dípteros hematófagos/ dípteros que se alimentam de leveduras), dependendo do nível de exposição a patógenos, de acordo com o nicho ocupado (revisado por Dimopoulos, 2003; Loker *et al.*, 2004).

A eficiência da imunidade inata pode ser inferida pelo sucesso evolutivo dos invertebrados. Os insetos, em particular, cuja divergência com os vertebrados se deu há cerca de 500 milhões de anos, estão presentes em quase todos os ecossistemas,

apresentando a maior diversidade e abundância dentre os animais. O estudo minuncioso da imunologia de insetos revela um sistema altamente adaptado e efetivo contra uma gama de espécies microbianas em concentrações potencialmente fatais a vertebrados (revisado por Kavanagh & Reeves, 2004).

Drosophila melanogaster é o organismo-modelo para estudos da imunidade inata, desta forma, a maior parte da informação sobre imunidade em insetos advém de estudos desta espécie (revisado por Tzou *et al.*, 2002; Leclerc & Reinchhart, 2004).

Podemos considerar os revestimentos corpóreos como a primeira linha de defesa em qualquer organismo. Em insetos, a cutícula é uma barreira estrutural e química capaz de prevenir ou retardar a entrada de patógenos no organismo, revestindo a superfície externa, porções inicial e final do tubo digestivo (intestinos anterior e posterior), espiráculos e sistema traqueal. A cutícula é composta basicamente de fibrilas de quitina (um polissacarídeo) imersas em uma matriz protéica. A sua camada mais externa (epicutícula) apresenta ceras cuja composição apresenta propriedades antimicrobianas. O rompimento da cutícula ativa a síntese e secreção de antimicrobianos bem como a cascata da fenoloxidase (PO), importante para neutralização de microorganismos e cicatrização (revisado por Kavanagh & Reeves, 2004).

A membrana peritrófica é uma rede que repousa sobre a superfície apical do epitélio intestinal médio, composta por quitina, carboidratos e proteínas. Ela protege o epitélio contra abrasão, por evitar o contato direto com o material ingerido e a sua fina estrutura porosa proporciona uma permeabilidade seletiva que exclui alguns patógenos e toxinas do contato com as células (Klowden, 2002).

A cavidade corporal dos insetos (hemocele) é preenchida pela hemolinfa, um líquido composto por diferentes elementos celulares (os hemócitos) e um complexo de substâncias químicas. A hemolinfa é análoga ao sangue dos vertebrados, tendo funções de nutrição, excreção, sinalização e defesa, porém não desempenhando função respiratória. Os hemócitos realizam resposta imune celular (fagocitose, nodulação e encapsulação), bem como a síntese de alguns elementos da resposta humoral, os quais, junto com fatores secretados por outros tecidos (corpo gorduroso principalmente) têm acesso a diferentes partes do organismo ao circular pela hemolinfa, constituindo elementos centrais da resposta imune (Klowdem, 2002).

1.5.2. RECONHECIMENTO DO NÃO -PRÓPRIO

Um componente essencial da imunidade é a vigilância constante para detecção de elementos estranhos ou elementos que não possuam componentes reconhecidos como próprios. Este reconhecimento é o ponto de partida para o estímulo das cascatas de reações de defesa.

Insetos, da mesma forma que outros artrópodes e vertebrados, possuem mecanismos para reconhecer polímeros encontrados exclusivamente em microorganismos, como peptídeoglicanos (PGLC) e lipopolissacarídeos (LPS) de paredes bacterianas, β -1, 3 glucanas e β -1, 3 mananas de paredes fúngicas; os chamados PAMP (do inglês, *pathogen associated molecular patterns*). Isto se dá através de receptores específicos para esta função, os PRR (do inglês, *pattern recognition receptors*), os quais podem ser solúveis (humorais) ou ancorados em membranas celulares (revisado por Gillespie *et al.* 1997;

Lavine & Strand, 2002). Os PRR podem mediar respostas celulares como a fagocitose, desencadear cascatas de serino-proteases que ativam respostas de melanização ou regular a síntese e secreção de fatores antimicrobianos (revisado por Kavanagh & Reeves, 2004).

Vários fatores, incluindo lectinas, hemolina, proteína de ligação a LPS, proteína de reconhecimento de bactérias gram-negativas, proteína de reconhecimento de peptídeoglicanos e proteínas contendo tioéster (α TEP-1) são possíveis PRR humorais em insetos, atuando como opsoninas, promovendo respostas celulares como a fagocitose e nodulação, bem como a síntese de moléculas antimicrobianas. Há evidências de que algumas destas moléculas existam também na forma de receptores celulares. No entanto, os receptores celulares capazes de reconhecer PRR humorais ainda não são conhecidos (revisado por Lavine & Strand, 2002).

PRR celulares em insetos ainda são pobremente conhecidos. Proteínas do tipo Toll em mamíferos são PRR capazes de reconhecer LPS e outros PAMP, ativando vias de produção de citocinas pró-inflamatórias. Receptores Toll, proteínas relacionadas a Toll e a via IMD (*immune deficiency*) de dípteros mediam a ativação de genes antibacterianos e anti-fúngicos. No entanto, para insetos ainda não foi demonstrada a ligação de Toll a PAMP, o que faria deste um PRR verdadeiro, como em mamíferos. Tampouco se sabe com certeza a identidade do receptor que inicia a via IMD (revisado por Lavine & Strand, 2002; Kavanagh & Reeves, 2004; Naitza & Ligoxygakis, 2004). Acredita-se que a presença de microorganismos na hemolinfa induza cascatas proteolíticas que resultem na liberação de Spaetzle, o único ligante de Toll de dípteros descrito até o momento (revisado por Hoffmann *et al.*,1999). Mecanismos de reconhecimento de componentes próprios alterados, tecidos transplantados, bem como de elementos abióticos (fios de nylon, cápsulas de látex) também encontram-se praticamente desconhecidos. Há evidências de que integrinas expressas em hemócitos, como plasmatócitos e granulócitos, sejam potenciais receptores de reconhecimento (PRR celulares) de alvos microbianos e abióticos, estando envolvidas no processo de encapsulação. Sabe-se que danos à membrana basal levam ao reconhecimento de tecidos próprios como alterados. O receptor de superfície Croquemort, expresso em plasmatócitos de dípteros, está relacionado ao reconhecimento e fagocitose de corpos apoptóticos por estas células (Lavine & Strand, 2002, 2003).

1.5.3. IMUNIDADE HUMORAL

A imunidade humoral em insetos consiste principalmente nos processos de melanização, coagulação da hemolinfa e síntese de fatores antimicrobianos, além da liberação de PRR solúveis, como já comentado.

A melanização é um componente-chave para destruir uma série de microorganismos, bem como para a cicatrização de ferimentos. A síntese de melanina é catalizada pela enzima pro-fenoloxidase-monofenil-L-dopa (ProPO), encontrada na forma de zimógeno em alguns tipos de hemócitos, sendo liberada na hemolinfa pela ruptura da membrana plasmática, transportada para a cutícula, depositada em regiões de ferimentos ou em volta de material encapsulado. A fenoloxidase (PO) promove a hidroxilação de monofenóis e oxidação de fenóis a quinonas, levando à formação de melanina. As quinonas, por si só, são diretamente tóxicas para bactérias, fungos e protozoários. A seqüência protéica desta enzima é similar àquelas de proteínas do complemento de

vertebrados (C3 e C4). A ativação da ProPO é desencadeada por PRRs solúveis que se ligam ao alvo, e iniciam uma cascata de serino-proteases extracelulares levando à clivagem da ProPO em PO. Esta cascata também é controlada por inibidores de protease para manter a reação somente nas imediações do sítio de invasão e evitar efeitos deletérios (revisado por Gillespie *et al.*,1997; Cerenius & Söderhäll, 2004).

A coagulação da hemolinfa se dá por polimerização de proteínas através de transglutaminases dependentes de cálcio. As proteínas coaguláveis da hemolinfa de insetos possuem domínios ricos em cisteína, homólogos a domínios do fator von Willebrand de mamíferos, envolvido na cascata de coagulação sanguínea. Proteínas coaguláveis também podem ser liberadas na hemolinfa por grânulos de secreção de hemócitos em resposta à presença de microorganismos. A isto se segue uma cascata proteolítica que torna uma proteína solúvel em um agregado insolúvel, formando um gel capaz de imobilizar microorganismos (revisado por Kavanagh & Reeves, 2004).

Fatores antimicrobianos são essenciais para eliminar microorganismos em grande número. Estes fatores são liberados na hemolinfa, combatendo elementos da parede celular de bactérias e fungos. Peptídeos semelhantes são encontrados em outros invertebrados, vertebrados e plantas (Gillespie *et al.*, 1997).

Fatores antimicrobianos de insetos são secretados por células do corpo gorduroso, hemócitos, trato digestivo, glândulas salivares, trato reprodutor, túbulos de Malpighi e epiderme. Vários peptídeos anfipáticos são produzidos, os quais promovem a formação de poros ou canais iônicos na membrana plasmática, causando a morte dos microorganismos por lise (revisado por Bulet *et al.*, 2004).

Os peptídeos antimicrobianos mais freqüentemente descritos em insetos são as cecropinas, defensinas, drosomicinas, peptídeos ricos em glicina e peptídeos ricos em prolina (p. ex. drosocina e metchnikowina) (Gillespie *et al.*,1997).

Além destes peptídeos, algumas proteínas também apresentam atividade antimicrobiana, com mecanismos de ação mais diferenciados. A lisozima atua hidrolisando ligações β -1-4 presentes em cadeias de N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico da parede de bactérias gram-positivas. A família atacina/sarcotoxina II, bem como a diptericina, atuam contra bactérias gram-negativas, inibindo a síntese de componentes da membrana plasmática, bloqueando a divisão celular (Gillespie *et al.*, 1997).

Em *Drosophila*, fungos e bactérias gram-positivas induzem preferencialmente a expressão de genes de drosomicinas. Bactérias gram-negativas estimulam a expressão de atacinas, cecropinas, diptericinas, e drosocinas. Qualquer bactéria induz a produção de defensinas e quaisquer microorganismos induzem a expressão de metchnikowina (revisado por Leclerc & Reinchhart, 2004).

1.5.4. OS HEMÓCITOS : ORIGEM, CLASSIFICAÇÃO E FUNÇÕES

Ao contrário das vias da resposta humoral, as informações existentes na literatura sobre os hemócitos, sua classificação e funções são ainda bastante controversas. Ao longo de mais de 160 anos de estudo, por razões diversas (utilização de metodologias e critérios variados de classificação, rápida transformação, diferenciação ou labilidade celular após a coleta, diversidade morfológica nas diferentes ordens), foi gerada uma nomeclatura redundante para os hemócitos dos insetos (Gupta, 1979, 1991; Brehélin & Zachary, 1986).

Gupta, em 1979, revisou dados morfológicos próprios e de outros autores para hemócitos de vários grupos de insetos, trazendo importante colaboração para uma maior uniformização da classificação destas células. Com base em dados ultra-estruturais, este autor reconheceu inicialmente sete tipos principais de hemócitos (prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos, adipohemócitos, coagulócitos e oenocitóides). Naquele momento, todos estes tipos foram considerados presentes em representantes das ordens Blattaria, Coleoptera, Neuroptera, Lepidoptera e Diptera. Para outras ordens, um ou mais tipos poderiam estar ausentes, como no caso dos Collembola, nos quais somente granulócitos foram reconhecidos. Posteriormente, este mesmo autor reconheceu os coagulócitos como um variante dos granulócitos, reduzindo o número de tipos celulares gerais para seis (Gupta, 1991).

Brehélin e Zachary (1986), numa tentativa de "acabar com as controvérsias", propuseram uma classificação baseada em características ultraestruturais consideradas confiáveis, em funções e terminologias pré-existentes na literatura para as quais havia grande concordância e em novos termos para designar diferentes tipos de hemócitos contendo grânulos. Desta forma, nove tipos de hemócitos foram considerados distintos: prohemócitos, plasmatócitos, oenocitóides, esferulócitos, trombocitóides e quatro tipos de células granulares.

Apesar dos esforços dos pesquisadores nesta área de estudo, a tentativa de uma classificação única para hemócitos de insetos ainda permanece frustrada, principalmente em virtude da grande diversidade morfológica e funcional destas células para uma gama tão numerosa e diversificada de organismos.

A investigação sobre a classificação e função dos hemócitos de lepidópteros tem sido ampliada nos últimos anos, provavelmente devido ao crescente interesse no desenvolvimento de estratégias de controle de pragas da agricultura, muitas delas representadas por lepidópteros em sua fase larval, bem como para a otimização do manejo de espécies de importância econômica, p. ex. *Bombyx mori*. Estes estudos, que envolvem técnicas morfológicas, fisiológicas, imunológicas e de cultivo têm trazido uma certa homogeneidade no tocante à classificação dos hemócitos nesta ordem (Horohov & Dunn, 1982; Essawy *et al.*,1985; Sass *et al.*, 1994; Butt & Shields, 1996; Ribeiro *et al.*, 1996; Stettler *et al.*, 1998; Gardiner & Strand, 1999, 2000; Yamashita & Iwabuchi, 2001; Andrade *et al.*, 2003; Falleiros *et al.*, 2003; Ling *et al.*,2003; Nardi *et al.*, 2003).

Em uma revisão recente, Lavine & Strand (2002) consideram 5 tipos de hemócitos como os principais para os insetos, sendo todos presentes em lepidópteros: prohemócitos (pr), plasmatócitos (pl), hemócitos granulares ou granulócitos (gh), esferulócitos (sph) e oenocitóides (oe). Segue uma breve descrição destes tipos de hemócitos, com base em Gupta, (1979, 1991) e Brehélin & Zachary (1986).

Pr são células pequenas, arredondadas, de superfície regular, com uma alta relação núcleo/citoplasma, pobres em retículo endoplasmático granular (REG) e ricas em ribossomos livres. Possuem uma alta taxa mitótica e são tidas como as células-tronco de hemócitos, encontradas em órgão hemopoéticos, podendo também dividir-se quando livres na hemolinfa.

Pl são geralmente alongados ou fusiformes, com superfície irregular, apresentando micropapilas, filopódios ou outros processos celulares. O núcleo é pleomórfico, podendo apresentar-se bilobado. O citoplasma é abundante, rico em organelas, com REG bem

desenvolvido, constituído por numerosas cisternas estreitas. Algumas inclusões podem estar presentes, como lipídeos e glicogênio, bem como vesículas no citoplasma periférico. Em contato com uma superfície, estas células expandem o citoplasma e aderem à mesma. São células sabidamente envolvidas em processos como fagocitose, encapsulação e nodulação.

Gh são arredondados a ovais, tendo a superfície coberta por finas projeções citoplasmáticas. Apresentam complexo de Golgi desenvolvido e são geralmente ricos em REG, cujas vesículas podem apresentar-se altamente dilatadas. Apresentam grânulos característicos, cujas proporções e aspecto são variáveis, com relatos de que sua constituição seja glicoproteica. Brehélin & Zachary (1986) subdividiram os granulócitos em 4 tipos (gh1-4) de acordo com a composição de grânulos e possíveis funções. O tipo mais comumente descrito para lepidópteros coincide com a descrição de gh1. Estas células apresentam atividade fagocítica e estão envolvidas na encapsulação. Gh e pl constituir mais de 50% da população total destas células (Lavine & Strand, 2002).

Sph são células grandes, caracterizadas por possuírem o citoplasma praticamente tomado por grandes esférulas, as quais apresentam conteúdo granular, por vezes disposto em linhas concêntricas, de natureza glicoprotéica. A extrusão deste conteúdo na hemolinfa se dá por exocitose. O restante do citoplasma, reduzido a septos, apresenta REG e complexo de Golgi desenvolvidos. O núcleo é central e pequeno com relação ao tamanho da célula. Sph foram relatados como fonte de ProPO cuticular (Sass *et al.*, 1994).

Oe são células grandes, arredondadas, de superfície lisa, e baixa proporção núcleo/citoplasma. O citoplasma é caracterizado pela pobreza em organelas membranosas e

abundância em ribossomos livres, o que lhes confere um aspecto homogêneo. Oe apresentam atividade de fenoloxidase quando incubados com tirosina, DOPA ou Dopamina. Estas células apresentam comportamento lábil, com rompimento da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo celular instantes após o "sangramento" do inseto. Em coleópteros, estas células também realizam fagocitose (Giulianinni *et al.*, 2003).

Aparentemente, pr, pl e gh estão presentes na maioria dos insetos estudados, ao contrário de sph e oe, menos freqüentes, bem como outros tipos celulares descritos, tidos como secundários (revisado por Gupta, 1979, 1991; Brehélin & Zachari, 1986).

No embrião de *Drosophila melanogaster*, os hemócitos se originam de precursores do mesoderma cefálico, do qual se dispersam pelo organismo. Algumas destas células precursoras são sequestradas ao longo do vaso dorsal, onde constituem orgãos hemopoéticos. Nos estágios larvais, os hemócitos originam-se nestes órgãos, havendo também divisão e diferenciação destas células na hemolinfa (revisado por Fallon & Sun, 2001).

Yamashita e Iwabuchi (2001) demonstraram a capacidade mitótica e de diferenciação de pr de *B. mori* em cultura, confirmando a sua classificação como uma célula-tronco. Estas células originaram pl, gh e sph. Pl e gh foram capazes de auto-renovação. Parte dos gh produzidos ainda foi capaz de se diferenciar em sph. Oe, aparentemente, pertence a uma linhagem diferente dos outros tipos neste inseto. Por outro lado, estudos ultra-estruturais utilizando anticorpos específicos contra pl e gh em órgãos hematopoéticos de *M. sexta* sugerem origens distintas para estas células (Nardi *et al.*, 2003), de modo que, até o momento, não se encontram totalmente esclarecidas as relações entre os diferentes tipos de hemócitos quanto à origem.

1.5.5. IMUNIDADE CELULAR

A fagocitose é um componente integral da imunidade inata em praticamente todos os filos do reino animal, sendo essencial para a remoção de patógenos ou outros elementos estranhos, mesmos nos organismos que possuem os mecanismos mais complexos da imunidade adquirida. No entanto, *Caenorhabditis elegans* parece constituir uma exceção. Apesar de possuir coelomócitos, estes aparentemente não estão envolvidos com fagocitose ou nodulação de bactérias (Schulenburg *et al.*, 2004).

A fagocitose requer uma via de transdução de sinais para o recrutamento de células fagocíticas ao sítio de infecção, seguido do reconhecimento da partícula como estranha e o seu englobamento. Lectinas e outros PRR humorais ligam-se à partícula estranha, facilitando o seu reconhecimento por fagócitos. Alguns receptores em pl e gh guardam semelhança com receptores em fagócitos de mamíferos; é o caso de Malvolio e dSR-C1 com relação a NRAMP-1 (*natural resistance associted macrophage protein 1*) de ratos. Sabe-se que o cálcio é necessário para a adesão de pl ao alvo, enquanto gh necessitam da ativação da cascata de ProPO. No fagossomo, ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), os quais são eficientes contra microorganismos (revisado por Kavanagh & Reeves, 2004).

Nódulos são formados em resposta a um número de microorganismos invasores, consistindo de camadas de hemócitos e, para algumas espécies, melanina, podendo aderir a tecidos. Apesar da nodução se encontrar bem caracterizada em insetos, seus mecanismos de regulação ainda não foram totalmente esclarecidos. Sabe-se do envolvimento de lectinas neste processo (revisado por Kavanagh & Reeves, 2004). Experimentos *in vitro* com hemócitos isolados de *M. sexta* revelam que estas células sintetizam e secretam

eicosanóides (um conhecido mediador de mecanismos da imunidade em mamíferos), os quais têm se mostrado importantes para a microagregação destas células na presença de bactérias, bem como para outros processos, como a fagocitose (Miller & Stanley, 2001).

Estruturas maiores como protozoários, nematóides, ovos e larvas de insetos parasitóides são encapsuladas por múltiplas camadas de hemócitos. Mecanismos de encapsulação são mais estudados em modelos envolvendo larvas de lepidópteros e dípteros uma vez que estas são parasitadas por himenópteros.

No lepidóptero *Pseudoplusia includens*, a formação da cápsula é iniciada por gh que aderem ao alvo e que atraem pl pela liberação de um peptídeo que induz a expansão citoplasmática ou "espalhamento" de pl (PSP), induzindo a agregação destes. O processo é finalizado por uma camada de gh, para a qual foi relatada a ocorrência de apoptose (Pech & Strand, 1996, 2000).

A encapsulação de ovos de parasitóides himenópteros em larvas de *Drosophila* inicia com o aumento do número de hemócitos circulantes, sendo a cápsula formada pela deposição de várias camadas dos chamados lamelócitos. Partículas virais injetadas junto com os ovos podem transformar estas células, diminuindo a sua capacidade de adesão, evitando assim a encapsulação (Russo *et al.*, 2001).

1.6. IMUNIDADE CONTRA VÍRUS

Se a imunidade de insetos como um todo ainda constitui um grande mistério, os mecanismos relacionados a respostas anti-virais permanecem praticamente em total obscurantismo. A imunidade celular e a apoptose são as estratégias imunes anti-virais melhor descritas até o momento, o que se deve em grande parte ao estudo dos baculovírus.

Trudeau e colaboradores (2001) compararam a rota de infecção de AcMNPV em larvas de *Heliothis virescens* (permissiva) e *Helicoverpa zea* (semi-permissiva). Foi observado que tanto a infecção primária no intestino médio, quanto a infecção secundária traqueal ocorrem normalmente em ambas espécies, porém, a partir deste ponto, a infecção em *H. zea* passa a ser contida pela baixa infectividade dos hemócitos e pela capacidade destas células de eliminar vírus da circulação, encapsular e melanizar focos de infecção traqueais. Em *Manduca sexta*, outra espécie semi-permissiva a AcMNPV, também ocorre a encapsulação de focos de infecção traqueais (Washburn *et al.*, 1996). A co-infecção com uma espécie de polydnavírus, a qual provoca apoptose em hemócitos e consequente imunossupressão em larvas de lepidóptero, eleva a susceptibilidade de *M. sexta* a AcMNPV (Washburn et al., 2000), comprovando a importância dos hemócitos para o controle da infecção por baculovírus neste inseto.

Em *S. frugiperda* os hemócitos mostram-se resistentes à infecção por AcMNPV, mesmo através de inoculação intrahemocélica. Em comparação a larvas de *T. ni*, nas mesmas condições experimentais, torna-se necessária a inoculação de uma dose mil vezes maior para o início da infecção, tornando a disseminação entre diferentes tecidos e a progressão do título de BV na hemolinfa mais lentas (Clarke & Clem, 2002). Neste caso, a resistência tecido-específica mostra-se como um fator limitante do espectro de hospedeiros de baculovírus.

Inoculação intrahemocélica de BV de AcMNPV induz apoptose massiva em hemócitos e em outros tipos celulares de *Spodoptera litura*, uma espécie não-permissiva a este vírus, estando associada a baixas taxas de infectividade e propagação virais (Zhang *et al*, 2002). Este resultado evidencia a apoptose como um fator limitante do espectro de

hospedeiros em infecções por baculovirus, especialmente por se tratar de apoptose induzida por um vírus selvagem, portando pelo menos um gene antiapoptótico, o que confirma a importância da apoptose como defesa anti-viral em insetos (Clarke & Clem, 2003b).

Um elemento anti-viral capaz de prejudicar a infecção por baculovírus em uma fase anterior às já citadas (infecção das células intestinais por ODV) foi purificado do suco digestivo de larvas de *B.mori*. Trata-se de uma lipase (Bm lipase-1) capaz de suprimir a morte das larvas por ODV de BmMNPV quando administrada em uma dose de 2,2 μ g/larva em conjunto com 22,95 ng de ODV (Ponnuvel *et al.*, 2003).

O vírus de planta *Tomato spotted wilt tospovirus* infecta o seu principal vetor, o thrips *Frankliniella occidentalis*, sendo mantido a baixos títulos na hemolinfa. A infecção pelo vírus leva à ativação de genes homólogos a genes de função imune de dípteros como antimicrobianos, lectinas, receptores Toll - 3, elementos da via de transdução de sinais ativada por receptores do tipo Toll, dentre outros não identificados ou sem função relacionada à imunidade. Os autores especulam que a ativação destes genes esteja relacionada à manutenção dos baixos títulos virais em larvas infectadas bem como à resistência de adultos ao vírus (Medeiros *et al.*, 2004).

Um fator semelhante a citocinas, chamado Alloferon, descrito para o diptero *Callifora vicina*, é capaz de estimular células *natural killer* de mamífero *in vitro*. Este fator também induz a produção de interferon em ratos, apresentando propriedades antivirais e antitumorais, um achado inicial que sugere a existência de vias de sinalização para reconhecimento e eliminação de células infectadas por vírus em insetos (Chernysh *et al.*, 2002).

RNA de interferência (RNAi) é uma resposta causada pela presença de RNA fitadupla (RNAds) na célula e que, posteriormente, é endereçada a qualquer sequência de RNA homóloga ao RNAds estranho, suprimindo a sua expressão. Vários vírus de invertebrados possuem RNA de fita-simples (RNAss) ou RNAds como material genético, de forma que, para a replicação, em algum momento será produzido RNAds. Em *Drosophila*, o vírus de RNA flock house virus (FHV) foi demonstrado como desencadeador e alvo de RNAi, no entanto o genoma deste vírus codifica uma proteína, B2, que age como um supressor de RNAi, demonstrando a importância deste mecanismo na imunidde de insetos contra vírus (revisado por Lecellier & Voinnet, 2004; Loker *et al.*, 2004).

1.7. CONTEXTO: O BACULOVIRUS MUTANTE VAPAG

A biologia molecular do baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) bem como a sua interação com insetos hospedeiros e cultura de células de insetos vêm sendo estudados no laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia da Universidade de Brasília (UnB) há mais de dez anos.

Durante a construção de um baculovírus AgMNPV recombinante, contendo o gene da β- galactosidase de *Escherichia coli* (Ribeiro *et al.*, 2001), foi obtido além de vírus recombinantes e não recombinantes, um mutante (vApAg), cuja infecção induz a morte prematura de células de uma linhagem permissiva, derivada de *Anticarsia gemmatalis*, UFL-AG-286 (Sieburth & Maruniak, 1988a) e que se replica normalmente em outra linhagem, derivada de *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) (Tn-5B) (Granados *et al.*, 1994). Investigou-se o processo infeccioso de vApAg em células UFL-AG-286 e Tn-5B e a ocorrência de clivagem oligonucleossomal do DNA das mesmas. Para fins comparativos, os mesmos estudos foram realizados para o baculovírus vP35del, em células UFL-AG-286 (Silveira *et al.*, 1999). O vírus vP35del é derivado de AcMNPV e contém uma deleção no gene antiapoptótico *p35*, sendo incapaz de bloquear a apoptose em várias linhagens celulares (Clem *et al.*, 1994).

Observou-se que células UFL-AG-286 infectadas por vApAg e vP35del morrem por apoptose, porém de forma significativamente diferente. O vírus vApAg induz apoptose massiva em até 48 h, havendo a clivagem oligonucleossomal do DNA a partir de 48 h de infecção, com a produção de BV e poliedros. Já vP35del induz a morte de células UFL-AG-286 mais rapidamente, em até 16 h, com clivagem do DNA a partir de 9 h de infecção, sem quaisquer sinais de replicação viral. Foram ainda observadas diferenças quanto à condensação cromatínica (que não ocorre quando da replicação viral) e no padrão de fragmentação celular, influenciado pelo acúmulo de agregados fibrilares, que ocorre na infecção por vApAg (Silveira *et* al., 1999).

A progênie de vApAg (BV) em células UFL-AG-286 mostrou-se reduzida 100 vezes quando comparada à derivada de AgMNPV na mesma linhagem celular. A porcentagem de células apresentando poliedros com 48 h de infecção também foi reduzida (79% para AgMNPV e 10% para vApAg). Compatível com a morte massiva em tempos tardios, a partir de 48 h de infecção a síntese protéica é abolida (Castro & Ribeiro, 2001). Para a linhagem Tn-5B não houve diferença significativa na progênie obtida para os dois vírus, replicação do DNA viral ou síntese proteica (Castro & Ribeiro, 2001). A infectividade de vApAg através da ingestão de poliedros por larvas de *A. gemmatalis* é
reduzida quando comparada àquela de AgMNPV nas mesmas condições. A LC_{50} de vApAg é cerca de cinco vezes maior do que para AgMNPV, o que reforça a hipótese da apoptose como mecanismo de defesa contra vírus em insetos (Castro *et al.*, 2002).

Mais recentemente, a partir do estudo comparativo dos perfis de restrição de AgMNPV e vApAg (Castro & Ribeiro, 2001), obteve-se a localização, sequência e padrão de expressão do gene *iap-3* de AgMNPV (Carpes *et al.*, no prelo) (número de acesso GeneBank AY525121). Este gene encontra-se interrompido por um transposon no mutante vApAg, provável causa da falha deste vírus no bloqueio da apoptose *in vitro*, redução da progênie viral e redução da infectividade oral observadas (Carpes, 2004). A transfecção de quantidades crescentes de plasmídeo contendo o gene *iap-3* de AgMNPV em células UFL-AG-286 infectadas por vApAg promove índices reduzidos de morte celular por apoptose, o que demonstra a função anti-apoptótica deste gene (Carpes *et al.*, no prelo).

1.8. Objetivos

1.8.1. OBJETIVO GERAL

Verificar se o vírus vApAg e um vírus *p35*⁻ derivado de AcMNPV (vHSGFP/P35del) induzem apoptose *in vivo* em larvas de *Anticarsia gemmatalis*. Para tanto, foi adotado como modelo de estudo os hemócitos e, no sentido de evitar as barreiras naturais de infecção, foi realizada injeção intrahemocélica de BV.

1.8.2. Objetivos específicos

• Caracterizar a população de hemócitos larvais de Anticarsia gemmatalis (Item 2.1.);

• Estudar o processo infeccioso do vírus AgMNPV e do mutante vApAg em hemócitos larvais de *Anticarsia gemmatalis*, verificando a mortalidade das larvas, os tipos de hemócitos susceptíveis à infecção, a sequência de eventos da morfogênese viral, a ocorrência de apoptose e ocorrência de fragmentação oligonucleossomal do DNA (Itens 2.2. e 3.1.);

• Estudar o processo infeccioso de vírus recombinantes derivados de AcMNPV (vHSGFP e vHSGFP/P35del) em hemócitos larvais de *Anticarsia gemmatalis*, verificando a mortalidade das larvas, a porcentagem de hemócitos infectados ao longo do tempo, os tipos de hemócitos susceptíveis à infecção, a sequência de eventos da morfogênese viral e a ocorrência de apoptose (Item 3.2.).

2.1. CHARACTERIZATION OF LARVAL HAEMOCYTES FROM THE VELVETBEAN CATERPILLAR *Anticarsia gemmatalis* (HÜBNER) (LEPIDOPTERA:NOCTUIDAE)

Eni Braga da Silveira, Bergmann Morais Ribeiro, Sônia Nair Báo

Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology, 35 (2003) 129-139

Characterization of larval haemocytes from the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)

E. BRAGA DA SILVEIRA*°, B. MORAIS RIBEIRO° and S.N. BÁO°

*Department of Cellular Biology, Institute of Biological Sciences, State University of Campinas, SP; "Department of Cellular Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, DF, Brazil

SUMMARY - Larval haemocytes of Anticarsia gemmatalis (Lepidoptera: Noctuidae) are presented and classified based on morphological characteristics. Haemolymph samples collected from 3rd to 6th instar larvae were observed using differential interference contrast microscopy as well as processed for transmission and scanning electron microscopy. Five general types of haemocytes were observed: prohaemocytes (Pf), plasmatocytes (Pl), granular haemocytes (GH), oenocytoids (Oe) and spherulocytes (SPh). Granular haemocytes were subdivided into two morphologically different subtypes (GH 1 and GH 2). Phenoloxidase activity was clearly observed in the Oe, and also less intensely in the Sph. The osmium/imidazole buffer technique revealed that GH 2 accumulated numerous, small lipid vesicles among their granules, while Pl contained larger but less numerous lipid inclusions. Total haemocyte counts varied between 12.3 and 20.9 \times 10³ haemocytes/µl. Pl, GH 1 and Sph were the cell types more frequently observed in all larval stages studied. GH 2 were rare in 3rd and 4th instars, becoming more numerous after the inception of the 5th instar. Populations of GH 1 and Sph maintained their proportions throughout larval development. Populations of Oe, Pl and Pt, however, presented more marked variations in their proportions. Ultrastructural studies were shown to be useful for the identification and classification of haemocytes, facilitating further analysis by light microscopy.

Key WORDS Anticarsia gemmatalis - haemocytes - haemolymph - lipid - morphology - phenoloxidase

INTRODUCTION

The haemocytes of insects comprise a complex of cell types that are involved in defense responses as wound repair, phagocytosis, nodule formation, encapsulation, coagulation, synthesis and secretion of immunologic factors, basal lamina formation and absorption, and secretion of cuticle proteins (Grégoire, 1974; Whitcomb *et al.*, 1974; Gupta, 1991).

The classification of insect haemocytes has long been a controversial subject because of the multiplicity of terminologies adopted by different authors for each cell type, generated by differences among insect groups and in the methodologies used. In the last three decades, the use of electron microscopy for ultrastructural studies of haemocytes has been instrumental in recognizing major types of insect haemocytes, with some discrete controversies still remaining. For Lepidoptera, specifically, five main types of haemocytes have been recognized: prohaemocytes (Pr), plasmatocytes (Pl), granulocytes or granular cells (Gr), oenocytoids (Oe) and spherulocytes (Sph) (Beaulaton, 1979; Gardiner and Strand, 1999).

The velvetbean caterpillar Anticarsia gemmatalis is an important pest in the Americas, responsible for half the pesticide applications on soybean (*Glycine max*) crops in Brazil (Moscardi, 1998). During the last twenty years, significant advances have been achieved in the biological control of this pest by the application of a baculovirus (Anticarsia gemmatalis M nucleopolyhedrovirus - AgMNPV). For soybean crops, the success of biological control represents an important reduction in production costs and environmental damage due to the decreased use of chemical pesticides (Ribeiro et al., 1998).

Larval haemocytes from Anticarsia gemmatalis 129

Mailing address: Dr. Sônia Nair Báo, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF 70919-970, Brazil; e-mail: snbao@unb.br

Up to now, the understanding of insect immunity against viruses has been very poor. Some pioneer studies have shown that the cellular immune response is important in circumvention of an infection by a baculovirus (*Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus - AcMNPV) in semi-permissive lepidopteran larvae, such as *Helicoverpa zea* (Washburn *et al.*, 1996; Trudeau *et al.*, 2001) and *Manduca sexta* (Washburn *et al.*, 2000). This response was shown to make up one of the factors that determine the host range of a baculovirus species. Under these circumstances, more investigation about insect haemocytes and their functions is necessary for the improvement of biological control strategies using baculoviruses.

With the attempt to provide background knowledge to further studies about baculovirus infection in *Anticarsia gemmatalis* haemocytes, we have carried out a first characterization of these cells. The haemocyte types were identified through structural and ultrastructural characteristics. Cell diameters were measured and the presence of lipids and phenoloxidase activity was analyzed by cytochemical methods. Furthermore, total haemocyte counts (THC) and differential haemocyte counts (DHC) during the larval period were monitored.

MATERIALS AND METHODS

Insects

A. gemmatalis larvae were reared on artificial diet at room temperature (25 °C). The molts were monitored, and larvae between the 3rd and 6th instar were used.

Light microscopy

For differential/interference contrast microscopy (DIC), fresh haemolymph collected from a punctured proleg or haemolymph processed for phenoloxidase activity detection, as described below, was directly observed in an Axiophot-Zeiss light microscope.

Transmission and scanning electron microscopy

For transmission electron microscopy (TEM), the haemolymph was collected from a punctured proleg and fixed for 30 min (2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.4 with 5% sucrose). After fixation, it was centrifuged at 750 g for 5 min, the pellet was washed in the same buffer, post-fixed (1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferricyanide in the same buffer), contrasted with 0.5% uranyl acetate, dehydrated in acetone, and embedded in Spurr's resin. The ultrathin sections were contrasted with lead citrate/uranyl acetate and observed in a TEM JEOL 100C at 80 kV.

For scanning electron microscopy (SEM), the haemolymph was collected on coverslips covered with poly-L-lysine film; and after 5 min of adhesion, they were fixed and washed as described for TEM. Cells were next post-fixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated in acetone, and critical point-dried in CO_2 . The dried specimens were finally coated with gold in a sputter coater before being observed in a SEM JEOL JSM 840 at 5 kV.

Phenoloxidase activity detection

For phenoloxidase activity detection we adapted the protocol followed by Ribeiro *et al.* (1996). In brief, haemolymph was collected and fixed for 30 min in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.4 with 5% sucrose. After fixation, haemolymph was centrifuged at 750 g for 5 min, washed in sodium cacodylate buffer, and incubated in the dark for 3 h with 0.1% L-DOPA in 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.4. After being washed in sodium cacodylate buffer, a sample was taken for observations with DIC, and the remaining material was post-fixed, dehydrated and embedded as described above. Control samples omitted L-DOPA during incubation time. Ultrathin sections were observed and photographed in a TEM JEOL 100C at 80 kV without addition of lead citrate or uranyl acetate.

FIGURE 3*a-d* Granular haemocyte 1. (*a,b*) Transmission electron micrographs. g: Golgi complex; n: nucleus; m: mitochondria; r: rough endoplasmic reticulum, with dilated vesicles filled with electron dense material; d: dense granule; s: structured granule; u: unstructured granule. Arrowhead: exocytosis of an unstructured granule. Bars = 1 μ m and 0.5 μ m, respectively. (*c*) Scanning electron micrograph. Arrowheads: surface projections. Bar = 1 μ m. (*d*) DIC micrograph. Arrowhead: surface projections. Bar = 10 μ m.

FIGURE 1*a-c* Prohaemocyte. (a) Transmission electron micrograph.⁷ n: nucleus; nu: nucleolus; m: mitochondria; r: rough endoplasmic reticulum. Bar = 1 µm. (b) Scanning electron micrograph. Bar = 1 µm. (c) DIC micrograph. Arrowhead: midbody joining two prohaemocytes at the end of a cell division. Bar = 10 µm.

FIGURE 2*a-d* Plasmatocyte. (*a*) Transmission electron micrograph. g: Golgi complex; n: nucleus; m: mitochondria; r: rough endoplasmic reticulum; v: peripheral vacuole; arrowheads: surface projections. Bar = 2 μ m. (*b*) Transmission electron micrograph of a plasmatocyte treated with osmium/imidazole buffer for lipid detection. n: nucleus; arrowhead: lipid inclusions. Bar = 1 μ m. (*c*) Scanning electron micrograph. n: nucleus; arrowheads: surface projections. Bar = 3 μ m. (*d*) DIC micrograph. n: nucleus; arrowhead: surface projections. Bar = 1 μ m.

¹³⁰ BRAGA DA SILVEIRA E., MORAIS RIBEIRO B. and BAO S.N.



Larval haemocytes from Anticarsia gemmatalis 131



132 BRAGA DA SILVEIRA E., MORAIS RIBEIRO B. and BÁO S.N.

Lipids detection

For the detection of lipids, we adopted the osmium/imidazole buffer method (Angermüller and Fahimi, 1982). Haemocytes were fixed and washed as described in the previous paragraph for phenoloxidase activity detection. They were subsequently washed with 0.1 M imidazole buffer (pH 7.5), post-fixed for 30 min with 2% osmium tetroxide in 0.1 M imidazole buffer (pH 7.5), and finally washed with imidazole buffer, before being dehydrated and embedded as described above. Controls were prepared by substituting imidazole buffer with sodium cacodylate buffer in all steps. Ultrathin sections were observed and photographed with a TEM JEOL 100C at 80 kV without addition of lead citrate or uranyl acetate.

Cell-dimensions measurements

Fresh samples of haemolymph were collected in a hemacytometer chamber (0.1 mm in depth) and observed with a phase-contrast microscope. Images were captured, and celldiameter and cell-length measurements were made using the program ImagePro (Mediacy). The number of cells measured from each haemocyte type varied according to how frequently they could be found in samples. For plasmatocytes, only fusiform cells were measured.

Total haemocyte counts

For total haemocyte counts (THC), molts were monitored and eight different developmental stages were established: 3rd instar (late), 4th instar (early), 4th instar (mature), 4th instar (late), 5th instar (early), 5th instar (mature), 5th instar (late). 'Early' designates minutes after molting; 'mature', between 24-40 h after molting; and 'late' refers to caterpillars at the 'head slippage' stage, when a molt is imminent. For each stage, 20 larvae were used. For each individual, 0.5-2.0 μ l of haemolymph (according to larval size) were collected, diluted 10× or 20× in anticoagulant buffer (0.098 M NaOH, 0.186 M NaCl, 0.017 M EDTA, 0.041 M citric acid) (Mead *et al.*, 1986), homogenized and counted in a hemacytometer chamber (0.1 mm in depth). We used ANOVA to verify if the values obtained were significantly different and Tukey's test to identify the values that presented these differences.

Differential haemocyte counts

For differential haemocyte counts (DHC), the same eight developmental stages were examined, and haemolymph samples were collected from 20 individuals at each stage. The samples were diluted in the same buffer, homogenized, and transferred to a hemacytometer chamber. Approximately 250 cells/individual were counted in different fields. We used ANOVA to verify if the proportions obtained for each cell type were significantly different during the larval development. The Tukey's test was used to verify the values that presented these differences. For the cell types whose data group did not attend ANOVA premises, we applied the Kruskal-Wallis test in a non-parametric procedure. For the adjustment of proportions to ANOVA, and adequate application of statistical tests, we used recommendations provided by Zar (1999). All significance levels herein adopted were 5%. Statistical analysis were carried out by Statistical Analysis System (SAS), v. 8 for Windows.

RESULTS

Haemocyte types: morphological and cytochemical characteristics

By observing common points found in some previous light and electron microscopy studies of haemocytes in insects, especially in Lepidoptera (for a review, see Brehélin and Zachary, 1986; Gupta, 1979, 1991) and comparing them with our data, we could identify five general haemocyte types in *A. gemmatalis* larvae: prohaemocytes (Pr), plasmatocytes (Pl), granular haemocytes or granulocytes (GH), oenocytoids (Oe) and spherulocytes (Sph). Brehélin and

Larval haemocytes from Anticarsia gemmatalis 133

FIGURE 4*a-e* Granular haemocyte 2. (*a,b*) Transmission electron micrographs. n: nucleus; r: rough endoplasmic reticulum; d: dense granules; v: Golgi-derived vesicles clumping to originate dense granules. Bars = 1 μ m. (*c*) Transmission electron micrograph of a granular haemocyte 2 treated with osmium/imidazole buffer for lipid detection. n: nucleus; d: dense granule; arrowheads: lipid inclusions. Bar = 1 μ m. (*d*) Scanning electron micrograph. Arrowheads: surface projections. Bar = 2 μ m. (*e*) DIC micrograph. Bar = 10 μ m.

FIGURE 5*a*-*d* Oenocytoid. (*a*, *b*) Transmission electron micrographs. n: nucleus; r: rough endoplasmic reticulum; m: mitochondria. Bars = 2 μ m (*a*) and 1 μ m (*b*). (*c*) Scanning electron micrograph. n: nucleus. Bar = 1 μ m. (*d*) DIC micrograph. n: nucleus. Bar = 10 μ m.

FIGURE 6*a*-*d* Spherulocyte. (*a*, *b*) Transmission electron micrographs. n: nucleus; r: rough endoplasmic reticulum; m: mitochondria; s: spherule; arrowhead: secretion product disposed in a looser manner into a spherule. Bars = 2 μ m (*a*) and 0.5 μ m (*b*). (*c*) Scanning electron micrograph. Asterisk: spherules. Bar = 1 μ m. (*d*) DIC micrograph. Bar = 10 μ m.

 TABLE 1

 Higher and lower dimensions of Anticarsia gemmatalis larval haemocytes*.

Haemocyte	n	Higher dimension	Lower Dimension		
Pr	43	6.0 ± 1.0	5.4±0.9		
Pl	106	18.2 ± 3.9	6.6 ± 1.4		
GH 1	148	8.9 ± 1.5	8.1 ± 1.3		
GH 2	98	13.7 ± 2.7	10.7 ± 1.5		
Oe	81	13.2 ± 2.6	12.3 ± 2.5		
Sph	185	11.3 ± 1.7	7.3 ± 1.1		

*Values in μ m, means \pm SD.

Zachary (1986) separated granular haemocytes into four different subtypes based on ultrastructural characteristics of their granules. According to this separation, we identified granular haemocytes 1 (GH 1) and granular haemocytes 2 (GH 2) in the haemolymph of *A. gemmatalis*.

Prohaemocytes (Pr): These were the smallest cells observed, which range in diameter from 5.4 μ m to 6.0 μ m (Table 1). These cells are generally spherical in shape, with a smooth surface (Fig. 1*b*), some mitochondria, sparse rough endoplasmic reticulum, many free ribosomes and a high ratio nucleus/cytoplasm (Fig. 1*a*). The contours of the nuclei are relatively smooth. Each nucleus contains many patches of condensed chromatin and an evident nucleolus (Fig. 1*a*). Cytoplasmic inclusions were not found. In the light microscope, it has been possible to note some of these cells during cytokinesis (Fig. 1*c*).

Plasmatocytes (Pl): This cell type assumes variable forms that can be fusiform, round or oval. The fusiform cells are on average 6.6 μ m in diameter and 18.2 μ m in length (Table 1). Their surfaces are irregular, presenting many membrane projections and peripheral vacuoles (Fig. 2a).

The nucleus is irregular in shape, often bilobate, and contains many patches of condensed chromatin. The cytoplasm is dense, with many mitochondria, free ribosomes, rough endoplasmic reticulum and Golgi complexes (Fig. 2*a*). In some cases, glycogen granules (not shown) could be found and also scarce, larger inclusions, whose lipid content was revealed by the osmium/imidazole buffer technique (Fig. 2*b*). After adherence to coverslips, these cells became flattened, with many lamellipodia and filopodia (Fig. 2*c*,*d*). With SEM, a granular region was evident around the nucleus of spread cells (Fig. 2*c*).

Granular haemocytes 1 (GH 1): These cells are spherical, with diameters between 8.1 µm and 8.9 µm (Table 1). GH 1 are characterized by the presence of three types of granules: structured granules, containing material arranged in a highly ordered lattice; unstructured granules, containing flocculent material and being generally larger than the structured granules; and dense granules, presenting a homogeneous and moderately electron-dense content (Fig. 3a,b). Exocytosis of the contents of unstructured granules was observed with some frequency (Fig. 3b). The rough endoplasmic reticulum is well developed, with dilated cisternae full of moderately electron-dense material. The cytoplasm also contains many free ribosomes, mitochondria and welldeveloped Golgi complexes. The nucleus is large, round and presents small patches of condensed chromatin (Fig. 3a). The cell surface is rich in fine and long projections that are easily noted at light microscope (Fig. 3c,d).

Granular haemocytes 2 (GH 2) - These cells can be spherical or somewhat elongated, and can present some sparse, short surface projections (Fig. 4*d*). Their diameters vary between 10.7 μ m and 13.7 μ m (Table 1). Their granules are larger and more numerous than the granules of GH 1, being easily noted with DIC (Fig. 4*e*). Besides this difference, these granules are exclusively of the dense type, showing moder-

TABLE 2	
Differential haemocytes counts (DHC) for different stages of A. gemmatalis larval development	nt

Cell type	Larval stage								
	3rd instar late	4th instar early	4th instar mature	4th instar late	5th instar early	5th instar mature	5th instar late	6th instar early	
Pr Pl GH 1 GH 2 Oe Sph	$\begin{array}{rrrr} 3.1 \pm & 1.9a \\ 37.4 \pm & 13.1a \\ 26.1 \pm & 12.5b \\ 0.2 \pm & 0.5c \\ 6.5 \pm & 4.3b,c \\ 26.7 \pm & 12.8a \end{array}$	$\begin{array}{r} 3.3 \pm 1.9a \\ 26.0 \pm 10.6a,b,c \\ 29.1 \pm 10.1a,b \\ 0.6 \pm 0.8b,c \\ 10.6 \pm 6.1a \\ 30.5 \pm 9.4a \end{array}$	$\begin{array}{c} 2.2 \pm 1.4 a, b \\ 27.7 \pm 7.5 a, b \\ 27.9 \pm 10.2 b \\ 0.8 \pm 1.0 b, c \\ 9.3 \pm 3.7 a, b \\ 32.2 \pm 10.9 a \end{array}$	$\begin{array}{r} 1.9 \pm 1.3 a, b \\ 28.7 \pm 11.7 a, b \\ 30.3 \pm 12.0 a, b \\ 0.5 \pm 0.6 b, c \\ 6.6 \pm 3.6 a, b, c \\ 32.0 \pm 16.0 a \end{array}$	$\begin{array}{r} 1.5 \pm 1.3b \\ 18.7 \pm 11.1c, d \\ 39.0 \pm 13.9a \\ 1.8 \pm 2.1b \\ 5.0 \pm 1.7c \\ 34.0 \pm 14.5a \end{array}$	$\begin{array}{rrrr} 2.7 \ \pm \ 1.5a \\ 22.9 \ \pm \ 9.3b,c \\ 32.8 \ \pm \ 10.8a,b \\ 6.3 \ \pm \ 3.1a \\ 5.5 \ \pm \ 2.6c \\ 29.9 \ \pm \ 13.6a \end{array}$	$\begin{array}{rrrr} 1.7 \pm & 0.8a,b \\ 10.7 \pm & 5.9d \\ 39.4 \pm 12.5a \\ 8.5 \pm & 5.9a \\ 9.1 \pm & 4.4a,b \\ 30.5 \pm 13.6a \end{array}$	$\begin{array}{rrrr} 1.2 \pm & 1.0b \\ 19.4 \pm & 8.0b,c,d \\ 36.4 \pm & 10.2a,b \\ 5.8 \pm & 3.5a \\ 6.2 \pm & 2.8b,c \\ 31.0 \pm & 13.5a \end{array}$	

* % haemocytes, means \pm SD, n = 20 for each stage, 200-300 cells counted for each larvae. For each cell type, any given pair of values labeled with at least one letter in commom are not significantly different (Tukey's test, α = 0.05).

134 BRAGA DA SILVEIRA E., MORAIS RIBEIRO B. and BAO S.N.



FIGURE 7*a-c* Phenoloxidase activity detection. (*a,b*) DIC micrographs. Arrows: oenocytoids stained in dark black; arrowheads: spherulocytes, stained in light black. Bars = 40 μ m (*a*) and 20 μ m (*b*). (*c*) Transmission electron micrograph. Oe: oenocytoid; Pl: plasmatocyte; n: nucleus. Bar = 3 μ m.

ate electron density in ultrathin sections (Fig. 4a, b). We could observe that small vesicles from the Golgi complex aggregate to originate these granules (Fig. 6b). The cytoplasm is rich in rough endoplasmic reticulum, free ribosomes, and mitochondria. The nucleus is elongated, presenting patches of condensed chromatin, primarily concentrated near the nuclear envelope. The osmium/imidazole technique revealed the existence of numerous, small lipid inclusions distributed throughout the cytoplasm of these cells and interspersed among the granules (Fig. 4c).

Oenocytoids (Oe) - These cells are typically round, with a smooth surface (Fig. 5c,d), and presents diameters between 12.3 and 13.2 μm (Table 1). The nucleus is small, round, and eccentric many times, with patches of condensed chromatin that are homogeneously distributed. The cytoplasm is characteristically opaquely homogeneous, poor in membranous organelles and rich in free ribosomes. Sometimes, dilated cisternae from the rough endoplasmic reticulum can be observed (Fig. 5b). Glycogen granules were found in some of these cells (not shown). Mitochondria are concentrated in the cellular periphery (Fig. 5a,b). Oe reacted positively after incubation with L-DOPA (Fig. 7). With light microscopy, it was evident that almost all of the Oe in a field were darkly labeled (Fig. 7a). At the ultrastructural level we detected some subtle differences in electron density between Oe and the other cell types (Fig. 7c).

An interesting characteristic of Oe is their labile nature. Observations with the light microscope revealed that after bleeding, these cells promptly lyse at one or a few points in their membrane, ejecting their cytoplasm to the exterior medium (not shown).

Spherulocytes (Sph): These cells are, in general, somewhat oval, averaging 7.3 µm in diameter and 11.3 µm in length (Table 1). The peculiar characteristic of this cell type is the existence of large vesicles (spherules) that occupy almost the entire cytoplasm, and that protrude beneath the plasma membrane (Fig. 6c, d). The spherules are occupied by a granular, symmetrical material that can be arranged as concentric layers or in a less organized manner (Fig. 6a, b). The thin cytoplasmic portions that could be found between vesicles and the central and small nucleus are dense, rich in rough endoplasmic reticulum with dilated vesicles, free ribosomes and mitochondria (Fig. 6a,b). Despite the general aspect of a highly differentiated cell type, cell division occurs with some frequency, producing round daughter cells with smaller diameters and spherules of reduced size (not shown). After incubation with L-DOPA, some spherulocytes became dark or brown, revealing some phenoloxidase activity with light microscopy (Fig. 7a,b). With TEM, it was not possible to note electron density differences between these cells and those of others that were negative for this reaction.

Total haemocyte counts (THC)

The total haemocytes counts throughout the larval stages of *A. gemmatalis* varied between 12.3 and 20.9×10^3 haemocytes/µl (Fig. 8). All of the premises of ANOVA were met, and the test revealed significant differences among THC values for the samples studied (ANOVA, $F_{7,152(2)} = 3.43$; P = 0.002). All means and significant differences are shown in Fig. 8. Differences were found between THC values from 4th instar mature and 3rd instar late (Tukey's test P = 0.0237), 4th instar mature and 5th instar early (Tukey's

Larval haemocytes from Anticarsia gemmatalis 135



FIGURE 8 THC variation among different stages of *Anticarsia gemmatalis* larval development. n = 20 for each stage. Data are presented as means \pm SD. Values labeled with at least one letter in common are not significantly different (Tukey's test, $\alpha = 0.05$).

test P = 0.0305), 4th instar mature and 5th instar late (Tukey's test P = 0.0185), as well as 4th instar mature and 6th instar early (Tukey's test P = 0.0139).

Differential haemocyte counts (DHC)

GH 1, Pl and Sph were the most conspicuous cell types throughout all the larval stages studied, together constituting between 80.6 and 91.7% of the total cell population. Pr were rare along all the larval stages, constituting between 1.2 and 3.3% of the cell population, followed by GH 2 (0.2-8.5%) and Oe (5.0-10.6%) (Table 2).

Only the Pr data group met ANOVA premises; the data for other cell types were submitted to a nonparametric procedure - the Kruskal-Wallis test. All means and significant differences are shown in Table 2. Pr proportions decreased gradually through the 4th instar and into the 5th instar but increased in the middle of this instar, between the early and mature stages, and dropped again at the beginning of the 6th instar (ANOVA F_{7,152(2)}=5.89; P<0.0001). Sph constituted the one cell type that did not present significant differences among its proportions (Kruskal-Wallis $-\chi^2 = 4.49$; P = 0.7218). GH 2 were very rare at early stages of larval development (less than 1%), being more easily detected from the 5th instar on, with a maximum frequency of 8.5% at the end of the 5th instar (Kruskal-Wallis $-\chi^2 = 100.52$; P<0.0001). Pl proportions decreased during ecdysis between 4th and 5th instar as well as between the mature 5th instar and the late 5th instar (Kruskal-Wallis $-\chi^2$ = 58.59; P < 0.0001). GH 1 did not present significant differences in their proportions at successive stages but

gradually increased in number toward the 5th instar (Kruskal-Wallis $-\chi^2 = 23.60$; P = 0.0013). Oe rose in their proportions during ecdysis between 3rd and 4th instar, decreased gradually during the first half of the 5th instar and increased again at the end of this instar (Kruskal-Wallis $-\chi^2 = 33.70$; P < 0.0001).

DISCUSSION

The haemolymph of *A. gemmatalis* larvae contains five general cell types commonly described for Lepidopterans: prohaemocytes (Pr), plasmatocytes (Pl), granulocytes or granular haemocytes (GH), oenocytoids (Oe) and spherulocytes (Sph). Consistent with the classification of Brehélin and Zachary (1986), we have found two types of granular haemocytes: 1 and 2. Other lepidopteran species have additional haemocytes types distinguishable by transmission electron microscopy: coagulocytes and adipohemocytes for *Lymantria dispar* (Butt and Shields, 1996), and vermiform cells for *Mythimna unipuncta* (Ribeiro *et al.*, 1996).

Brehélin and Zachary (1986) reported that GH 2 are absent in most of the lepidopterans studied at that time. For *A. gemmatalis* larvae, we initially considered these cells to be adipohaemocytes, a cell type frequently reported for Lepidopterans, but the osmium/imidazole technique revealed that the large and numerous granules that characterized these cells did not contain lipids. Despite this, it was shown that these cells accumulated small lipid droplets in their cytoplasm, a fact already described for granulocytes in general, especially during the last instars of larval development (Beaulaton, 1979; Gupta, 1979; Essawy *et al.*, 1985).

¹³⁶ BRAGA DA SILVEIRA E., MORAIS RIBEIRO B. and BAO S.N.

We believe that this group of characteristics are closer to the GH 2 description of Brehélin and Zachary (1986) than to the description of adipohaemocytes presented by Butt and Shields (1996), but we also recognize the existence of great similarities between these two cell types. For example, in *A. gemmatalis* larvae, GH 2 were rare during early instars, becoming more evident after the inception of the 5th instar. To date, adipohaemocytes have shown similar changes in DHC for *Lymantria dispar* (Butt and Shields, 1996) and *Spodoptera litura* (Saxena *et al.*, 1988).

It is possible that GH 2, as well as adipohaemocytes, differentiate late in larval development from Pr, which have been shown by some authors (reviewed by Gupta, 1979; Yamashita and Iwabuchi, 2001) to be stem cells. Because of morphological similarities, it is also possible that GH 2 differentiate from GH 1, generally named granulocytes by other authors, which were also previously shown to generate other haemocyte types as Pl, Sph and adipohaemocytes (Gupta and Sutherland, 1966; Arnold and Salked, 1967; Yamashita and Iwabuchi, 2001). In the case of A. gemmatalis GH 2, this may happen with the accumulation of dense granules and lipid inclusions during larval development, which can explain their low number at early instars. The lipid accumulation may represent a kind of energy storage for the pupal stage, a function already suggested by Butt and Shields (1996) as related to adipohaemocytes increasing in the last instars of Lymantria dispar.

GH 1, with their three characteristic types of granules, are one of the most conspicuous haemocytes reported in Lepidoptera. We have observed exocytosis of unstructured heterogeneous granules, a phenomenon that has been currently reported in literature. For the granulocytes described by Butt and Shields (1996) (which correspond to our GH 1) the unstructured granules were considered to represent a mature form of structured granules, probably generated by a process of water imbibition and swelling, and eventually followed by exocytosis. This assumption is supported by the diffuse appearance of the contents in unstructured granules, which resemble a more loosely organized version of the highly ordered inclusions found in structured granules. In their studies of Heliothis armigera haemocytes, Essawy et al. (1985) reported that in the last larval instar, GH 1 (known at that time as 'coagulocytes') may have the proportions of their granules changed, culminating with the disappearance of structured granules and an increase in the number and size of heterogeneous unstructured granules. Studies of larval and pupal haemocytes from Mythimna unipuncta (Ribeiro et al., 1996) show this same tendency, with a decline in the number of structured granules for GH 1 of last instars (6th and pupae) and an increase in unstructured granules. In general, these granules have been shown to contain glycoproteins (reviewed by Gupta, 1979).

Controversies exist about the classification proposed by Brehélin and Zachary (1986) concerning the existence of four different granular haemocytes. Gupta (1991) does not recognize the morphological and functional criteria used in their classification as diagnostic. In our work, the morphology was the criterion used to distinguish *A. gemmatalis* haemocytes, and, since we observed significant and unequivocal structural and ultrastructural differences between two cells usually classified in literature as granular haemocytes (Hagopian, 1971; Gupta, 1991), the classification from Brehélin and Zachary (1986) was considered to be an adequate model, despite the possibility that these two cell types represent different developmental phases of a same cell lineage.

In insects, the phenoloxidase is produced as an inactive precursor (prophenoloxidase), found in haemolymph and epidermis, which participates in a cascade of reactions initiated by recognition of foreign molecules or by endogenous activators. Melanin production is important in such phenomena as cuticular pigmentation and sclerotinization, wound repair and encapsulation. Beside these functions, this cascade of events generates toxic intermediates that are effective against microorganisms (for a review, see Ashida and Brey, 1995; Hung and Boucias, 1996; Satoh *et al.*, 1999).

Oe was shown to be the major cell type expressing phenoloxidase activity. With light microscopy, the dark color reaction of these cells in response to L-DOPA could be easily seen. The color reaction was also observed as a slight brown color in the Sph cytoplasm, indicating the occurrence of some phenoloxidase activity (Fig. 7a, b). With electron microscopy, the contrast in electron density was subtler, observed only for Oe in comparison to other cell types (Fig. 7c).

Detection of phenoloxidase activity resulted in positive colorimetric reactions for Oe in other species (Beaulaton, 1979; Horohov and Dunn, 1982; Essawy *et al.*, 1985; Ribeiro *et al.*, 1996). Other cell types in haemolymph were also shown to express this enzyme. Prophenoloxidase immunostaining in *Bombyx mori* (Ashida *et al.*, 1988) revealed its localization in Pl as well as in Oe. Sph of *A. gemmatalis* produce cuticular prophenoloxidase, which can represent similar or even higher quantities than the prophenoloxidase produced by Oe, since Sph are more abundant in larval haemolymph (26.7-34% against 5.5-10.6% for Oe) (Table 2).

The magnitude of THC values obtained for *A. gemmatalis* larvae coincide with the ones observed for different instars in other lepidopteran larvae, such as *Pseudaletia unipuncta* (Witting, 1968), whose THC varied between 5 and 30×10^3 haemocytes/µl; *Mamestra brassicae* (Pelc, 1986), 19-22 × 10³ haemocytes/µl; *Pseudoplusia includens* (Strand and Noda, 1991), 10-19 × 10³ haemocytes/µl; *Manduca sexta* (Horohov and Dunn, 1982), 3.6×10^3 haemocytes/µl.

In his review, Arnold (1974) cited evidences of correlation between THC variation and ecdysis, but our observations

Larval haemocytes from Anticarsia gemmatalis 137

did not reveal a clear relationship between these two parameters. The THC for the 4th instar mature was significantly lower (12.3×10^3 cells/µl) than the THC for other larval stages of other instars (3rd instar late, 5th instar early, 5th instar late and 6th instar early), except for 5th instar mature (Fig. 8). This observation suggests the occurrence of lower THC for middle-instar larvae.

The DHC during the larval phase for many lepidopteran species has revealed, as for *A. gemmatalis*, that Pl, GH 1 and Sph are the most frequently encountered cells (Horohov and Dunn, 1982; Pelc, 1986; Davies *et al.*, 1987; Saxena *et al.*, 1988; Ribeiro *et al.*, 1996; Stettler *et al.*, 1998). This phenomenon has been explained for Pl and GH 1 by their great demanding functions of phagocytosis and encapsulation, among other functions (Yokoo *et al.*, 1995; Butt and Shields, 1996; Pech and Strand, 1996; Tojo *et al.*, 2000). For Sph, possible functions like silk production, melanization, phagocytosis, secretion of haemolymph proteins, regulation of clotting, control of cell adhesion and migration and basement membrane permeability (for review see Gupta, 1991) can justify their high frequencies in haemolymph.

GH 1 proportions were shown to be significantly different among some instars; but these differences were gradual, without a clear tendency to increase or decrease during a specific phase of the larval development. Pr populations were shown, in general, to decrease during the larval development, a phenomenon that can be related to their differentiation into other cell types. Pl populations were also shown to decrease during the last instars, with higher values for 3rd and 4th instars and lower values for 5th and 6th instars, a population trend already described for Pl in Spodoptera litura (Saxena et al., 1988). Oe populations were shown to rise at the beginning of the 4th instar and at the end of the 5th instar. For Lymantria dispar larvae (Butt and Shields, 1996), it was shown that Oe populations increase exactly at the end of 3rd and 4th instars. The authors suggested that the higher numbers of Oe during ecdysis could be important in cuticle melanization.

A general understanding of the cellular components of haemolymph is essential as a base for studies on the insect immune response to microorganisms. For our purposes, this understanding will be especially helpful in further investigations of the patterns of baculovirus infection and the defense barriers they encounter in *A. gemmatalis* larvae.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr. M.E.B. Castro (Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia) and Dr. D. Sosa-Gomez (Embrapa-Soja) for supplying *Anticarsia germatalis* eggs and larvae. We thank Dr. R.B. Azevedo and L.P. de Souza (Universidade de Brasília) for providing equipment for measurement of haemocyte dimensions as well as G.C. Vieira (Universidade de Brasília) for his assistance on statistical analysis. We would also like to thank Dr. R.J. Clem (Kansas State University) for the revision of the manuscript. This work was supported by CAPES, CNPq, FAP/DF and PRONEX.

138 BRAGA DA SILVEIRA E., MORAIS RIBEIRO B. and BAO S.N.

REFERENCES

- ANGERMÜLLER S. and FAHIMI D.H., 1982. Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. *Histochem. J.*, 14, 823-825.
- ARNOLD J.W., 1974. The hemocytes of insects. In: 'The Physiology of Insecta'. Rockstein M. ed., Academic Press, New York, vol. 2, pp. 201-254.
- ARNOLD J.W. and SALKED E.H., 1967. Morphology of the haemocytes of the giant cockroach, *Blaberus giganteus*, with histochemical tests. *Canad. Entomol.*, 99, 1138-1145.
- ASHIDA M. and BREY P.T., 1995. Role of the integument in insect defense: Pro-phenol oxidase cascade in the cuticular matrix. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 10698-10702.
- ASHIDA M., OCHIAI M. and NIKI T., 1988. Immunolocalization of prophenoloxidase among hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori. Tissue Cell*, 20, 599-610.
- BEAULATON J., 1979. Hemocytes and hemocytopoiesis in silkworms. Biochimie, 61, 157-164.
- BREHÉLIN M. and ZACHARY D., 1986. Insect haemocytes: a new classification to rule out the controversy. In: 'Immunity in Invertebrates: Cells, Molecules and Defense Reactions'. Brehélin M. ed., Springer-Verlag, Berlin, pp. 36-48.
- BUTT T.M. and SHIELDS K.S., 1996. The structure and behaviour of Gypsy Moth (Lymantria dispar) hemocytes. J. Invert. Pathol., 68, 1-14.
- DAVIES D.H., STRAND M.R. and VINSON S.B., 1987. Changes in differential haemocyte count and *in vitro* behavior of plasmatocytes from host *Heliotis virescens* caused by *Campoletis sonorensis* polydnavirus. *J. Insect Physiol.*, 33, 1003-1010.
- ESSAWY M., MALEVILLE A. and BREHELIN M., 1985. The hemocytes of *Heliothis armigera*: ultrastructure, functions, and evolution in the course of larval development. J. Morphol., 186, 255-264.
- GARDINER E.M.M. and STRAND M., 1999. Monoclonal antibodies bind distinct classes of hemocytes in the moth *Pseudoplusia includens. J. Insect Physiol.*, 45, 113-126.
- GREGOIRE C., 1974. Hemolymph coagulation. In: 'The Physiology of Insecta'. Rockstein M. ed., Academic Press, New York, vol. 2, pp. 309-360.
- GUPTA A.P., 1979. Hemocyte types: their structure, synonymies, interrelationships, and taxonomic significance. In: 'Insect Hemocytes, Development, Forms, Functions, and Techniques'. Gupta A.P. ed., Cambridge University Press, Cambridge, pp. 85-127.
- GUPTA A.P., 1991. Insect immunocytes and other hemocytes: roles in cellular and humoral immunity. In: 'Immunology of Insects and Other Arthropods'. Gupta A.P. ed., CRC Press, Boca Raton, pp. 19-118.
- GUPTA A.P. and SUTHERLAND D.J., 1966. In vitro transformations of the insect plasmatocyte in certain insects. J. Insect Physiol., 12, 1369-1375.
- HAGOPIAN M., 1971. Unique structures in the insect granular haemocytes. J. Ultrastruct. Res., 36, 646-658.
- HOROHOV D.W. and DUNN P.E., 1982. Changes in the circulating hemocyte population of *Manduca sexta* larvae following injection of bacteria. J. Invertebr. Pathol., 40, 327-339.
- HUNG S.Y. and BOUCIAS D.G., 1996. Phenoloxidase activity in hemolymph of naive and *Beauveria bassiana*-infected Spodoptera exigua larvae. J. Invertebr. Pathol., 67, 35-40.
- MEAD G.P., RATCLIFFE N.A. and RENWRANTZ L.R., 1986. The separation of insect hemocyte types on Percoll gradients; methodology and problems. J. Insect Physiol., 32, 167-177.
- MOSCARDI F., 1998. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. In: 'Controle Microbiano de Insetos'. Alves S.B. ed., FEALQ, Piracicaba, pp. 509-540.
- PECH L.L., STRAND M.R., 1996. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. J. Cell Sci., 109, 2053-2060.
- PELC R., 1986. The haemocytes and their classification in the larvae and pupae of *Mamestra brassicae* (L.) 1758 (Lepidoptera; Noctuidae). *Can. J. Zool.*, 64, 2503-2508.
- RIBEIRO C., SIMÓES N. and BREHÉLIN M., 1996. Insect immunity: the haemocytes of the armyworm *Mythimna unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) and their role in defence reactions. *In vivo* and *in vitro* studies. *J. Insect Physiol.*, 42, 815-822.

- RIBEIRO B.M., SOUZA M.L. and KITAJIMA E.W., 1998. Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus de insetos. In: 'Controle Microbiano de Insetos'. Alves S.B. ed., FEALQ, Piracicaba, pp. 481-507.
- SAXENA B.P., SHARMA P.R. and TIKKU K., 1988. Scanning electron microscopical studies of the haemocytes of *Spodoptera litura* Fabr. *Cytologia*, 53, 385-391.
- SATOH D., HORII A., OCHIAI M. and ASHIDA M., 1999. Prophenoloxidaseactivating enzyme of the Silkworm, *Bombyx mori. J. Biol. Chem.*, 274, 7441-7453.
- STETTLER P, TRENCZEK T., WYLERT., PFISTER-WILHELM R. and LANZREIN B., 1998. Overview of parasitism associated effects on host haemocytes in larval parasitoids and comparison with effects of the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* on its host *Spodoptera littoralis. J. Insect Physiol.*, 44, 817-831.
- STRAND M.R. and NODA T., 1991. Alterations in the haemocytes of *Pseudoplusia includens* after parasitism by *Microplitis demolitor*. J. Insect Physiol., 37, 839-850.
- TOJO S., NAGANUMA F., ARAKAWA K. and YOKOO S., 2000. Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. J. Insect Physiol., 46, 1129-1135.
- TRUDEAU D., WASHBURN J. and VOLKMAN L.E., 2001. Central role of haemocytes in Autographa californica M nucleopolyhedrosis pathogenesis in Heliothis virescens and Helicoverpa zea. J. Virol., 75, 996-1003.

- WASHBURN J.O., KIRKPATRICK B.A. and VOLKMAN L.E., 1996. Insect protection against viruses. *Nature*, 383, 767.
- WASHBURN J.O., HAAS-STAPLETON E.J., TAN F.F., BECKAGE N.E. and VOLKMAN L.E., 2000. Co-infection of *Manduca sexta* larvae with polydnavirus from *Cotessia congregata* increases susceptibility to fatal infection by *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus. *J. Insect Physiol.*, 46, 179-190.
- WHITCOMB R.F., SHAPIRO M. and GRANADOS R.R., 1974. Insect defense mechanisms against microorganisms and parasitoids. In: 'The Physiology of Insecta'. Rockstein M. ed., Academic Press, New York, vol. 2, pp. 447-536.
- WITTING G., 1968. Phagocytosis by blood cells in healthy and diseased caterpillars III. Some observations concerning virus inclusions bodies. J. Invertebr. Pathol., 10, 211-229.
- YAMASHITA M. and IWABUCHI K., 2001. Bombyx mori prohemocyte division and differentiation in individual microcultures. J. Insect Physiol., 47, 325-331.
- YOKOO S., GOTZ P. and TOJO S., 1995. Phagocytic activities of haemocytes separated by two simple methods from larvae of two lepidopteran species, *Agrotis segetum* and *Galleria mellonella*. *Appl. Entomol. Zool.*, 30, 343-350.
- ZAR J.H., 1999. 'Biostatistical Analysis'. Prentice Hall, New Jersey, 4th ed.

Larval haemocytes from Anticarsia gemmatalis 139

2.2. MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF Anticarsia gemmatalis M nucleopolyhedrovirus INFECTION IN HAEMOCYTES FROM ITS NATURAL LARVAL HOST, THE VELVETBEAN CATERPILLAR Anticarsia gemmatalis (HÜBNER) (LEPIDOPTERA:NOCTUIDAE)

Eni Braga da Silveira, Bruno Arrivabene Cordeiro, Bergmann Morais Ribeiro, Sônia

Nair Báo

Tissue & Cell 36 (2004) 171-180



Tissue & Cell 36 (2004) 171-180

Tissue&Cell

www.elsevier.com/locate/tice

Morphological characterization of Anticarsia gemmatalis M nucleopolyhedrovirus infection in haemocytes from its natural larval host, the velvet bean caterpillar Anticarsia gemmatalis (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)

E.B. Silveira^{a,b}, B.A. Cordeiro^b, B.M. Ribeiro^b, S.N. Báo^{b,*}

^a Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6109, Campinas, SP 13.083-970, Brazil ^b Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasilia, Brasilia, DF 70919-970, Brazil Received 28 August 2003; received in revised form 8 January 2004; accepted 9 January 2004

Abstract

For a better understanding of virus × host interactions, transmission electron microscopy was used to characterize the intrahaemocoelic infection of Anticarsia gemmatalis larval haemocytes by A. gemmatalis M nucleopolyhedrovirus (AgMNPV). At 12 h post-infection (h p.i.), we observed nuclear hypertrophy, budded virus assembling, and protrusion towards the cytoplasm, virion envelopment, and accumulation of fibrillar aggregates in the cytoplasm. Around 24 h p.i., fibrillar aggregates also appeared inside nuclei of infected cells. By 48 h p.i., virogenic stroma and polyhedra were visualised in nuclei and at 72 h p.i., widespread infection in haemocytes was observed. Cell remnants and free polyhedra were phagocytosed by granular haemocyte 1 and plasmatocytes. Entire cells were phagocytosed only by plasmatocytes. Necrosis of infected cells was quite common, suggesting a putative cytotoxic response. Granular haemocyte 1 presented a more exuberant protrusion of budded viruses in comparison to other haemocytes. All types of haemocytes were shown to be infected, and the intense virus replication in some of these cells reveals the importance of haemolymph for AgMNPV spread in its natural host, a critical factor for permissiveness. © 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Anticarsia gemmatalis; AgMNPV; Baculovirus; Haemocytes; Lepidoptera; Ultrastructure

1. Introduction

The baculovirus Anticarsia gemmatalis M nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) has been used during the last 23 years in Brazil to control the velvet bean caterpillar A. gemmatalis (Hübner), representing important reduction in production costs and environmental damages caused by chemical pesticides in soybean (Glycine max) crops (Ribeiro et al., 1998; Moscardi, 1999). Efforts have been made to explore AgMNPV molecular biology and host interaction with the attempt to enhance the economical and scientific application of this virus (Pombo et al., 1998; Matos et al., 1999; Silveira et al., 1999; Castro and Ribeiro, 2001; Ribeiro et al., 2001; Rodrigues et al., 2001; Razuck et al., 2002; Pinedo et al., 2003).

*Corresponding author. Tel.: +51-21-61-307-2424; fax: +51-21-61-347-6533.

AgMNPV is a rod-shaped, enveloped virus with circular, double-stranded, 133-kbp DNA genome, pathogenic to lepidopterans (Johnson and Maruniak, 1989; Grasela and McIntosh, 1998). Like other baculoviruses from the Nucleopolyhedrovirus genus, it presents two phenotypes: budded viruses (BVs), which establish systemic infection; and occlusion-derived viruses (ODVs), immersed in a proteinaceous matrix, constituting occlusion bodies (OBs) or polyhedra. OBs are stable in environment and are responsible for the spread of insect-to-insect infection (Volkman and Keddie, 1990).

Infected cells show a typical cytopathology related to viral morphogenesis, generally characterized by changes in cell shape and size, nuclear hypertrophy and chromatin reorganisation, virions assembly and envelopment at the nucleus, virogenic stroma development, accumulation of fibrillar aggregates and polyhedra assembly at the nucleus (reviewed by Williams and Faulkner, 1997).

The haemocytes of insects comprise a complex of cell types that circulates in haemolymph being involved in

E-mail address: snbao@unb.br (S.N. Báo).

^{0040-8166/\$ -} see front matter © 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.tice.2004.01.002

defence responses as wound repair, phagocytosis, nodulation, encapsulation, coagulation, synthesis and secretion of immunologic factors (reviewed by Lavine and Strand, 2002).

Haemolymph has been shown to contribute to baculovirus dissemination in permissive hosts (Granados and Lawler, 1981; Washburn et al., 1995; Barrett et al., 1998). However, haemocyte resistance, apoptosis or an effective cellular immune response against infection may restrict the replication of NPVs in specific virus-host combinations (Washburn et al., 1996, 2000; Trudeau et al., 2001; Clark and Clem, 2002, 2003a; Zhang et al., 2002).

Despite the crucial importance of haemocytes for the progression of baculovirus infection, detailed information about interactions among these viruses and the different types of haemocytes remains scarce. In this study, we identified the *A. gemmatalis* haemocyte types that are susceptible to AgMNPV, described the morphological alterations, viral morphogenesis events, and putative immune responses generated during infection by using transmission electron microscopy.

2. Materials and methods

2.1. Insects and viruses

Anticarsia gemmatalis larvae were provided by Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia and Embrapa-Soja and reared on artificial diet at room temperature (25 °C). The molts were monitored, and 4th instar larvae (between 0 and 24h after molt) were used. AgMNPV isolate 2D (Sieburth and Maruniak, 1988) was propagated in BTI-Tn-5B1-4 (Tn-5B) cells (Granados et al., 1994) and maintained in TC-100 medium (GIBCO-BRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum at 27 °C. The inoculum was titered by the TCID₅₀ method, following the protocol described by O'Reilly et al. (1992).

2.2. Inoculation and haemolymph extraction

Approximately $10-20 \,\mu$ l of viral inoculum ($10^8 \,\text{pfu/ml}$) were injected in each larva directly to the haemocoel, by using an insulin microsyringe. Controls were obtained by the inoculation of an equal volume of TC-100 medium. After 12, 24, 48 and 72 h of inoculation, the haemolymph was collected from a punctured proleg.

2.3. Transmission electron microscopy

For transmission electron microscopy (TEM), the haemolymph was fixed for 30 min (2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.4, with 5% sucrose). After fixation, it was centrifuged at 750 \times g for 5 min, the pellet was washed in the same buffer, post-fixed (1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferricyanide in the same buffer), contrasted in block with 0.5% uranyl acetate, dehydrated in acetone and embedded in Spurr's resin. The ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate/lead citrate and observed in a TEM JEOL 100C and JEOL 1011 at 80 kV.

2.4. Haemocytes identification

Larval A. gemmatalis haemocytes types were identified by structural and ultrastructural characteristics described previously (Silveira et al., 2003).

3. Results

3.1. Insect behaviour after intrahaemocoelic injection

The group of larvae injected with viral inoculum presented typical characteristics of baculovirus infection. Their feeding was diminished, their movements were reduced and the molt to 5th instar was not completed. Their colour became whitish around 48 h p.i. and they started to die around 96 h p.i. The control group continued feeding, and moving normally, completing the molt to 5th instar around 48 h p.i., with some of them molting to 6th instar at 72 h p.i.

3.2. Transmission electron microscopy

Six haemocytes types were recognised in *A gemmatalis* larvae based on structural and ultrastructural characteristics, as described previously (Silveira et al., 2003). They were prohaemocytes (pr), plasmatocytes (pl), granular haemocytes type 1 (gh1), granular haemocytes type 2 (gh2), oenocytoids (oe) and spherulocytes (sph).

Prohaemocytes (pr) are the smallest cells, generally spherical, with a smooth surface and a high ratio nucleus/ cytoplasm. Plasmatocytes (pl) can be fusiform, round or oval. Their surfaces present many membrane projections and peripheral vacuoles. The nucleus is often bilobate; the cytoplasm is dense, with many mitochondria, free ribosomes, rough endoplasmic reticulum and Golgi complexes. Granular haemocytes type 1 (gh1) are spherical and characterised by three types of granules: structured granules, containing material arranged in a highly ordered lattice; unstructured granules, containing flocculent material; and dense granules, presenting a homogeneous and moderately electron-dense content. The rough endoplasmic reticulum is well developed, with dilated cisternae. Granular haemocytes type 2 (gh2) can be spherical or somewhat elongated with large and numerous dense granules. Oenocytoids (oe) are typically round, with a small and eccentric nucleus, and the cytoplasm is characteristically homogeneous, poor in membranous organelles and rich in free ribosomes. Mitochondria are concentrated in the cellular periphery. Spherulocytes (sph) are characterised by large vesicles (spherules) that occupy almost the entire cytoplasm, and contain a granular and symmetrical material that can be arranged in concentric layers.



Fig. 1. Transmission electron micrographs of Anticarsia gemmatalis haemocytes 12 h p.i. with AgMNPV. (A) Genocytoid presenting a hypertrophied nucleus (n) with early signs of infection as virions assembly (arrow), electron-dense accumulations (arrowheads) and peripheral heterochromatin (*); g, Golgi, Bar 1 μ m. (B) Spherulocyte presenting virions envelopment (arrow). Arrowhead, electron-dense accumulations; g, Golgi, n, nucleus; nu, nucleolus; s, spherule. Bar 0.5 μ m. (C) High-magnified detail from the previous picture, where virion envelopment (arrow), virion budding (arrowhead) from the nucleus (n) to the cytoplasm (c), fibrillar aggregate (+) and nuclear membranous vesicles (v) can be better noted. Bar 0.1 μ m. (D) Putative prohaemocyte or plasmatocyte presenting virion budding towards the exterior media (arrowhead) and an endomembrane network (e) besides viral envelopment (arrow) and fibrillar aggregate (+); m, mitochondria; n, nucleus. Bar 0.5 μ m. (E) Plasmatocyte showing a more extensive fibrillar aggregate (+); g, Golgi; m, mitochondria. Bar 0.25 μ m.

All types of haemocytes were shown to be susceptible to AgMNPV intrahaemocoelic infection. Despite the severe morphological alterations induced by viral infection, some cells still exhibited characteristic ultrastructure, which made cell identification possible.

At 12 h p.i., there were distinct nuclear alterations, as hypertrophy, a slight folding of the nuclear envelope, heterochromatin dislocation to the nuclear periphery, accumulation of electron-dense material, and virion assembly (Fig. 1A–D). Some virions were seen protruding towards the cytoplasm, covered by a portion of the nuclear envelope, and also, budding to the exterior, covered by the plasma membrane (Fig. 1B–D). Besides virion assembly, we also visualized virion envelopment (Fig. 1B–D). Fibrillar aggregates, probably of the viral P10 protein, and networks of endomembranes were observed in the cytoplasm (Fig. 1D and E).

At 24 h p.i., multiple envelopment of virions as well as virions budding to the cytoplasm increased (Fig. 2A and B). The fibrillar aggregates became larger, with nuclear occurrence (not shown), in addition to cytoplasmic accumulation (Fig. 2B). At this time of infection, many gh1 presented a variable number of putative phagosomes and phagolysosomes, which were filled with numerous membranous profiles, intact ribosomes and partially digested material with a flocculent aspect (Fig. 2C). At 48 h p.i., mature virogenic stroma was observed (Fig. 3A and D) and the assembly of polyhedra in cell nuclei became more frequent (Fig. 3C). Plasmatocytes (pl) as well as gh1 presented a great number of putative phagosomes and phagolysosomes. Besides cell remnants, as observed at 24 h p.i., these organelles contained also viral particles and free polyhedra (Figs. 3A, B and 4B). Necrosis of some infected cells, specially the ones containing a mature virogenic stroma, was common. Necrosis was characterized by expansion and rupture of mitochondria, and loss of nuclear and cytoplasmic contents, which gives a general electron lucent aspect for the cell (Fig. 3D).

At late times post-infection, a peculiar characteristic of gh1 was observed. Great numbers of viral particles at the periphery of the cytoplasm or in numerous cytoplasmic projections—filopodia were observed (Fig. 4A). This was observed in infected cells (Fig. 6A), as well as in those with an apparently non-infected nucleus, but containing in their cytoplasm phagocytosed polyhedra and putative phagolysosomes, which were filled with flocculent, electron-dense material and some intact enveloped virions (Fig. 4B).

At 72 h p.i., there was abundance of infected haemocytes, which presented early and late symptoms of infection, and most cells presented polyhedra in their nuclei and larger



Fig. 2. Transmission electron micrographs of Anticarsia gemmatalis haemocytes 24 h p.i. with AgMNPV. (A) Putative prohaemocyte or plasmatocyte presenting early signs of infection. Arrowheads, virion envelopment; m, mitochondria; n, nucleus. (B) Putative prohaemocyte or plasmatocyte with an intense viral budding trough extensive folds of the nuclear envelope (arrowheads). Arrow, virion envelopment; fibrillar aggregate (*); n, nucleus. (C) Granular haemocyte 1 cytoplasm containing phagosomes filled with cell remnants (p); g, Golgi; m, mitochondria; r, rough endoplasmic reticulum; s, structured granule. Bars 0.5 µm.

174



Fig. 3. Transmission electron micrographs of Anticarsia gemmatalis haemocytes 48 h p.i. with AgMNPV. (A) Infected plasmatocyte presenting a phagosome filled with cell remnants (p) and phagosomes containing polyhedra (po) in its cytoplasm, and a well-developed virogenic stroma (v). Arrowheads, virions envelopment; g, Golgi, m, mitochondria; r, rough endoplasmic reticulum. Bar 1 μ m. (B) High-magnified detail from the previous picture showing a phagosome (arrow) containing infected cell remnants presenting enveloped viral particles (arrowhead). Bar 0.25 μ m. (C) Putative prohaemocyte or plasmatocyte presenting polyhedra (p) into the nucleus (n) and viral budding at the plasma membrane (arrowhead). Fibrillar aggregate (*); m, mitochondria. Bar 0.5 μ m. (D) Not identified haemocyte in necrosis presenting a mature virogenic stroma (v) into the nucleus (n) and vacuolated mitochondria (m); p; plasmatocyte. Bar 2 μ m.

fibrillar aggregates (Fig. 5A and B). At that time of infection, it was possible to observe numerous free BVs in the extracellular space (Fig. 5C).

Infected gh2 were observed at low frequency as compared to the other cell types, even at late times post-infection (Fig. 5D). Infected pr were not readily identifiable because of size alterations, which made these cells easily misinterpreted as pl.

Plasmatocytes (pl) were shown to be able to adjust their size and shape and phagocytose entire cells. Phagocytosed cells could present or not clear signs of infection (Fig. 6A and B).

4. Discussion

In this study, we demonstrated that *A. gemmatalis* larval haemocytes are susceptible to intrahaemocoelic infection by AgMNPV, leading to disease development and death of larvae around 96 h p.i. We have found that AgMNPV replicates in all of *A. gemmatalis* haemocytes types, which presented virions assembling, BVs cytoplasmic transport, budding, virogenic stroma, virions envelopment, fibrillar aggregates accumulation, and OBs assembling. This observation means that once the virus reaches haemolymph, it encounters an efficient media for replication and infection spread.

E.B. Silveira et al./Tissue & Cell 36 (2004) 171–180



Fig. 4. Transmission electron micrographs of Anticarsia gemmatalis granular haemocyte 1 48 h p.i. with AgMNPV. (A) Extensive surface projections containing viral particles (arrows); g, Golgi; m, mitochondria; n, nucleus; r, rough endoplasmic reticulum. Bar 0.5 µm. Inset high-magnified detail of surface projections. Bar 0.25 µm. (B) Apparently non-infected cell showing numerous virions in its cytoplasm and surface projections (arrowheads). A phagosome containing a polyhedra (po) is in close contact with a phagolysosome (ph); n, nucleus; m, mitochondria; r, rough endoplasmic reticulum. Bar 1 µm. Inset high-magnified detail of the fusion between the phagosome (po) and the phagolysosome (ph), which presents digestion remnants and apparently intact enveloped virions (arrowheads). Bar 0.25 µm.

For some lepidopteran larvae, haemocytes were shown to be resistant to AcMNPV infection. It is one factor that restricts AcMNPV infectivity in Spodoptera frugiperda (Clark and Clem, 2002), and makes *Helicoverpa zea* and *Manduca* sexta semi-permissives for the same virus (Washburn et al., 1996, 2000; Trudeau et al., 2001).

The sequence of cytopathological effects and viral morphogenesis events described here are in agreement with previous reports on *A. gemmatalis* culture cells infected with *AgMNPV BVs* (Pombo et al., 1998); *A. gemmatalis* and *Trichoplusia ni* culture cells infected with the *AgMNPV* mutant vApAg (Silveira et al., 1999) and midgut, tracheoblasts and haemocytes of *A. gemmatalis* larvae orally infected with *AgMNPV OBs* (Matos et al., 1999).

An important difference is that symptoms appear earlier through intrahaemocoelic infection than oral infection. This is probably due to bypassing natural barriers and defences, such as midgut digestive juices, peritrophic membrane (Granados, 1980) and midgut cell sloughing (Hoover et al., 2000), are surpassed. In addition, a great number of free BVs (approximately 10⁶ pfu) were promptly disposable for haemocytes infection.

Kislev et al. (1969) showed NPV replication events in haemocytes from *Spodoptera litorallis* after oral infection, intrahaemocoelic injection of polyhedra and of free ODVs. For the three modes of infection, pl were shown to be the major cell type for NPV replication. Cells classified as adipohaemocytes at that time, which presented clear characteristics of sph, did not become infected in these experiments. Phagocytosis of free-virus particles and polyhedra were also described mainly for pl.

AgMNPV infection generated clear phagocytic responses by pl and gh1. Both haemocytes types phagocytosed free virions, polyhedra and cell remnants. Unlike gh1, pl were able to phagocytose entire cells. This capability is compatible with larger pl dimensions, form variation and exuberant cytoplasmic extension when in contact with a surface.

Plasmatocytes (pl) and granular haemocytes type 1 (gh1) are reported as the only Lepidoptera larval haemocytes capable of adhering to foreign surfaces, being important for phagocytosis, nodulation and encapsulation (reviewed by Lavine and Strand, 2002). Together, pl and gh1 constitute around 60% of *A. gemmatalis* larval haemocytes (Silveira et al., 2003), with similar occurrence being encountered in other lepidopterans (Ribeiro et al., 1996; Stettler et al., 1998), which indicates a great demand for the functions of these two cell types.

Together, phagocytosis and necrosis of infected haemocytes are clues for a putative recognition of these virusinfected cells as altered self, and the triggering of cytotoxic



Fig. 5. Transmission electron micrographs of Anticarsia gemmatalis haemocytes 72 h p.i. with AgMNPV. (A) Plasmatocyte showing late infection events as mature virogenic stroma (v), polyhedra (p) and extensive fibrillar aggregates (a). Arrowheads, virions envelopment. Bar 1 µm. (B) Not identified haemocyte presenting polyhedra (p) assembling, where multiple enveloped virions (arrowheads) are involved by polyhedrin; e, endomembranes network; m, mitochondria; fibrillar aggregate (a). Bar 0.5 µm. (C) Free budded viruses (arrows) close to a spherulocyte (s). Bar 0.5 µm. (D) Infected granular haemocyte 2 presenting packed virions (arrows), dense aggregates (arrowheads), and membranous vesicles (v); d, dense granules. Bar 0.5 µm.

E.B. Silveira et al./Tissue & Cell 36 (2004) 171-180



Fig. 6. Transmission electron micrographs of Anticarsia gemmatalis phagocytic plasmatocytes 72 h p.i. with AgMNPV. (A) Infected granular haemocyte 1 engulfed by a plasmatocyte. Arrow, virions aligned at the gh1 surface; gn, gh1 nucleus; pn; pl nucleus. Bar 1 μ m. (B) Apparently, non-infected granular haemocyte 2 engulfed by a plasmatocyte. Arrow, infected cell; arrowheads, free budded viruses; gn, gh2 nucleus; d, dense granules; pn, pl nucleus. Bar 0.5 μ m.

responses against them. Alternatively, necrosis might simply mean that virus is killing the cell. However, for cultivated cells infected with AgMNPV, membrane rupture and necrosis are generally observed only when the cells are full of polyhedra and fibrillar aggregates, and not before the total completion of the viral cycle, as frequently observed in this study.

The cytokine-like factor alloferon, described for the diperan *Calliphora vicina*, was shown to stimulate NK lymphocytes activity in vitro and to induce IFN production in mice, having antiviral and antitumoural capabilities (Chernysh et al., 2002). This report, together with our finding of a putative early death of baculovirus-infected haemocytes, suggest the possibility of a cytotoxic response against virus-infected cells in insects, in some way similar to the one triggered by T lymphocytes in mammals.

Until now, apoptosis is the best described antiviral response in insects (Clark and Clem, 2003b). Apoptosis reduces baculovirus replication in vitro, and AcMNPV mutants lacking the antiapoptotic gene p35 have reduced infectivity in *S. frugiperda* larvae if compared to the wild type virus (revised by Clem, 2001). More recently, apoptosis in vivo induced by baculovirus infection was demonstrated. Apoptosis was shown to be correlated with reduced viral propagation of AcMNPV in a non susceptible host (Zhang et al., 2002) and with the reduced infectivity of an AcMNPV mutant lacking the antiapoptotic gene p35 in S. frugiperda (Clark and Clem, 2003a).

Cellular immune responses described against baculoviruses comprises virus uptake in haemolymph, encapsulation and melanization of tracheal infection foci. It was demonstrated to be important for the circumvention of AcMNPV infection in *H. zea* and *M. sexta*, an organismlevel strategy of resistance (Washburn et al., 1996, 2000; Trudeau et al., 2001).

Granular haemocytes type 1 (gh1) were shown to present numerous viral particles at their periphery, sometimes at long cytoplasmic projections, in such a way never described for any insect cell, in vivo or in culture. It is probable that AgMNPV finds in this cell type efficient machinery for replication and an important source of BVs for systemic infection.

The intense BVs protrusion was also observed in gh1 without visible signs of virus replication. But these cells had phagocytosed free polyhedra. We showed that probably phagocytosed polyhedra were dissolved into phagolysosomes, but some apparently intact virus particles remained. It is possible that ODVs resist to lysosomal digestion and escape from this organelle, probably utilizing membrane fusion. These free particles could be directed to the nucleus for virus replication or to the plasma membrane for budding. In this special case, at late times post-infection, ODVs could reinforce systemic spread of infection by infecting phagocytes. Further experiments are necessary to confirm putative ODVs lysosomal evasion, nuclear or surface directing and capability of haemocytes infection.

Different from gh1, infected gh2 were scarcely found. Their low frequency (5–8% of the haemocytes during 4th instar) (Silveira et al., 2003) could be a reasonable explanation, but we observed that even in late times post-infection, these cells were easily encountered and the majority did not show any signs of infection. It might mean that gh2 constitute an haemocyte type less susceptible to AgMNPV infection. This visible difference of susceptibility, added to the fact that gh2 did not present phagocytic behaviour, reinforce the separation of different types of granulocytes (Brehélin and Zachary, 1986), which has been questioned in literature (Gupta, 1991).

Despite the occurrence of phagocytosis and putative cytotoxic destruction of infected cells, our results show that, once AgMNPV BVs gain access to the haemolymph of A. gemmatalis larvae, it encounters an effective media for virus replication and systemic infection spread, maybe one of the factors that make this insect fully permissive to AgMNPV. This is a valuable finding since infection spread and death of larvae can also be achieved by intrahaemocoelic infection of baculovirus with minor involvement of haemocytes, as observed for the system AcMNPV \times S. frugiperda (Clark and Clem, 2002). Additional studies should be of interest to evaluate the relative importance of haemolymph for spread of AgMNPV infection, haemocytes behaviour and its interactions with the virus, using the natural route of infection, feeding the larvae on occlusion bodies.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. M.E.B. Castro (Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia) and Dr. F. Moscardi (Embrapa-Soja) for supplying *Anticarsia gemmatalis* eggs and larvae. We also thank R. Machado for grammatical revision of the manuscript and the two anonymous referees for the comments and suggestions, that were crucial for the text improvement. This work was supported by CAPES, CNPq, FAP/DF, FINATEC and PRONEX.

References

- Barrett, J.W., Brownwright, A.J., Primavera, M.J., Retnakaran, A., Palli, S.R., 1998. Concomitant primary infection of the midgut epithelial cells and the hemocytes of *Trichoplusia ni* by Autographa californica nucleopolyhedrovirus. Tissue Cell 30, 602–616.
- Brehélin, M., Zachary, D., 1986. Insect haemocytes: a new classification to rule out the controversy. In: Brehélin, M. (Ed.), Immunity in Invertebrates: Cells, Molecules and Defense Reactions. Springer-Verlag, Berlin, pp. 36–48.

- Castro, M.E.B., Ribeiro, B.M., 2001. Production of viral progeny in insect cells undergoing apoptosis induced by a mutant *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. Microbiol. Res. 156, 369-376.
- Chernysh, S., Kim, S.I., Bekker, G., Pleskach, V.A., Filatova, N.A., Anikin, V.B., Platonov, V.G., Bulet, P., 2002. Antiviral and antitumor peptides from insects. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 12628–12632.
- Clark, T.E., Clem, R.J., 2002. Lack of involvement of haemocytes in the establishment and spread of infection in *Spodoptera frugiperda* larvae infected with the baculovirus *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus by intrahaemocolic injection. J. Gen. Virol. 83, 1565–1572.
- Clark, T.E., Clem, R.J., 2003a. In vivo induction of apoptosis correlating with reduced infectivity during baculovirus infection. J. Virol. 77, 2227–2232.
- Clark, T.E., Clem, R.J., 2003b. Insect defenses against virus infection: the role of apoptosis. Int. Rev. Immunol. 22, 401-424.
- Clem, R.J., 2001. Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad and the ugly. Cell Death Differ. 8, 137–143.
- Granados, R.R., 1980. Infectivity and mode of action of baculoviruses. Biotechnol. Bioeng. 22, 1377-1405.
- Granados, R.R., Lawler, K.A., 1981. In vivo pathway of Autographa californica baculovirus invasion and infection. Virology 108, 297–308.
- Granados, R.R., Guoxun, L., Dersksen, A.C.G., McKema, K.A., 1994. A new insect cell line from *Trichophusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichophusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. J. Invert. Pathol. 64, 260-266.
- Grasela, J.J., McIntosh, A.H., 1998. In vitro and in vivo host range of Anticarsia gemmatalis multiple nuclear polyhedrosis virus. In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 34, 79-83.
- Gupta, A.P., 1991. Insect immunocytes and other hemocytes: roles in cellular and humoral immunity. In: Gupta, A.P. (Ed.), Immunology of Insects and Other Arthropods. CRC Press, Boca Raton, pp. 19–118.
- Hoover, K., Washburn, J.O., Volkman, L.E., 2000. Midgut-based resistance of *Heliothis virescens* to baculovirus infection mediated by phytochemicals in cotton. J. Insect Physiol. 46, 999–1007.
- Johnson, D.W., Maruniak, J.E., 1989. Physical map of Anticarsia gemmatalis nuclear polyhedrosis virus (AgMNPV-2) DNA. J. Gen. Virol. 70, 1877-1883.
- Kislev, N., Harpaz, I., Zelcer, A., 1969. Electron-microscopic studies on haemceytes of the Egyptian contronworm, *Spodoptera litorallis* (Boisduval) infected with a nuclear-polyhedrosis virus, as compared to noninfected hemocytes. II. Virus-infected hemocytes. J. Invert. Pathol. 14, 245-257.
- Lavine, M.D., Strand, M.R., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem. Mol. Biol. 32, 1295-1309.
- Matos, T.G.T., Giugliano, L.G., Ribeiro, B.M., Báo, S.N., 1999. Structural and ultrastructural studies of *Anticarsia gemmatalis* midgut cells infected with the baculovirus *A. gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. Int. J. Insect Morphol. Embriol. 28, 195-201.
- Moscardi, F., 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidoptera. Annu. Rev. Entomol. 44, 257-289.
- O'Reilly, D.R., Miller, L.K., Luckow, V.A., 1992. Baculovirus Expression Vectors. A Laboratory Manual. W.H. Freeman and Company, New York.
- Pinedo, F.J.R., Moscardi, F., Luque, T., Olszewski, J.A., Ribeiro, B.M., 2003. Inactivation of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (egt) gene of *Anticarsia germnatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) improves its virulence towards its insect host. Biol. Control 27, 336–344. Pombo, V., Velloso, L.M., Ribeiro, B.M., Báo, S.N., 1998. Structural and
- Pombo, V., Velloso, L.M., Ribeiro, B.M., Báo, S.N., 1998. Structural and ultrastructural changes during the infection of UFL-AG-286 cells with the baculovirus AgMNPV. J. Invert. Pathol. 72, 239–245.
- Razuck, F.B., Ribeiro, B., Vargas, J.H., Wolff, J.L., Ribeiro, B.M., 2002. Characterization of the p10 gene region of Anticarsia gemmatalis nucleocolvhedrovirus. Virus Genes 24, 243-247.
- Ribeiro, C., Simões, N., Brehélin, M., 1996. Insect immunity: the haemocytes of the armyworm Mythinma unipuncta (Lepidoptera: Noctuidae) and their role in defence reactions. In vivo and in vitro studies. J. Insect Physiol. 42, 815–822.

- Ribeiro, B.M., Souza, M.L., Kitajima, E.W., 1998. Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus de insetos. In: Alves, S.B. (Ed.), Controle Microbiano de Insetos. FEALQ, Piracicaba, pp. 481-507. Ribeiro, B.M., Gatti, C.D.C., Costa, M.H., Moscardi, F., Maruniak, J.E.,
- Ribeiro, B.M., Gatti, C.D.C., Costa, M.H., Moscardi, F., Maruniak, J.E., Possee, R.D., Zanotto, P.M.A., 2001. Construction of a recombinant *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV-2D) harbouring the beta-galactosidase gene. Arch. Virol. 146, 1355–1367.
- Ing in order gametostatus gener Facht ruter (Po, 1950-1567). Rodrigues, J.C., Souza, M.L., O'Reilly, D.R., Velloso, L.M., Pinedo, F.J., Razuck, F.B., Ribeiro, B., Ribeiro, B.M., 2001. Characterization of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (egt) gene of Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus. Virus Genes 22, 103–112.
- Sieburth, P.J., Maruniak, J.E., 1988. Susceptibility of an established cell line of *Anticarsia gemmatalis* (Lepdoptera: Noctuidae) to three nuclear polyhedrosis viruses. J. Invert. Pathol. 52, 453-458.
- Silveira, E.B., Ribeiro, B.M., Báo, S.N., 1999. Morphological studies of apoptosis in insect cells infected with vApAg, an *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus mutant. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 31, 543– 554.
- Silveira, E.B., Ribeiro, B.M., Báo, S.N., 2003. Characterization of larval haemocytes from the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 35, 120–130.
- Stettler, P., Wyler, T., Pfister-Wilhelm, R., Lanzrein, B., 1998. Overview of parasitism associated effects on host haemocytes in larval parasitoids and comparison with effects of the egg-larval parasitoid Chelonus

inanitus on its host Spodoptera littoralis. J. Insect Physiol. 44, 817-831.

- Trudeau, D., Washburn, J., Volkman, L.E., 2001. Central role of haemocytes in Autographa californica M nucleopolyhedrosis pathogenesis in Heliothis virescens and Helicoverpa zea. J. Virol. 75, 996–1003.
- Volkman, L.E., Keddie, B.A., 1990. Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis. Semin. Virol. 1, 249-256.
- Washburn, J.O., Kirkpatrick, B.A., Volkman, L.E., 1995. Comparative pathogenesis of Autographa californica M nuclear polyhedrosis virus in larvae of Trichoplusia ni and Heliothis virescens. Virology 209, 561-568.
- Washburn, J.O., Kirkpatrick, B.A., Volkman, L.E., 1996. Insect protection against viruses. Nature 383, 767.
- Washburn, J.O., Haas-Stapleton, E.J., Tan, F.F., Beckage, N.E., Volkman, L.E., 2000. Co-infection of *Manduca sexta* larvae with polydnavirus from *Cotesia congregata* increases susceptibility to fatal infection by *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus. J. Insect Physiol. 46, 179-180.
- Williams, G.V., Faulkner, P., 1997. Cytological changes and viral morphogenesis during baculovirus infection. In: Miller, L.K. (Ed.), The Baculoviruses. Plenum Press, New York, pp. 61–107.
- Zhang, P., Yang, K., Daí, X., Pang, Y., Su, D., 2002. Infection of wildtype Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus induces in vivo apoptosis of Spodoptera litura larvae. J. Gen. Virol. 83, 3003– 3011.

3.1. APOPTOSIS IN HEMOCYTES FROM THE VELVET BEAN CATERPILLAR Anticarsia gemmatalis (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) INDUCED BY VAPAG, AN Anticarsia

gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus MUTANT.

Eni Braga da Silveira, Bruno Arrivabene Cordeiro, Bergmann Morais Ribeiro, Sônia

Nair Báo

(Microbes and Infection)

Apoptosis in hemocytes from the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) induced by vApAg, an *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* mutant

Eni Braga da Silveira ^{a,b}, Bruno Arrivabene Cordeiro ^b, Bergmann Morais Ribeiro ^b, Sônia Nair Báo ^{b*}.

^aDepartamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6109, Campinas, SP 13.083-863, Brasil.

^bDepartamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF 70919-970, Brasil.

**Corresponding author*. Sônia Nair Báo. Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF 70919-970, Brasil. Telephone: +51 61 307-2424 Fax: +51 61 347-6533. *E-mail address*: <u>snbao@unb.br</u>

Abstract

An Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) mutant, vApAg, induces apoptosis in a cell culture derived from Anticarsia gemmatalis (UFL-AG-286), abrogating protein synthesis at late times post-infection and reducing viral progeny production. This mutant is also less pathogenic for A. gemmatalis larvae by oral infection, if compared to the wild-type virus. In this study we have investigated apoptosis induction in vivo by accessing vApAg infection in A. gemmatalis hemocytes by intrahaemocoelic inoculation. Light and transmission electron microscopy revealed that all types of hemocytes can be infected by vApAg, but as previously demonstrated for AgMNPV, gh2 was shown to be less susceptible to baculovirus infection and replication. After 12 hours post infection (h p. i.), typical cellular modifications, as nuclear hypertrophy, virogenic stroma and nucleocapsids assembling were visualized. Apoptosis events became evident after 24 h p. i., and cell death was massive after 72 h p. i. Despite cell death, there was assembly of polyhedra and accumulation of fibrillar aggregates, in a similar fashion to what happens in UFL-AG-286 cells infected with this mutant. Pl and gh1 phagocytosed apoptotic bodies, entire cells and polyhedra. Necrosis of infected cells was also observed. Agarose gel electrophoresis revealed fragmentation of hemocytes DNA, at 48 and 72 h p. i. The mean time to death was extended for vApAg-infected larvae if compared to the time to death by infection with the wild-type virus. These results show correlation of apoptosis in vivo and the reduced infectivity of vApAg in A. gemmatalis larvae.

Keywords Apoptosis; *Baculoviridae*; Hemocytes; Hemolymph; Lepidoptera; Ultrastructure.

Abbreviations

AcMNPV - Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus

- AgMNPV Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus
- BV budded virus
- DIC differential interferential contrast
- **gh1** granular hemocyte type 1
- **gh2** granular hemocyte type 2
- IAP inhibitor of apoptosis protein
- LC 50 lethal concentration to kill 50% of individuals in a bioassay
- h p. i. hours post infection
- **PFU** plaque forming unit
- PIBs polyhedral inclusion bodies
- pl plasmatocyte
- **pr** prohemocyte
- sph spherulocyte
- TEM transmission electron microscopy

1. Introduction

Apoptosis is a kind of programmed cell death conserved among different kingdoms, playing important functions in immunity, development, cell differentiation and tissue homeostasis. Apoptosis can be triggered by diverse stimuli, which results in cysteine protease activation that drives cell shrinkage, DNA cleavage by endonucleases, and cell fragmentation into apoptotic bodies [1, 2].

Apoptosis regulation by baculoviruses has been extensively studied since the beginning of the 1990s, when a mutant of *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) was shown to induce apoptosis in a cell line derived from *Spodoptera frugiperda* [3]. Recently, studies in this field allowed the recognition of apoptosis as an important anti-viral response in insects, which lack acquired immunity elements such as antibodies, for example [4].

In baculoviruses, two genes, p35 and *iap*, are described as responsible for blocking apoptosis in the host cell, supporting viral replication. Mutation in these genes, or the impairment of their expression, results in premature death and reduction in viral progeny achievement in specific hosts, as demonstrated mainly for AcMNPV and Bombyx mori nucleopolyhedrovirus (BmNPV) [5]. In other cases, despite presenting intact anti-apoptotic genes, baculoviruses like AcMNPV induce apoptosis and display reduced infectivity and propagation *Spodoptera* [6]. *Heliothis* in litura larvae armigera single nucleopolyhedrovirus (HaSNPV) induces apoptosis in a cell line derived from Trichoplusia *ni* [7]. This demonstrates that the strategies to counteract apoptosis are one of the determinants of baculovirus host range.

The baculovirus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) has been used for more than twenty years in Brazil to control the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* (Hübner). It represents an important factor for the reduction in production costs and environmental damages caused by chemical pesticides in soybean (*Glycine max*) crops [8, 9]. AgMNPV is a rod-shaped, enveloped virus with circular, double-stranded, 133-kbp DNA genome, pathogenic to lepidopterans [10, 11].

During the construction of a recombinant baculovirus derived from AgMNPV, besides recombinant and non-recombinant viruses, a mutant, vApAg, was obtained which induces premature death in a cell line highly permissive to AgMNPV (UFL-AG-286) [12]. However, in another cell line (BTI-Tn-5B1-4) (Tn-5B) [13], vApAg replicates normally. UFL-AG-286 cells infected by vApAg die by apoptosis, presenting surface blebbing, fragmentation into apoptotic bodies and oligonucleossomal fragmentation of DNA. Despite apoptosis occurrence, budded viruses (BV) and polyhedral inclusion bodies (PIBs) are produced [14], but in a reduced fashion if compared with the progeny obtained by the wild-type virus in the same cell line [15]. The mortality of *A. gemmatalis* larvae by oral inoculation with vApAg is also reduced, which suggests apoptosis occurrence in vivo (Castro et al., unpublished).

Although it has long been reported that baculoviruses lacking an anti-apoptotic gene have a reduction of in vivo infectivity, to date, there are only two reports concerning baculovirus induction of apoptosis in vivo [6, 16].

In this work, we have investigated if the vApAg mutant induces apoptosis in vivo by accessing vApAg infection in *A. gemmatalis* hemocytes by intrahaemocoelic inoculation. Mortality and time to death of infected insects were determined. Light and

83

transmission electron microscopy were used to follow the temporal events of infection in hemocytes. Agarose gel electrophoresis was conducted to detect oligonucleossomal fragmentation of DNA.

2. Materials and methods

2.1. Insects and viruses

A. gemmatalis eggs were provided by Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia and Embrapa Soja and reared on artificial diet [17] at 26 - 27 °C, with a 12:12 h dark/light regime. The molts were monitored, and 4th instar larvae (between 0 and 24 h after molt) were used for all experiments.

AgMNPV isolate 2 D [11] was propagated in UFL-AG-286 cells [12, 18] and vApAg was propagated in BTI-Tn-5B1-4 (Tn-5B) cells [13]. Cell cultures were maintained in TC-100 medium (GIBCO-BRL Life Technologies, Grand Island, N.Y.) supplemented with 10% fetal bovine serum at 27 °C. The inocula were tittered by the TCID₅₀ method, following the protocol described by O'Reilly et al. [19].

2.2. Bioassays

Insects were injected with 20 μ l of viral inoculum directly into the haemocoel, by using an insulin micro-syringe. Four different concentrations of inoculum were used for AgMNPV (5 pfu/ml, 5x 10² pfu/ml, 5x 10³ pfu/ml, 5x 10⁴ pfu/ml) and for vApAg (5x 10³ pfu/ml, 5x 10⁴ pfu/ml, 5x 10⁵ pfu/ml, 5x 10⁶ pfu/ml). Thirty larvae were inoculated with

each concentration. Each larva was reared separate in a plastic cup. Development and mortality were analyzed every day up to the end of the experiment. Deaths attributed to inoculation trauma were not considered. Controls were obtained by the inoculation of an equal volume of TC-100 medium (mock-infected) and by no inoculation. Larvae were considered dead if they did not move after mechanical stimulation. The mean time to death (MTD) was calculated according to Morales et al. [20].

2.3. Light and transmission electron microscopy

Hemolymph samples of insects infected with 20 µl of vApAg inoculum (10^{8} pfu/ml), as described, were collected in anticoagulant buffer (98 mM NaOH, 186 mM NaCl, 1.7 mM EDTA, 41 mM citric acid, pH 4.5) [21] after different times post infection (12, 24, 48 and 72 h p.i.) and observed under differential interferential contrast (DIC) in an Axiophot Zeiss microscope. For transmission electron microscopy, the samples were fixed for 30 min (2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.4 with 5% sucrose), centrifuged at 750 *g* for 5 min, the pellet washed in the same buffer, post-fixed (1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferricyanide in the same buffer), contrasted in block with 0.5% uranyl acetate, dehydrated in acetone, and embedded in Spurr's resin. The ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate/lead citrate and observed in a TEM JEOL 100C and JEOL 1011 at 80 kV.

2.4. Hemocyte identification

Larval *A. gemmatalis* hemocyte types were identified by structural and ultrastructural characteristics described previously [22,23].

2.5. DNA extraction and oligonucleossomal fragmentation assay

Haemolymph samples obtained from insects inoculated with 20 µl of viral inoculum (10^8 pfu/ml) , as described, were collected in PBS pH 7.2 at 12, 24, 48 and 72 h p.i., and submitted to DNA extraction according to Aljanabi and Martinez [24]. In brief, samples were centrifuged at 1300 g for 6 min, the pellet ressuspended in 400 µl lysis buffer (0.4 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM EDTA pH. 8.0), 1 mg/ml proteinase K, 2% SDS and incubated at 50 °C for 1 h. Then, 400 µl of 6 M NaCl were added, the tubes were gently vortexed and centrifuged at 16000 g for 20 min. Equal volume of isopropanol was added to the supernatant, it was homogenized and maintained at –20 °C for at least 1 h. The DNA was precipitated by centrifugation at 16000 g for 20 min, washed with 70% ethanol, dried and ressuspended in 50 µl T E (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0). Ribonuclease A was added to a final concentration of 40 µg/ml. DNA concentration was estimated according to phage λ standards in 0.8% agarose gel at 80 V and visualized under UV radiation after incubation with ethidium bromide.

3. Results

3.1. Bioassays

AgMNPV doses of 10, 10^2 and 10^3 (pfu/larva) resulted in death for 100% of larvae (Fig. 1A), with mean times to death of 5.7, 5 and 4.4 days, respectively (Table 1). For these times, no pupae formed. For 10^{-1} pfu/larva, 51.9% of larvae became pupae between 5 and 8 days, and 85.6% of the pupae emerged as moths between 12 and 17 days (Fig. 2A). For this dose, the death of larvae (48.1%) occurred in a mean time of 6.5 days (Table 1). For vApAg, the four doses tested (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 pfu/larvae) resulted in 100% death (Fig. 1B), but the mean time to death was prolonged in comparison to AgMNPV (8, 6.3, 5.5 and 4.6 days, respectively) (Table 1). For the lowest dose of vApAg (100 pfu/larva), some prepupae occurred (15%) but no pupae were formed (Fig. 2B). For both viruses, liquefaction of dead larvae was observed.

3.2. Light and transmission electron microscopy (TEM)

Six hemocytes types were recognized in *A. gemmatalis* larvae based on structural and ultrastructural characteristics, as described previously [22, 23]. They were prohemocytes (pr), plasmatocytes (pl), granular hemocytes type 1 (gh1), granular hemocytes type 2 (gh2), oenocytoids (oe), and spherulocytes (sph).

By DIC, the hemocyte morphology was similar to control, after 12 and 24 h p. i. with a small number of fragmented cells (Fig. 3A). By the TEM, nuclei were hypertrophied after 12 and 24 h p.i. (Fig. 4A-D), with a slight folding of the nuclear envelope. The heterochromatin was marginated and virogenic stroma became evident, presenting

87

nucleocapsids assembling. In the nuclear periphery, nucleocapsids were enveloped by membranous profiles. In this period, fibrillar aggregates appeared and accumulated in the cytoplasm (Fig. 4D). Nucleocapsids were directed to the cytoplasm by budding through the nuclear envelope, and BVs were seen to protrude at the plasma membrane (Figs. 4B-C). Chromatin condensation was observed eventually for some cells (not shown).

After 48 and 72 h, an extensive number of fragmented cells and PIBs could be observed by DIC (Fig. 3B). By TEM, PIBs assembling, extensive nuclear and cytoplasmic fibrillar aggregates were visualized (Figs. 5A-B, 6A-C). For some cells, the nuclear envelope was greatly expanded, forming a convoluted network through the adjacent cytoplasm (Fig. 6A). These expanded nuclei eventually were broken, causing the mix of nuclear and cytoplasmic compartments, and commonly finding PIBs or groups of unenveloped nucleocapsids just beneath the plasma membrane (Fig.6B-C).

Endomembranes dilation, plasma membrane blebbing and cell fragmentation into apoptotic bodies were observed at 12 h p. i., however, they became more frequent at late times post-infection. Apoptosis was observed for cells that did not present viral cytopathic effects or for infected cells in different phases of viral morphogenesis (Fig. 7A-E). The pattern of cell fragmentation was shown to be variable (Fig. 7A-D). BV entry and intense budding were observed for apoptotic cells or apoptotic bodies (Figs. 7B, D, E). It was not possible to detect apoptotic bodies' production for sph, despite their evident infection (Figs. 5B, 9A).

Phagocytic activity was observed at 12 h p.i. for pl and gh1 and, such as apoptosis events, it became more intense at late times post infection. These two hemocyte types were observed to phagocytose apoptotic bodies, entire cells and free PIBs, but the engulfment of
large bodies, such as entire cells, was more common for pl (Fig. 8A-C). Necrosis of infected cells, presenting a mature virogenic stroma or even PIBs, was frequently observed (Fig. 9A-B). All hemocyte types were shown to be infected, but, for gh2, this occurred in an extremely low frequency.

3.3. DNA oligonucleossomal fragmentation assay

Agarose gel electrophoresis of hemocyte DNA revealed that for mock (not shown) and AgMNPV - infected insects, there was not DNA fragmentation (Fig.10A). For vApAg, ladders were not visualized, but smears were found for 48 and 72 h p. i., periods when apoptosis was more evident (Fig. 10B).

4. Discussion

By studying baculovirus interactions with their hosts, intriguing questions can be elucidated related to the specificity of infection, such as the diversity of survival strategies developed by both viruses and insects over coevolution for millions of years. In this scenario, the knowledge about apoptosis as a defense mechanism in insects and its regulation by baculoviruses are important results of efforts in this field.

In this work, we have demonstrated that intrahaemocoelic infection of *A*. *gemmatalis* larvae with vApAg causes apoptosis in hemocytes after 24 h p.i., with the occurrence of progeny production (BVs and PIBs). Despite massive apoptosis at 48 and 72 h p. i., BV doses of 10^2 pfu/larva or more induce disease development and death of 100% of larvae. In comparison to intrahaemocoelic infection with AgMNPV BV, the mean time to death has been extended in an average of 2.5 days for the same doses $(10^2 \text{ and } 10^3 \text{ pfu/larva})$.

Previous studies for *A. gemmatalis* larvae orally-inoculated with PIBs also revealed infectivity reduction for vApAg. The LC $_{50}$ (concentration of virus to kill 50% of individuals in a bioassay) of vApAg PIBs is 5 times higher than the LC $_{50}$ of AgMNPV (Castro et al., unpublished), however, the mean time to death was similar for both (around 9 days). For other systems, apoptosis can reduce more drastically infectivity in vivo. In *Spodoptera frugiperda* larvae, 1,000 fold more BV of AcMNPV *p35*⁻ and 25 fold more PIBs are required for a LC $_{50}$ in comparison to the wild-type or revertant viruses [25, 26].

The temporal sequence of vApAg morphogenesis in *A. gemmatalis* hemocytes was similar to that observed for UFL-AG-286 cells [14], for AgMNPV in hemocytes [23] and for AgMNPV in other cells [27, 28]. However, symptoms appear earlier through intrahaemocoelic infection than by oral infection, once a high number of BVs is available to infect hemocytes, bypassing natural barriers and defenses such as midgut digestive juices, peritrophic membrane [29] and midgut cell sloughing [30].

Cell fragmentation in apoptotic bodies started at 24 h p. i., but a major number of apoptotic cells were observed at 48 and 72 h p. i., which indicates a slight delay if compared to UFL-AG-286 cells infected with vApAg [14]. On agarose gels, there was evidence of hemocyte DNA fragmentation (smears) at these times, but it was not possible to visualize ladders, as shown for UFL-AG-286 cells [14]. Contrary to in vitro conditions, the relative number of apoptotic cells in hemolymph must be lower than in cell culture because of cell turnover and putative differences of susceptibility for the diverse types of hemocytes. Besides this, the intense phagocytosis that occurs in hemolymph may promote a

faster secondary degradation of apoptotic bodies DNA into random-size fragments. Together, these factors may have hindered oligonucleossomal fragment resolution and visualization in the gel.

Once cell fragmentation occurred at late times post-infection, the virus cycle of replication was not completely abrogated, allowing BV and PIB production. The vApAg progeny obtained in UFL-AG-286 cells was reduced 100 times when compared to the wild-type virus [15], showing that apoptosis is correlated with a slight dropping in progeny production in vitro. Preliminary studies of BVs titration in hemolymph indicate that there is no significant difference between AgMNPV and vApAg levels of progeny production in hemolymph for 48 and 72 h p. i., however additional data is necessary to confirm this tendency. It is possible that in other tissues vApAg does not replicate so well as it does in hemocytes, which can be the determinant of larval death delay.

Besides the usual way of cell fragmentation into apoptotic bodies, at late times postinfection some cells presented nuclear disruption and cell architecture disorganization, associated with an exacerbated expansion of the nuclear envelope. Cytoskeleton changes triggered by baculoviral infection per se [27] associated with apoptosis may be the cause of this unusual event in *A. gemmatalis* hemocytes.

We have found that all hemocyte types of *A. gemmatalis* presented signs of infection, but gh2 appeared to be more resistant to baculovirus infection, as shown previously for the wild-type virus [23]. So, there is no difference between AgMNPV and vApAg in relation to the capacity of infection for the different types of hemocytes. Despite infection, PIB assembly and eventual chromatin condensation, sph appear not to be

91

fragmented into apoptotic bodies, a property that may be somewhat related to the unusual morphology of this hemocyte type.

The infection by vApAg generated phagocytic responses by pl and gh1. Both hemocyte types phagocytosed free virions, PIBs, cell remnants, apoptotic bodies and entire cells. Previous observations for these cells infected by AgMNPV revealed pl as the only cell to phagocytose entire cells [23], which was more frequent for vApAg also.

Another event previously reported for intrahaemocoelic infection with AgMNPV and observed for vApAg-infected hemocytes, was the necrosis of infected cells; which presented mature virogenic stroma or polyhedra. Together, phagocytosis and necrosis of infected hemocytes are clues for a putative recognition of these virus-infected cells as altered self, and the triggering of cytotoxic responses against them besides apoptosis. Alternatively, necrosis might simply mean that virus is killing the cell. However, for cultivated cells infected with AgMNPV, membrane rupture and necrosis are generally observed only when the cells are full of PIBs and fibrillar agreggates, and not before the total completion of the viral cycle, as frequently observed in this and in the previous study [23].

Until now, cellular immune responses described against baculoviruses comprises virus uptake in hemolymph, encapsulation and melanization of tracheal infection foci by hemocytes. It has been demonstrated to be important for the circumvention of AcMNPV infection in *Helicoverpa zea* and *Manduca sexta*, as an organism-level strategy of resistance [32-34]. Besides this, the hemocytes resistance to infection and replication per se is a limiting factor to baculovirus spread in organisms [34].

For many years, apoptosis induced by mutant baculoviruses in cultivated insect cells had been correlated with infectivity reduction in vivo [5], however only recently this type of cell death was reported in baculovirus-infected insects. AcMNPV was shown to induce apoptosis in diverse tissues of a non-permissive host (*Spodoptera litura*) [6]. The same happened for a $p35^{-}$ AcMNPV recombinant in *S. frugiperda*, which was correlated to infectivity reduction [16]. These reports confirmed apoptosis as an important anti-viral response in insects and one determinant of host species spectrum [4] and so does the present work.

Two types of apoptosis inhibitors are described for baculoviruses: P35 protein and inhibitor of apoptosis protein (IAP). P35 is a broad spectrum caspase inhibitor present only in baculoviruses while IAP constitutes a protein family whose members are described in baculoviruses, insects, nematodes and humans [5]. AgMNPV is known to posses at least one type of *iap* gene (Carpes et al., unpublished) (GenBank accession number AY525121), which was shown to encode a functional IAP since insect cells transfected with increasing amounts of a plasmid containing the *iap-3* of AgMNPV showed increased resistance to apoptosis induced by vApAg (Carpes et al., unpublished). This gene (*iap 3*) was shown to be disrupted by a transposable element in the vApAg virus (Carpes et al., unpublished), which can be the cause of apoptosis induction in cell culture and in *A. gemmatalis* hemocytes by this mutant virus.

This work brought a detailed description of the effects caused by an apoptosisinducing baculovirus in *A. gemmatalis* hemocytes. It was shown that despite apoptosis induction, vApAg replicates in these cells, with the occurrence of phagocytosis of apoptotic bodies, virions, phagocytosis and necrosis of infected cells. Apoptosis occurrence was correlated with a delay in larvae death. This report reinforces the anti-viral function of apoptosis and demonstrated also other putative anti-viral responses represented by phagocytosis and necrosis of infected cells.

5. Acknowledgements

We are grateful to Dr. M. E. B. Castro (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) and Dr. F. Moscardi (Embrapa Soja) for supplying *Anticarsia gemmatalis* eggs and larvae. We also thank Dr. J. Maruniak (University of Florida) for manuscript grammatical revision. This work was supported by CAPES, CNPq, FAP/DF, FINATEC and PRONEX.

References

- [1] J.F.R. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie, Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, Br. J. Cancer 26 (1972) 239-257.
- [2] P.C. Ashe, M.D. Berry, Apoptotic signaling cascates, Prog. NeuroPsychopharmacol. Biol. Psyc. 27 (2003) 199-204.
- [3] R.J. Clem, M. Fechheimer, L.K. Miller, Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells, Science 254 (1991) 1388-1390.
- [4] T.E. Clarke, R.J. Clem, Insect defenses against virus infection: the role of apoptosis, Int. Rev. Immunol. 22 (2003) 401-424.
- [5] R.J. Clem, Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad and the ugly, Cell Death Differ. 8 (2001) 137-143.
- [6] P. Zhang, K. Yang, X. Daí, Y. Pang, D. Su, Infection of wild-type Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus induces in vivo apoptosis of Spodoptera litura larvae, J. Gen. Virol. 83 (2002) 3003-3011.
- [7] X. Dai, X. Shi, Y. Pang, D. Su, Prevention of baculovirus-induced apoptosis of BTI-Tn-5B1-4 (Hi5) cells by the *p35* gene of *Trichoplusia ni* multicapsid nucleopolyhedrovirus, J. Gen. Virol. 80 (1999) 1841-1845.
- [8] B.M. Ribeiro, M.L. Souza, E.W. Kitajima, in: S. B. Alves (Ed), Controle Microbiano de Insetos, FEALQ, Piracicaba, 1998, pp. 481-507.
- [9] F. Moscardi, Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidoptera, Annu. Rev. Entomol. 44 (1999) 257-289.
- [10] D.W. Johnson, J.E. Maruniak, Physical map of Anticarsia gemmatalis Nuclear

Polyhedrosis Virus (AgMNPV-2) DNA, J. Gen. Virol. 70 (1989) 1877-1883.

- [11] J.J. Grasela, A.H. McIntosh, *In vitro* and *in vivo* host range of *Anticarsia gemmatalis* multiple nuclear polyhedrosis virus, In Vitro Cell.Dev. Biol. 34 (1998) 79-83.
- [12] P.J. Sieburth, J.E. Maruniak, Growth characteristics of a continuous line from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), In Vitro Cell Dev. Biol. 24 (1988) 195-198.
- [13] R.R. Granados, L. Guoxun, A.C.G. Derksen, K.A. McKennna, 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 (1994) 260-266.
- [14] E.B. Silveira, B.M. Ribeiro, S.N. Báo, Morphological studies of apoptosis in insect cells infected with vApAg, an *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus mutant, J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 31 (1999) 543-554.
- [15] M.E.B. Castro, B.M. Ribeiro, Production of viral progeny in insect cells undergoing apoptosis induced by a mutant *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus, Microbiol. Res. 156 (2001) 369-376.
- [16] T.E. Clarke, R.J. Clem, In vivo induction of apoptosis correlating with reduced infectivity during baculovirus infection, J. Virol. 77 (2003) 2227-2232.
- [17] G.L. Greene, N.C. Leppla, W.A. Dickerson, Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium, J. Econ. Entomol. 69 (1976) 487-488.
- [18] P.J. Sieburth, J.E. Maruniak, Susceptibility of an established cell line of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) to three nuclear polyhedrosis viruses, J. Invertebr. Pathol. 52 (1988) 453-458.

- [19] D.R. O'Reilly, L.K. Miller, V.A. Luckow (Eds.), Baculovirus Expression Vectors. A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, New York, 1992.
- [20] L. Morales, F. Moscardi, D.R. Sosa-Gomez, F.E. Paro, I.L. Soldorio, Fluorescent brighteners improve *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) activity on AgMNPV susceptible and resistant strains of the insect, Bio. Control. 20 (2001) 247-253.
- [21] G.P. Mead, N.A. Ratcliffe, L.R. Renwrantz, The separation of insect hemocyte types on Percoll gradients: methodology and problems, J. Insect Physiol. 32 (1986) 167-177.
- [22] E.B.Silveira, B.M. Ribeiro, S.N. Báo, Characterization of larval haemocytes from the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 35 (2003) 129-139.
- [23] E.B.Silveira, B.A. Cordeiro, B.M. Ribeiro, S.N. Báo, Morphological characterization of *Anticarsia gemmatalis* M nucleopolyhedrovirus infection in haemocytes from its natural larval host, the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera:Noctuidae), Tissue Cell 36 (2004) 171-180.
- [24] S.M Aljanabi, I. Martinez, Universal and rapid salt extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques, Nucleic Acids Res. 25 (1997) 4692-4693.
- [25] R.J. Clem, L.K. Miller, Apoptosis reduces both the in vitro replication and the in vivo infectivity of a baculovirus, J. Virol. 67 (1993) 3730-3738.
- [26] R.J. Clem, M. Robson, L.K. Miller, Influence of infection route on the infectivity of baculovirus mutants lacking the apoptosis-inhibiting gene *p35* and the adjacent gene *p94*, J. Virol. 68 (1994) 6759-6762.

- [27] V. Pombo, L.M. Velloso, B.M. Ribeiro, S.N. Báo, Structural and ultrastructural changes during the infection of UFL-AG-286 cells with the baculovirus AgMNPV, J. Invertebr. Pathol. 72 (1998) 239-245.
- [28] T.G.T. .Matos, L.G. Giugliano, B.M. Ribeiro, S.N. Báo, Structural and ultrastructural studies of *Anticarsia gemmatalis* midgut cells infected with the baculovirus *A. gemmatalis* nucleopolyhedrovirus, Int. J. Insect Morphol. Embriol. 28 (1999) 195-201.
- [29] R.R. Granados, Infectivity and mode of action of baculoviruses, Biotechnol. Bioeng.22 (1980) 1377-1405.
- [30] K. Hoover, J.O. Washburn, L.E. Volkman, Midgut-based resistance of *Heliothis virescens* to baculovirus infection mediated by phytochemicals in cotton, J. Insect Physiol. 46 (2000) 999-1007.
- [31] S. Chernysh, S.I. Kim, G. Bekker, V.A. Pleskach, N.A. Filatova, V.B. Anikin, V.G. Platonov, P. Bulet, Antiviral and antitumor peptides from insects, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002) 12628-12632.
- [32] J.O.Washburn, B.A. Kirkpatrick, L.E. Volkman, Insect protection against viruses, Nature 383 (1996) 767.
- [33] J.O.Washburn, E.J. Haas-Stapleton, F.F. Tan, N.E. Beckage, L.E. Volkman, Coinfection of *Manduca sexta* larvae with polydnavirus from *Cotesia congregata* increases susceptibility to fatal infection by *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus, J. Insect Physiol. 46 (2000) 179-190.

[34] D. Trudeau, J.O Washburn, L.E. Volkman, Central role of haemocytes in *Autographa* californica M nucleopolyhedrosis pathogenesis in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea*, J. Virol. 75 (2001) 996-1003.



Fig. 1. Mortality of *A. gemmatalis* larvae over time after intrahaemocoelic infection with different doses of AgMNPV (A) and vApAg (B). n= 30 for each dose.



Fig. 2. Bioassay composition over time of infection for the cohort infected with 0.1 pfu AgMNPV (A) and 100 pfu vApAg (B).



Fig. 3. DIC micrographs of *A. gemmatalis* larval hemocytes infected with vApAg. (A) 12 h p.i. (B) 72 h p. i. Small arrowheads – cells presenting PIBs, large arrowheads – apoptotic bodies. Bars represent 65 μm.



Fig. 4. Transmission electron micrographs of *A. gemmatalis* larval hemocytes after 12 and 24 h p. i. with vApAg. (A) Oenocitoid, presenting a hypertrophied nucleus (n) containing an immature virogenic stroma (vs). Small arrowheads - nucleocapsids. (B) Granular hemocyte type 1 presenting some BVs budding at the plasma membrane (large arrowheads) and phagolysosomes (p). Small arrowheads - nucleocapsids, m - mitochondria. (C) Putative prohemocyte displaying a mature virogenic stroma (vs), nucleocapsids transportation through the cytoplasm (large arrowheads) and an intense BVs budding at the plasma membrane (arrows). Small arrowheads - nucleocapsids. (D) Plasmatocyte displaying nucleocapsids envelopment by membranous profiles (e) and cytoplasmic fibrillar aggregates (*). N - nucleus, m - mitochondria. Bars represent 1 μm.



Fig. 5. Transmission electron micrographs of *A. gemmatalis* larval hemocytes after 48 and 72 h p. i. with vApAg. (A) Plasmatocyte presenting nuclear and cytoplasmic fibrillar aggregates (*), nuclear envelope folding (large arrowheads) and PIBs assembling (small arrowheads). N -nucleus, m - mitochondria. (B) Spherulocyte. N - nucleus, p - PIBs, s - spherule, * - fibrillar aggregate. Bars represent 1.5 μm.



Fig. 6. Transmission electron micrographs of *A. gemmatalis* larval hemocytes after 48 and 72 h p. i. with vApAg, which presented cytoplasmic disorganization. (A) Unidentified hemocyte. Note the intensely extended nuclear envelope (large arrowheads), and the numerous nucleocapsids in the periphery of the cytoplasm (small arrowheads). N - nucleus, * - fibrillar aggregate. (B) Unidentified hemocyte. The nucleus was broken and remnants of the nuclear envelope (small arrowheads) were mixed with fibrillar aggregates (*), nucleocapsids (large arrowheads), mitochondria (m) and PIBs (p). (C) Unidentified hemocyte. A great number of PIBs (p) were produced, the nuclear envelope was ruptured, some PIBs (p) and free nucleocapsids (small arrowheads) lie beneath the plasma membrane. * - Fibrillar aggregates. Bars represent 2 μm.



Fig. 7. Transmission electron micrographs of *A. gemmatalis* larval hemocytes in apoptosis induced by vApAg. (A) A putative prohemocyte presenting surface blebbing (large arrowheads). N - nucleus, m - mitochondria, r - rough endoplasmic reticulum. (B) Granular hemocyte type 1. Note the aligned nucleocapsids (nc) in the nucleus (N), surface blebbing (large arrowheads) and a BV (small arrowhead) entering the cell by endocytosis (inset). (C) Plasmatocyte in apoptosis. * - Fibrillar aggregates, small arrowheads - nucleocapsids, v - vesicles, p - PIBs, m - mitochondria. (D) Unidentified hemocyte in apoptosis. a - apoptotic bodies, * - Fibrillar aggregates, small arrowheads - BVs, p - PIBs. (E) Apoptotic body probably derived from a granular hemocyte type 1. Numerous BVs were budding at the plasma membrane (small arrowheads) (inset). mitochondria. Bars represent 1 μ m. Insets bars represent 0.2 μ m.



Fig. 8. Phagocytic activity of *A. gemmatalis* larval hemocytes infected with vApAg. (A) Granular hemocyte type 1 whose phagolysosomes contain cell debris (p). N - nucleus, m-mitochondria. (B) A plasmatocyte presenting a phagolysosome containing an entire transversal section of a cell (small arrowheads). N - plasmatocyte nucleus. (C) A plasmatocyte that engulfed an infected cell (small arrowheads indicate the limits of the phagosome). The same cell also has phagocytosed free PIBs (p). N - plasmatocyte nucleus, nu - engulfed cell nucleus, * - fibrillar aggregates. Bars represent 2 μ m.



Fig. 9. Necrosis of infected cells. (A) A spherulocyte (sp) presenting a mature virogenic stroma (vs) with nucleocapsids assembling (small arrowheads). Note the electron density difference between the sph and part of the adjacent cells (a). S - spherules. (B) An oenocytoid presenting PIBs assembling (p). A portion of the plasma membrane was disrupted and part of the cytoplasmic content was extruded (small arrowhead). A plasmatocyte (pl) is addered to the oenocitoyd surface. Bars represent 3 μ m.



Fig. 10. Three percent (3%) agarose gel electrophoresis of DNA extracted from *A*. *gemmatalis* larval hemocytes infected with AgMNPV (A) and vApAg (B). Each lane contains approximately 2 µg of DNA. M- 1kb plus DNA ladder. Arrows indicate smears. Numbers indicate hours post-infection.

Virus	Dose (pfu/larva)	Number of dead larvae ^a	Mean time to death (days)
AgMNPV	0.1	13	6.5
	10	29	5.7
	100	29	5
	1000	27	4.4
vApAg	100	26	8
	1000	28	6.3
	10000	26	5.5
	100000	24	4.6

Table 1. Mean time to death of A. gemmatalis larvae infected with different doses ofAgMNPV and vApAg.

a n = 30 for each treatment. Deaths attributed to injection trauma were not considered.

3.2. IN VIVO APOPTOSIS INDUCTION AND REDUCTION OF INFECTIVITY BY AN *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus P35*⁻ RECOMBINANT IN HEMOCYTES FROM THE VELVETBEAN CATERPILLAR *Anticarsia gemmatalis* (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Eni Braga da Silveira, Bruno Arrivabene Cordeiro, Bergmann Morais Ribeiro, Sônia

Nair Báo

(Research in Microbiology)

In vivo apoptosis induction and reduction of infectivity by an *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus p35*⁻ recombinant in hemocytes from the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)

Eni Braga da Silveira ^a, Bruno Arrivabene Cordeiro ^b, Bergmann Morais Ribeiro ^b, Sônia Nair Báo ^{b*}.

^aDepartamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6109, Campinas, SP 13.083-863, Brasil.

^bDepartamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF 70919-970, Brasil.

**Correspondence and reprints*. Sônia Nair Báo. <u>snbao@unb.br</u> Telephone: +51 61 307-2424 Fax: +51 61 347-6533.

Abstract

The Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) recombinant vP35del induces massive apoptosis in a cell culture derived from Anticarsia gemmatalis. We studied the course of infection and apoptosis induction by recombinant AcMNPV viruses expressing the enhanced green fluorescent protein (vHSGFP and vHSGFP/P35del) in A. gemmatalis hemocytes. Insect development and mortality were monitored, infection progress in hemocytes was followed by light and electron microscopy, and infected cells were counted under fluorescence microscopy. For vHSGFP, 95% of death occurred for a concentration higher than 4 x 10^5 PFU. The recombinant vHSGFP/P35del caused lower mortality, higher numbers of pupae and moths than vHSGFP for all doses tested. GFP expression was first observed at 3 h p.i., reaching proportions around 8% at 48 h p.i., increasing for vHSGFP (40% at 120 h p.i.) and decreasing for vHSGFP/P35del (0% at 120 h p.i.). The virus vHSGFP/P35del induced apoptosis in A. gemmatalis hemocytes. Some budded viruses were produced, and fragmented cells were observed between 24 and 72 h p.i. The recombinant vHSGFP induced typical cytopathic effects of baculovirus infection, however with low production of occluded viruses until 120 h p.i. Plasmatocytes and granular hemocytes type 1, which presented phagocytic activity against infected cells and apoptotic bodies, were the hemocyte-types more susceptible to both viruses in contrast to spherulocytes and granular hemocytes type 2. These results show that A. gemmatalis is a semi-permissive host for AcMNPV, that apoptosis reduces infectivity and that the p35 gene is essential for blocking apoptosis in this system.

Keywords apoptosis; Baculoviridae; GFP; hemocytes; hemolymph; lepidoptera; ultrastructure.

Abbreviations

- AcMNPV Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus
- AgMNPV Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirs
- **BmNPV** Bombyx mori nucleopolyhedrovirus
- **BV** budded virus
- **DIC** differential interferential contrast
- **gh1** granular hemocyte type 1
- **gh2** granular hemocyte type 2
- h p.i. hours post infection
- IAP inhibitor of apoptosis protein
- LC_{50} leathal concentration to kill 50% of individuals in a bioassay
- MTD mean time to death
- **NPV** nucleopolyhedrovirus
- oe oenocytoid
- **OV** occluded virus
- **PFU** plaque forming unit
- **PIBs** polyhedral inclusion bodies
- pl plasmatocyte
- pr prohemocyte
- sph spherulocyte
- **TEM** transmission electron microscopy

1. Introduction

The family *Baculoviridae* consists of enveloped, double-stranded DNA viruses, which are pathogenic to arthropods, especially lepidoptera larvae. Baculoviruses are divided in two genera, *Granulovirus* and *Nucleopolyhedrovirus*. *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), is the type-species of the *Nucleopolyhedrovirus* genus and the best-known species among baculoviruses [3].

Infection specificity and consequent safety in relation to non-target organisms are characteristics that support these viruses as agents of great potential for integrated pest management [2, 24]. Baculoviruses are also useful as heterologous genes expression vectors, since their genome supports large DNA inserts at non-essential gene loci. Foreign proteins can be successfully expressed upon infection of a permissive insect cell line [18, 26].

Apoptosis is a phenomenon of cellular self-destruction that can be triggered by diverse stimuli, such as lack of growth factors, DNA damage, ligand-receptor interactions, inhibitors of gene transcription and translation, and viral infections, among others. By activating an apoptotic response, the host cell can abort viral infection, avoiding its spread to the whole organism. For survival and progeny production, viruses had to circumvent this response along evolution, and one strategy was the acquisition of anti-apoptotic genes [21, 35].

Baculoviruses are known to possess at least two types of anti-apoptotic genes: p35 and *iap*. The gene p35 encodes a broad - spectrum caspase inhibitor, described in five baculovirus species up to date [10, 13, 14, 19, 28]. Another way of apoptosis inhibition by

P35, still not completely understood, is related to reactive oxygen species (ROS) neutralization, and prevention of cytochrome C liberation by the mitochondria [29]. The IAPs (inhibitor of apoptosis protein), which were first described in *Cydia pomonella granulovirus* (CpGV), are also found in organisms ranging from yeasts to humans. IAPs are metalloproteins that inhibit apoptosis at the level of upstream pathways of caspase activation or by interacting directly with these enzymes [9].

AcMNPV possesses p35 and *iap* genes, however, until now, anti-apoptotic function was observed only for p35 in this virus. Apoptosis induction by p35mutant ($p35^{-}$) AcMNPV viruses is best characterized for *Spodoptera frugiperda* and its derived cell line - SF-21, with a reduction in infectivity and progeny production [7, 9]. In other cases, despite presenting intact anti-apoptotic genes, AcMNPV induces apoptosis and displays reduced infectivity and propagation in some insect cell lineages [5, 27, 41] and in *Spodoptera litura* larvae [40]. These and others studies demonstrate that apoptosis is an important anti-viral response in insects, which lack acquired immunity, and that the strategies to counteract cell death are one of the determinants of baculovirus host–range [7].

Despite a great amount of information related to mutant baculovirus induction of apoptosis in vitro, only recently baculovirus induction of apoptosis in vivo was reported [6, 40].

In a previous study [33], the virus vP35del, derived from AcMNPV, which has a deletion in the *p35* gene, induced massive apoptosis in a cell line derived from *A. gemmatalis* (UFL-AG-286) [30]. Apoptosis occurred between 9 and 16 h p.i., with a total lack of progeny production [33]. In contrast, a mutant (vApAg) derived from *A. gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV), induced apoptosis in a delayed manner,

between 24 and 48 h, with some progeny production [4, 33]. Recently, it was observed that vApAg induces apoptosis in *A. gemmatalis* larval hemocytes in a way very similar to apoptosis induction in UFL-AG-286 cells (Silveira et al., submitted).

In this work, we investigated apoptosis induction in vivo by an AcMNPV $p35^{-}$ virus in *A. gemmatalis* larval hemocytes and its effects on infectivity. Recombinant viruses containing the *egfp* gene were inoculated intrahaemocoelically into 4th instar larvae. Insect development and mortality were monitored, infection progress in hemocytes was followed by light and transmission electron microscopy, and infected cells were counted under fluorescence microscopy.

2. Materials and methods

2.1. Insects and viruses

A. gemmatalis 1st instar larvae, obtained from Embrapa (Brazil), were reared on artificial diet [17] at 24-27 °C, with a 12:12 h dark/light regime. The molts were monitored, and 4th instar larvae (between 12 and 24 h after molt) were used for all experiments.

The recombinants vHSGFP and vHSGFP/P35del were propagated in BTI-Tn-5B1-4 (Tn-5B) cells [15] and maintained in TC-100 medium (GIBCO-BRL Life Technologies, Grand Island, N.Y.) supplemented with 10% fetal bovine serum at 27°C. The viruses vHSGFP and vHSGFP/P35del are derived from AcMNPV L1 strain and have the gene *egfp* under control of the *Drosophila melanogaster* constitutive promoter *hsp 70* at a site adjacent to the polyhedrin gene [6]. Additionally, vHSGFP/P35del has the anti-apoptotic

gene p35 deleted [8]. The inocula were titered by the TCID₅₀ method following the protocol described by O'Reilly et al. [26].

2.2. Bioassays

To observe the effects of viruses on insect mortality and development, larvae were injected with 20 μ l of viral inoculum directly into the haemocoel by using an insulin microsyringe. Three different concentrations of inoculum were used (2 x 10⁶ PFU/ml, 2 x 10⁷ PFU/ml, 2 x 10⁸ PFU/ml) for each virus, and twenty larvae were inoculated for each one. Each larva was reared separately in a plastic cup. Mortality and development were reported every day until the time for adult emergence. Larvae were considered dead if they did not react to mechanical stimulation. Deaths attributed to injection trauma were not considered. Controls were obtained by the inoculation of an equal volume of TC-100 medium and by no inoculation.

2.3. Infected cell countings

To verify the percentage of infected cells during the time of infection and the structural alterations promoted by viruses in hemocytes, insects were injected with 20 μ l of viral inoculum at the highest concentration (2 x 10⁸ PFU/ml), as described. Hemolymph samples were collected in anticoagulant buffer (98 mM NaOH, 186 mM NaCl, 1.7 mM EDTA, 41 mM citric acid, pH 4.5) [23], observed directly in a fluorescence microscopy under the blue excitation filter, and by DIC in an Axiophot Zeiss microscope. For each time

after infection (3, 24, 48, 72, 96 and 120 h), at least seven hundred cells were counted in two sub-samples obtained from a mix of hemolymph collected from ten insects.

2.4. Transmission electron microscopy

To observe the ultrastructural alterations induced in hemocytes by viral infection, hemolymph samples were collected from insects injected with 20 µl of viral inoculum (2 x 10^8 PFU/ml) after 12, 24, 48, 72, 96 and 120 h p.i. Samples were fixed for 30 minutes (2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.4 with 5% sucrose), centrifuged at 750 g for 5 minutes, the pellet washed in the same buffer, postfixed (1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferricyanide in the same buffer), contrasted in block with 0.5% uranyl acetate, dehydrated in acetone, and embedded in Spurr's resin. The ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate/lead citrate and observed in a TEM JEOL 100C and JEOL 1011 at 80 kV.

2.5. Hemocyte identification

A. gemmatalis larval hemocyte-types were identified by structural and ultrastructural characteristics described previously [32, 34].

3. Results

3.1. Bioassays

Increasing doses of vHSGFP resulted in increasing larval mortality, decreasing larval pupation, and decreasing adult emergence. The dose of 4 x 10^4 PFU/larva resulted in 21% death, while 79% of individuals formed pupae and 53% from these emerged as moths (Fig. 1A). For 4 x 10^5 PFU/larva, larval mortality was around 53%, and 47% of pupae were formed, but none of them emerged as adults (Fig. 1B). For 4 x 10^6 PFU/larva, 95% of individuals died. One pupa was formed (5%), but it did not emerge as an adult (Fig. 1C). For vHSGFP/P35del, the same tendency was observed, but in comparison to the previous system, the viral effects were milder. No larvae injected with 4 x 10^4 PFU died. All of them became pupa, and 70% emerged as adults. (Fig. 2A). For 4 x 10^5 PFU/larva, larval mortality was around 22%, and 78% of individuals formed pupa, however only one (5.3%) resulted in adult (Fig. 2B). For 4 x 10^6 PFU/larva, 60% of individuals died, 40% became pupa, but none emerged (Fig. 2C).

For the vHSGFP highest dose, some liquefaction of dead larvae was observed, but the majority of them and for lower doses, there was melanization of cadavers (not shown). Some pupae were abnormal for larvae inoculated with either vHSGFP (4×10^4 and 4×10^5 PFU/larva) or vHSGFP/P35del (all doses), especially for the latter. Despite molting inhibition, the larva body hypertrophied in a way that the normal proportions between the body and the head were lost. Later, the body reduced in size, melanized and hardened. Prolegs and head persisted (not shown). None of the abnormal pupae emerged.

3.2. Hemocytes identification

Six hemocyte types were recognized in *A. gemmatalis* larvae based on structural and ultrastructural characteristics previously described [32, 34]. They were prohemocytes (pr), plasmatocytes (pl), granular hemocytes type 1 (gh1), granular hemocytes type 2 (gh2), oenocytoids (oe), and spherulocytes (sph).

3.3. DIC, fluorescence microscopy and cell counting

Fluorescence occurred preferentially for gh1 and pl for all times post-infection studied, generally. These cells were promptly recognized because of their characteristic shapes. Gh1 are round, rich in thin surface projections (filopodia) and spread symmetrically, maintaining a circular shape. Pl are somewhat elongated or fusiform, and spread in the slide maintaining this asymmetrical shape.

For both systems, GFP expression was observed from 3 h p.i., (around 3%) (Fig. 3). The amount of fluorescent cells remained similar for both viruses until 48 h p.i. (8-12%). After 72 h p.i., the increasing tendency continued for vHSGFP, which reached 40% of fluorescence at 120 h p.i. For vHSGFP/P35del, a plateau (9% of cells fluorescent) was established between 24 and 72 h p.i. Then, the number of fluorescent cells decreased, reaching values around 0.01% after 120 h p.i. (Fig. 3).

For vHSGFP/P35del, apoptotic cells, recognized because of their fragmentation into apoptotic bodies, were eventually found at 12 h p.i., more frequently found at 24 and 48 h p.i., becoming rare after 96 h p.i. (Fig. 4A - D). After 48 h p.i., there was some polyhedra assembly for vHSGFP (Figs. 4E, F), which did not occur for vHSGFP/P35del. After 96 h p.i., the number of gh2 slightly increased for both systems. These cells were intact and had an extremely low rate of fluorescence (Figs. 4G, H). Infected sph were also rarely found (not shown).

3.4. Transmission electron microscopy

At 12 h p.i., the major part of the hemocytes was intact for both systems. For vHSGFP rare cells, especially pl and gh1, presented viral morphogenesis signals as nuclear hypertrophy, nucleocapsids assembling, envelopment, nuclear envelope folding with BVs protrusion through the cytoplasm, and, eventually, fibrillar aggregates accumulation (Figs. 5A-D). After 48 h p.i., some polyhedra assembly was visualized, but until late times post infection (120 h p.i.), the number of cells presenting polyhedra was very low (Fig. 5E-F). At late times post infection (72 - 120 h p.i.), a higher number of hemocytes displayed the events described above. Fibrillar aggregates were larger and nuclear envelope folds were more extensive, sometimes forming organized arrays of tubes throughout the cytoplasm (Fig. 5C). Pr, pl, gh1, oe and, eventually, sph were shown to be susceptible to vHSGFP.

For vHSGFP/P35del, after 12 h p.i., some nuclear hypertrophy and nuclear envelope folding also occurred, but, in some cases, these events were associated with surface blebbing, chromatin condensation and fragmentation into apoptotic bodies (Figs. 6A-F). Many apoptotic cells presented segregation of organelles in some of the apoptotic bodies formed (Figs. 6E, F). Despite chromatin condensation occurrence, apoptotic body formation for sph was not observed (Fig. 6C). Exocytosis of gh1 unstructured granules contents was observed in association to filopodia emission directed to an apoptotic oe (Fig. 6D). Apoptosis events became more frequent at 24 and 48 h p.i., when some nucleocapsid assembly and envelopment were also found, despite cell death (Fig. 6B). Apoptosis and
replication events decreased after 96 h p.i., and there were no polyhedra assembling. Pl, gh1, pr, oe and, eventually, sph were shown to be susceptible to vHSGFP/P35del, especially the two first cell types, as happened for vHSGFP.

Necrosis of infected cells and phagocytic activity of pl and gh1 were observed for both systems (Figs. 7A-F). Gh1 were shown to emit thin and long projections, which could be directed to small cell fragments, forming multiple phagosomes simultaneously (Figs. 7A-B), or to be directed to entire cells or cell fragments of large dimensions (Fig. 7C). Pl were shown to engulf entire cells more frequently than gh1 (Fig. 7E).

4. Discussion

In this work, we have shown that AcMNPV lacking the *p35* gene causes apoptosis in *A. gemmatalis* hemocytes. However, the intensity and speed of death were different from that induced in a cell line derived from *A. gemmatalis*. In hemocytes, apoptosis occurred between 24 and 72 h p.i. in a low frequency with the occurrence of some nucleocapsids assembling and enveloping, in contrast to the rapid (until 16 h) and massive apoptosis without progeny production induced in UFL-AG-286 cells [33]. One possible reason for this discrepancy could be the difference between the two cellular models relative to cell susceptibility to AcMNPV, despite UFL-AG-286 cells being derived from the same organism, which suggests tissue-specific susceptibility.

UFL-AG-286 cells are permissive to AcMNPV [31]. However, we have demonstrated that between 24 and 48 h p.i., only 8% of hemocytes were infected by vHSGFP and vHSGFP/P35del, and after 120 h p.i. vHSGFP reaches only 40% of infection

125

in hemocytes, which indicates a low rate of infection in these cells, similar to what was found for the same recombinant in *S. frugiperda* hemocytes [6]. Another explanation could be the turnover of hemocytes by cell division in circulation and in hemopoetic organs, added to putative factors that can neutralize virions, which does not occur in vitro. However, vApAg, which is derived from AgMNPV, has been shown to induce a more intense apoptosis in *A. gemmatalis* hemocytes between 24 and 72 h p.i., in very similar experimental conditions (Silveira et al., submitted). This reinforces the hypothesis that a less intense apoptosis induction by vHSGFP/P35del is related to the reduced susceptibility of *A. gemmatalis* hemocytes to AcMNPV.

A. gemmatalis larvae have been shown to be semi-permissive or permissive to highdoses of AcMNPV by intrahaemocoelic infection, since 95% of larval mortality was obtained with the injection of a dose higher than 4×10^5 PFU. In *Trichoplusia ni*, this virus induces 95% of death with a injection of less than 1 PFU [6], and AgMNPV causes 50% of death in *A. gemmatalis* with 0.1 PFU (Silveira et al., submitted).

The lack of the p35 gene further reduced the infectivity level, with a maximum larval mortality of 60%, obtained with a 10 times higher dose than the one used for vHSGFP, for a similar mortality (53%). This probably can be related to a dropping in BV production and consequent reduction in systemic virus spread. For other systems, apoptosis can more drastically reduce infectivity in vivo. In *S. frugiperda* larvae, 1,000 fold more BV of AcMNPV $p35^{-}$ and 25 fold more PIBs are required to reach an LC₅₀ in comparison to the wild-type or revertant viruses [11, 12].

Besides mortality, another deleterious effect attributed to viral infection, mainly caused by vHSGFP/P35del, was the production of abnormal pupae. They were derived

from larvae that survived to infection and attempted to form pupae despite incomplete molting. This probably derives from the successful expression of the enzyme EGT (ecdisteroyd UDP- glucosyltransferase), which inhibits molting by inactivating the ecdysone hormone [25]. This anomalous phenotype was reported before in *S. frugiperda* larvae infected by vHSGFP/P35del, which presented decreasing tissue fluorescence during the time of infection [8]. This effect suggests a milder infection that does not result in larval death, but that was sufficient to impair the normal development.

Insect hemocytes are a complex of cell types that circulate in hemolymph. They are involved in defense responses such as wound repair, phagocytosis, nodulation, encapsulation, coagulation, synthesis and secretion of immunological factors [22]. Hemolymph has been shown to contribute to baculovirus dissemination in permissive hosts [1, 16, 39]. However, hemocyte resistance, apoptosis or an effective cellular immune response against infection, like melanization of tracheal foci, may restrict the replication of NPVs in specific virus-host combinations [6, 8, 36- 38, 40].

We have found that pr, pl, gh1 and oe from *A. gemmatalis* presented signs of infection, but sph and gh2 appeared to be more resistant to AcMNPV infection. Gh2 have also shown some resistance to AgMNPV and vApAg [32, Silveira *et al.* submitted]. The resistance of sph to AcMNPV may be one of the factors that limit the permissiveness of *A. gemmatalis* to AcMNPV. Kislev et al. [20] showed NPV replication events in hemocytes from *Spodoptera litorallis* after oral infection, intrahaemocoelic injection of polyhedra and of free ODVs. For the three modes of infection, Pl were shown to be the major cell type for NPV replication. Cells classified as adipohemocytes at that time, which presented clear characteristics of sph, also did not become infected in these experiments.

Phagocytic activity of pl and gh1 was frequently observed against infected cells and apoptotic bodies, which has been observed before for insects infected with AgMNPV and vApAg [32, Silveira *et al.* submitted]. Pl and gh1 are reported as the only Lepidoptera larval hemocytes capable of adhering to foreign surfaces, important for phagocytosis, nodulation and encapsulation [22].

A recurrent event found for *A. gemmatalis* hemocytes infected by baculoviruses is the necrosis of infected cells, which generally presented mature virogenic stroma. Together, phagocytosis and necrosis of infected hemocytes are clues for a putative recognition of these virus-infected cells as altered self, and the triggering of cytotoxic responses against them, besides apoptosis [32].

To date, apoptosis is the best-described anti-viral response in insects [7]. Apoptosis reduces baculovirus replication *in vitro*, and AcMNPV mutants lacking the *p35* gene have reduced infectivity in *S. frugiperda* larvae if compared to the wild-type virus [9]. More recently, apoptosis *in vivo* induced by baculovirus infection was demonstrated. Apoptosis has shown to be correlated with reduced viral propagation of AcMNPV in a non-susceptible host, *S. litura* [40] and with the reduced infectivity of vHSGFP/P35del in *S. frugiperda* [8].

In this work, it was shown that an AcMNPV p35⁻ virus induces apoptosis in vivo in larval hemocytes from a semi-permissive host upon intrahaemocoelic injection with some reduction in infectivity. This corroborates the current belief that apoptosis is an important element in insect immunity against viral infections. Other defense weapons demonstrated here were phagocytosis and necrosis of infected cells, which requires rigorous investigation for a better understanding about the anti-viral immunity in insects, as well the differentiated susceptibility of the different hemocyte-types to baculovirus infection.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. M. E. B. Castro (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) and Dr. F. Moscardi (Embrapa Soja) for supplying *Anticarsia gemmatalis* eggs and larvae. We also thank Dr. R. J. Clem (Kansas State University) for supplying vHSGFP and vHSGFP/P35del viruses, and Dr. J. Maruniak (University of Florida) for grammatical revision. This work was supported by CAPES, CNPq, FAP/DF, FINATEC and PRONEX.

References

- J.W. Barrett, A.J. Brownwright, M.J. Primavera, A. Retnakaran, S.R. Palli, Concomitant primary infection of the midgut epithelial cells and the hemocytes of *Trichoplusia ni* by *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus, Tissue Cell 30 (1998) 602-616.
- [2] B.C. Black, L.A. Brennan, P.M. Dierks, I.E. Gard, in: L.K. Miller (Ed.), The Baculoviruses, Plenum Press, New York, 1997, p.p. 237-266.
- [3] G.W. Blissard, B. Black, N. Crook, B.A, Keddie, R. Possee, G. Rohrmann, D. Theilmann, L. Volkman, in: M. H. V. Van Regenmortel, C. M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle, R.B. Wickner (Eds.), Virus Taxonomy: Seventh report of the International Comittee on Taxonomy of Viruses, Academic Press, San Diego, 2000, pp. 195-202.
- [4] M.E.B. Castro, B.M. Ribeiro, Production of viral progeny in insect cells undergoing apoptosis induced by a mutant *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus, Microbiol. Res. 156 (2001) 369-376.
- [5] N. Chejanovsky, E. Gershburg, The wild-type Autographa californica nuclear polyhedrosis virus induces apoptosis of Spodoptera littoralis cells, Virology 209 (1995) 519-525.
- [6] T.E. Clarke, R.J. Clem, Lack of involvement of haemocytes in the establishment and spread of infection in *Spodoptera frugiperda* larvae infected with the baculovirus *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus by intrahaemocolic injection, J. Gen. Virol. 83 (2002) 1565-1572.

- [7] T.E. Clarke, R.J. Clem, Insect defenses against virus infection: the role of apoptosis, Int. Rev. Immunol. 22 (2003) 401-424.
- [8] T.E. Clarke, R.J. Clem, In vivo induction of apoptosis correlating with reduced infectivity during baculovirus infection, J. Virol. 77 (2003) 2227-2232.
- [9] R.J. Clem, Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad and the ugly, Cell Death Differ. 8 (2001) 137-143.
- [10] R.J. Clem, M. Fechheimer, L.K. Miller, Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells, Science 254 (1991) 1388-1390.
- [11] R.J. Clem, L.K. Miller, Apoptosis reduces both the in vitro replication and the in vivo infectivity of a baculovirus, J. Virol. 67 (1993) 3730-3738.
- [12] R.J. Clem, M. Robson, L.K. Miller, Influence of infection route on the infectivity of baculovirus mutants lacking the apoptosis-inhibiting gene *p35* and the adjacent gene *p94*, J. Virol. 68 (1994) 6759-6762.
- [13] X. Dai, X. Shi, Y. Pang, D. Su, Prevention of baculovirus-induced apoptosis of BTI-Tn-5B1-4 (Hi5) cells by the *p35* gene of *Trichoplusia ni* multicapsid nucleopolyhedrovirus, J. Gen. Virol. 80 (1999) 1841-1845.
- [14] Q. Du, D. Lehavi, O. Faktor, Y. Qi, N. Chejanovsky, Isolation of an apoptosis suppressor gene of the *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus, J. Virol., 73 (1999) 1278-1285.
- [15] R.R. Granados, L. Guoxun, A.C.G. Derksen, K.A. McKenna, 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 (1994) 260-266.

- [16] R.R. Granados, K.A. Lawler, *In vivo* pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection, Virology 108 (1981) 297-308.
- [17] G.L. Greene, N.C. Leppla, W.A. Dickerson, Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium, J. Econ. Entomol. 69 (1976) 487-488.
- [18] D.L. Jarvis, in: L.K. Miller (Ed.), The Baculoviruses, Plenum Press, New York, 1997, pp. 237-266.
- [19] S.G. Kamita, K. Majima, S. Maeda, Identification and characterization of the p35 gene of the *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus that prevents virus-induced apoptosis, J. Virol. 67 (1993) 455-463.
- [20] N. Kislev, I. Harpaz, A. Zelcer, Electron-microscopic studies on haemocytes of the Egyptian Cottonworm, *Spodoptera litorallis* (Boisduval) Infected with a Nuclear-Polyhedrosis virus, as compared to noninfected hemocytes. II. Virus-infected hemocytes, J. Invertebr. Pathol. 14 (1969) 245-257.
- [21] A.H. Koyama, T. Fukumori, M. Fujita, H. Irie, A. Adachi, Physiological significance of apoptosis in animal virus infection, Microbes Infect. 2 (2000) 1111-1117.
- [22] M.D. Lavine, M.R. Strand, Insect hemocytes and their role in immunity, Insect Biochem. Mol. Biol. 32 (2002) 1295-1309.
- [23] G.P. Mead, N.A. Ratcliffe, L.R. Renwrantz, The separation of insect hemocyte types on Percoll gradients: methodology and problems, J. Insect Physiol., 32 (1986) 167-177.
- [24] F. Moscardi, Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidoptera, Annu. Rev. Entomol. 44 (1999) 257-289.

- [25] D.R. O'Reilly, L.K. Miller, A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase, Science 245 (1989) 1110-1112.
- [26] D.R. O'Reilly, L.K. Miller, V.A. Luckow (Eds.), Baculovirus Expression Vectors. A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, New York, 1992.
- [27] S.R Palli, G.F. Caputo, S.S. Sohi, A.J. Brownright, T.R. Ladd, B.J. Cook, M. Primavera, B.M. Arif, A. Retnakaran, CfMNPV blocks AcMNPV-induced apoptosis in a continuous midgut cell line, Virology 222 (1996) 201-213.
- [28] Y. Pang, J.X Yu, L.H. Wang, X.H. Hu, W.D. Bao, G. Li, C. Chen, H. Han, S.N. Hu, H.M. Yang, Sequence analysis of the Spopdoptera litura multicapsid nucleopolyhedrovirus genome, Virology 287 (2001) 391-404.
- [29] S. Sahdev, T.K. Taneja, M. Mohan, N.K. Sah, A.K. Khar, S.E. Hasnain, M. Athar, Baculoviral p35 inhibits oxidant-induced activation of mitochondrial apoptotic pathway, Biochem. Biophys. Res. Comm. 307 (2003) 483-490.
- [30] P.J. Sieburth, J.E. Maruniak, Growth characteristics of a continuous line from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), In Vitro Cell Dev. Biol., 24 (1988) 195-198.
- [31] P.J. Sieburth, J.E. Maruniak, Susceptibility of an established cell line of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) to three nuclear polyhedrosis viruses, J. Invertebr. Pathol. 52 (1988) 453-458.
- [32] E.B.Silveira, B.A. Cordeiro, B.M. Ribeiro, S.N. Báo, Morphological characterization of *Anticarsia gemmatalis* M nucleopolyhedrovirus infection in haemocytes from its natural larval host, the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera:Noctuidae), Tissue Cell 36 (2004) 171-180.

- [33] E.B. Silveira, B.M. Ribeiro, S.N. Báo, Morphological studies of apoptosis in insect cells infected with vApAg, an *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus mutant, J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 31 (1999) 543-554.
- [34] E.B. Silveira, B.M. Ribeiro, S.N. Báo, Characterization of larval haemocytes from the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 35 (2003) 129-139.
- [35] J.G. Teodoro, P.E. Branton, Regulation of apoptosis by viral gene products, J. Virol. 71 (1997) 1739-1746.
- [36] D. Trudeau, J.O. Washburn, L.E. Volkman, Central role of haemocytes in Autographa californica M nucleopolyhedrosis pathogenesis in Heliothis virescens and Helicoverpa zea, J. Virol. 75 (2001) 996-1003.
- [37] J.O. Washburn, E.J. Haas-Stapleton, F.F. Tan, N.E. Beckage, L.E. Volkman, Coinfection of *Manduca sexta* larvae with polydnavirus from *Cotesia congregata* increases susceptibility to fatal infection by *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus, J. Insect Physiol. 46 (2000) 179-190.
- [38] J.O. Washburn, B.A. Kirkpatrick, L.E. Volkman, Insect protection against viruses. Nature 383 (1996) 767.
- [39] J.O. Washburn, B.A. Kirkpatrick, L.E. Volkman, Comparative pathogenesis of Autographa californica M nuclear polyhedrosis virus in larvae of *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens*, Virology 209 (1995) 561-568.
- [40] P. Zhang, K. Yang, X. Daí, Y. Pang, D. Su, Infection of wild-type Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus induces in vivo apoptosis of Spodoptera litura larvae, J. Gen. Virol. 83 (2002) 3003-3011.

[41] P. Zhang , B. Yang, X.J. Dai, Y. Pang, J. Zhong, D.M. Su, Apoptosis of Spodoptera litura cells induced by AcMNPV ie-1 gene, Acta Biochim. Biophys. Sin. 34 (2002) 707-711.







Fig. 1. Bioassay composition over time of infection for larvae infected with different doses of vHSGFP. A - 4×10^4 PFU. B - 4×10^5 PFU. C - 4×10^6 PFU. n = 20 for each treatment.







Fig. 2. Bioassay composition over time of infection for larvae infected with different doses of vHSGFP/P35del. A - 4 x 10^4 PFU. B - 4 x 10^5 PFU. C - 4 x 10^6 PFU. n = 20 for each treatment.



Fig. 3. Percentage of *egfp*-expressing cells over time of infection with vHSGFP and vHSGFP/P35del. Larvae were injected with 4 x 10^6 PFU and cohorts of ten insects were sacrificed for hemolymph collection at each time. Values are plotted as means ± SD.



Fig. 4. DIC and fluorescence microscopy micrographs of *A. gemmatalis* hemocytes infected by vHSGFP/P35del (A-D) and vHSGFP (E-H). A - D – 24 h p.i. Arrows indicate apoptotic bodies, arrowheads indicate gh2. E - F – 120 h p.i. Arrows indicate cells presenting polyhedra. G – H - 120 h p.i. Arrow indicate gh1, small arrowheads indicate gh2. Bars represent 20 μ m.



Fig. 5. TEM micrographs of *A. gemmatalis* hemocytes infected by vHSGFP. A – A putative plasmatocyte, presenting nucleocapsids assembling and initial enveloping (large arrowhead). Note some groups of long immature nucleocapsids (small arrowhead). N – nucleus. B – A putative plasmatocyte presenting nucleocapsids assembling and enveloping (small arrowhead), a nuclear fibrillar aggregate (*) associated to a membranous profile (arrow) and nuclear envelope folding (large arrowheads). N – nucleus. C – Putative granular hemocyte type 1 presenting a peculiar profile of the nuclear envelope that protrudes as organized tubes throughout the cytoplasm (large arrowheads). N – nucleus; (*) fibrillar aggregate; small arrowheads – nucleocapsids. D – Formation of transport vesicles containing nucleocapsids (arrowheads). N – nucleus; C – cytoplasm. E – A putative plasmatocyte, presenting polyhedra assembling (*). N – nucleus; C – cytoplasm. F – A necrotic cell with the nucleus filled with polyhedra (*), fibrillar aggregates (large arrowheads), and membranous profiles (small arrowheads). Bars represent 1.5 µm.



Fig. 6. TEM micrographs of *A. gemmatalis* hemocytes infected by vHSGFP/P35del. A – A putative granular hemocyte type 1 presenting surface blebbing (arrowheads). N – nucleus, m – mitochondria, g – Golgi complex. B – A plasmatocyte presenting nucleocapsids enveloping (small arrowheads) and some convolution of the nuclear envelope (large arrowheads). N – nucleus. C – A spherulocyte presenting chromatin condensation (arrowheads). S – spherule. D – An oenocitoyd presenting chromatin condensation. Large arrowheads indicate the nucleus. A gh1 (g) liberated the contents of an unstructured granule (small arrowheads) over the oe surface. E – A putative apoptotic plasmatocyte. The nucleus (N) displays some patches of condensed chromatin (small arrowheads). Organelles are segregated in some apoptotic bodies (large arrowheads). F – A putative apoptotic plasmatocyte. N – nucleus. Bars represent 2 μ m.



Fig. 7. Phagocytic activity and infected cell necrosis of *A. gemmatalis* hemocytes infected by vHSGFP and vHSGFP/P35del. TEM micrographs. A, B - vHSGFP. A granular hemocyte type 1 (g) emitted long and thin projections to engulf remnants of an infected-cell. Small arrowheads indicate BVs. N- nucleus; m - mitochondria; p - phagossomes. C - vHSGFP/P35del. An apoptotic body (a) was surrounded by gh1 (g) phylopodia (small arrowheads). N - gh1 nucleus; nu - nuclear remnants in the apoptotic body; s - structured granule. D - vHSGFP/P35del. A gh1 presenting phagosomes containing cell remnants (p). Arrowheads indicate a phagosome presenting a relatively intact apoptotic body. N- nucleus. E - vHSGFP/P35del. A plasmatocyte that had engulfed an entire cell. Arrowheads indicate phagosome limits. EN - engulfed cell nucleus; PN - plasmatocyte nucleus. F - vHSGFP. A necrotic cell presenting a mature virogenic stroma (vs). Arrowheads indicate nucleocapsids. Bars represent 1.5 μ m.

O conjunto de dados obtidos neste trabalho e a sua análise com base na bibliografia existente possibilitaram as seguintes conclusões:

• Larvas de *Anticarsia gemmatalis* possuem seis tipos de hemócitos ultraestruturalmente distintos, apresentando semelhança geral com o conjunto de hemócitos de outros lepidópteros, inclusive com relação ao número total destas células (CTH) e às proporções dos diferentes tipos celulares (CDH) ao longo do desenvolvimento larval;

• Esferulócitos possuem atividade de fenoloxidase;

• A infectividade de AcMNPV em larvas de *A. gemmatalis* por injeção intrahemocélica de BV é bem menor que aquela de AgMNPV, sendo necessária uma dose da ordem de 10⁵ vezes maior para causar uma mortalide próxima a 100% em um bioensaio. Desta forma, *A. gemmatalis* pode ser considerado um hospedeiro semi-permissivo a AcMNPV;

• Todos os tipos de hemócitos de *A. gemmatalis* são susceptíveis à infecção intrahemocélica por BV de AgMNPV, vApAg, vHSGFP e vHSGFP/P35del, porém granulócitos tipo 2 mostram-se bastante tolerantes à infecção e replicação em comparação com os demais tipos celulares. Esferulócitos mostram-se especialmente tolerantes aos vírus derivados de AcMNPV, podendo constituir um dos fatores que colaboram para a baixa infectividade destes vírus em *A. gemmatalis*. Plasmatócitos e granulócitos tipo 1 são mais susceptíveis, sendo que o último tipo celular aparenta permitir uma grande produção de BVs de AgMNPV;

• A seqüência de eventos da morfogênese de AgMNPV e de vApAg em hemócitos é semelhante ao que já foi descrito para estes mesmos vírus em células UFL-AG-286, bem como para AgMNPV em intestino médio e traqueócitos de *A. gemmatalis*;

• Granulócitos tipo 1 e plasmatócitos são células fagocíticas, capazes de engolfar células inteiras, fragmentos celulares, corpos apoptóticos, BV e poliedros quando da infecção por baculovírus;

• Hemócitos infectados por baculovírus, apresentando sinais de montagem de nucleocapsídeos, parecem ser alvos de uma resposta citotóxica que causa ruptura da membrana plasmática e morte por necrose;

• É possível que vírions presentes em fagossomos tenham a capacidade de escapar à digestão, com potencial para infectar a célula fagocítica;

• A inativação do gene *iap3* de AgMNPV resulta na indução de apoptose em hemócitos larvais de *A. gemmatalis* infectados, causando aumento do tempo de morte das larvas em condições de laboratório. Apesar da ocorrência de morte celular, observa-se a montagem de BV e OV, da mesma forma que observado previamente em células UFL-AG-286 infectadas pelo vírus vApAg;

• Ao contrário do observado para células UFL-AG-286, não foi possível a detecção de fragmentos de 200 pares de bases ou múltiplos em gel de agarose para hemócitos infectados por vApAg, provavelmente em virtude de uma menor proporção de células apoptóticas na hemolinfa e pela ocorrência de fagocitose de células apoptóticas neste sistema;

147

• A deleção do gene *p35* de AcMNPV resulta na indução de apoptose em hemócitos larvais de *A. gemmatalis*, causando redução do número de hemócitos infectados em tempos tardios de infecção e redução na infectividade de larvas em condições de laboratório. Ao contrário do que foi observado previamente em células UFL-AG-286 infectadas pelo vírus vP35del, detectou-se eventualmente a montagem de BV. Outra diferença é que a ocorrência de apoptose é mais lenta e menos intensa em hemócitos, provavelmente devido à menor permissividade destas células a AcMNPV em comparação com células UFL-AG-286 e à presença de possíveis fatores antivirais *in vivo*;

• Insetos mortos pela infecção com vHSGFP e vHSGFP/P35del não são liquefeitos em sua maioria. Além de causar mortalidade, a infecção por ambos os vírus, principalmente por vHSGFP/P35del, provoca a formação de pupas anômalas;

Diante da variedade de estratégias apresentadas por diferentes vírus animais que os fazem capazes de interferir na resposta apoptótica de 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. No caso dos insetos, a apoptose tem papel importante na imunidade contra vírus, uma vez que mecanismos de imunidade adquirida estão ausentes nos invertebrados.

Algumas questões instigantes e hipóteses levantadas neste trabalho são possíveis alvos de pesquisas futuras, com potencial para esclarecer aspectos da relação patógenohospedeiro, bem como levar à otimização dos baculovírus como agentes de controle biológico e vetores de expressão de genes heterólogos.

Granulócitos tipo 1 parecem ser especialmente susceptíveis à infecção e replicação de baculovírus, seguidos dos plasmatócitos. É possível que, em virtude de serem fagocíticos, granulócitos tipo 1 e plasmatócitos possuam maior número de receptores para adesão e entrada dos vírus. Por serem células também especializadas em síntese e secreção, granulócitos tipo 1 podem possuir uma "maquinaria celular" mais eficiente para a replicação viral do que a dos outros tipos de hemócitos. Granulócitos tipo 2 e esferulócitos, os quais aparentam ser mais resistentes a baculovírus, também são células secretoras, porém não apresentam atividade fagocítica, o que sinaliza para uma importância especial dos mecanismos de adesão e entrada no vírus na determinação da maior susceptibilidade de plasmatócitos e granulócitos tipo 1.

Tendo em vista a grande susceptibilidade de granulócitos tipo 1, uma linhagem celular derivada deste tipo de hemócito pode ser capaz de permitir maior produção de proteínas heterólogas do que as linhagens disponíveis na atualidade, um valioso instrumento biotecnológico em potencial.

Um possível mecanismo de escape à digestão lisossomal por parte de vírus derivados de corpos de oclusão poderia contribuir para o estabelecimento da infecção sistêmica, uma vez que é frequente a ocorrência de fagocitose de poliedros por parte de plasmatócitos e granulócitos tipo 1. Este escape pode ser promovido pela proteína de fusão presente no envelope do ODV, que permite a sua entrada nas células do epitélio intestinal, ou por alguma outra proteína capaz de promover a fusão do envelope viral com a membrana lisossomal e liberação dos nucleocapsídeos no citoplasma.

A investigação do processo infeccioso de baculovírus mutantes indutores de apoptose utilizando a via natural de infecção – ingestão de corpos de oclusão – é fundamental para uma avaliação mais precisa do impacto da apoptose na infecção por baculovírus. Além da hemolinfa, outros tecidos devem ser estudados para verificar possíveis diferenças de susceptibilidade à replicação viral e à indução de apoptose.

O estudo da possível indução de necrose em hemócitos infectados, bem como do padrão de expressão gênica de hemócitos quando da infecção por baculovírus pode produzir resultados esclarecedores à respeito de outros mecanismos de imunidade de insetos contra vírus além da apoptose.

- ADAMS, J. R.; GOODWIN, R. H. & WILCOX, T. A. Electron microscopic investigations on invasion and replication of insect baculoviruses *in vivo* and *in vitro*. <u>Biol. Cell.</u>, 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. <u>J. Virol.</u>, v. 70, p. 4858-4863, 1996.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. & WALTER, P. Molecular biology of the cell. New York: Garland Science, 2002.
- ALLEN, G. E. & KNELL, J. D. A nuclear polyhedrosis virus of *Anticarsia gemmatalis*. I. Ultrastructure, replication, and pathogenicity. <u>Fla. Entomol.</u>, 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.
- ANDRADE, F. G.; NEGREIRO, M. C. C.; GREGÓRIO, E. A.; MOSCARDI, F. & FALLEIROS, A. M. F. Hemocytes of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae: morphological and quantitative studies. <u>Acta Microscopica</u>, v. 12, p. 59-63, 2003.
- ASHE, P. C. & BERRY, M. D. Apoptotic signaling cascades. <u>Prog. NeuroPsyco.</u> <u>Pharmacol. Biol. Psyc.</u>, v. 27, p. 199-214, 2003.
- 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. <u>Protoplasma</u>, 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. <u>Virology</u>, v. 202, p. 586-605, 1994.

- BARRETT, J. W.; BROWNWRIGHT, 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. <u>Tissue Cell</u>, v. 30, p. 602-616, 1998b.
- BATISTA FILHO, A.; ALVES, S. B.; AUGUSTO, N. T.; PEREIRA, R. M. & ALVES, L.
 F. A. Stability and persistence of two formulations containing *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrovirus (AgMNPV). <u>Neotrop. Entomol.</u>, v. 30, p. 411-416, 2001.
- 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. <u>Proc. Natl. Acad.</u> <u>Sci. USA</u>, 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.
 <u>J. Virol.</u>, v. 70, p. 6251-6259, 1996.
- BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. Mol.Immunol., v. 40, p. 845-859, 2004.
- 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 enconding a polypeptide with cys/his sequence motifs. <u>J.</u> <u>Virol.</u>, v. 68, p. 2521-2528, 1994.
- BLACK, B. C.; BRENNAN, L. A.; DIERKS, P.M. & GARD, I. E. Commercialization of baculoviral inseticides. In: MILLER, L. K. The Baculoviruses. New York: Plenum Press, 1997. p. 237-266.
- BLISSARD, G. W. Baculovirus-insect cell interactions. Cytotechnology, v. 20, p. 73-93, 1996.

- ______.; BLACK, B.; CROOK, N.; KEDDIE, B. A.; POSSEE, R.; ROHRMANN, G.; THEILMANN, D. & VOLKMAN, L. Family Baculoviridae. In: VAN REGENMORTEL, 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. Virus Taxonomy: Seventh report of the International Comittee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, 2000, p. 195-202.
- BOATRIGHT, K. M. & SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. <u>Curr. Opin.</u> <u>Cell Biol.</u>, v. 15, p. 725-731, 2003.
- 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 inhibitior, p35. J. Biol. Chem., v. 273, p. 28852-28859, 1998.
- BRÉHELIN, M. & ZACHARY, D. Insect haemocytes: a new classification to rule out the controversy. In: _____. Immunity in Invertebrates: Cells, Molecules and Defense Reactions. Berlin: Springer-Verlag, p. 36-48, 1986.
- BULET, P.; STÖCKLIN, R. & MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. <u>Immunol. Rev.</u>, v. 198, p. 169-184, 2004.
- 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. <u>Science</u>, v. 269, p. 1885-1888, 1995.
- BUTT, T. M. & SHIELDS, K. S. The structure and behaviour of Gypsy Moth (*Lymantria dispar*) hemocytes. J. Invertebr. Pathol., v. 68, p. 1-14, 1996.
- CAO, G. L.; XUE, R. Y.; ZHU, Y. X.; WEI, Y. H. & GONG, C. L. Cloning and nucleotide sequence analysis of the p35 gene of Hyphantria cunea nucleopolyhedrovirus. <u>Acta</u> <u>Entomol. Sin.</u>, v. 45, p. 711-716, 2002.
- 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.

- _____.; HUDSON, J. S. & BARNETT, O. W. The infectivity of a nuclear polyhedrosis virus of the velvetbean caterpillar for eight noctuid hosts. J. Invertebr. Pathol., v.33, p.211-216, 1979.
- CARPES, M. P. Apoptose e Baculovírus: gene *iap-3* e análise do mutante vApAg. Brasília,
 2004. Dissertação (Mestrado em BiologiaMolecular) Depto. Biologia Celular,
 Universiade de Brasília.
- _____.; 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. <u>Virus Genes</u>, no prelo.
- CARTIER, J. L.; HERSHBERGER, P. A. & FRIESEN, P. D. Suppression of apoptosis in insect cells stably transfected with baculovirus *p35*: Dominant interference by Nterminal sequences p35¹⁻⁷⁶. J. Virol., v. 68, p. 7728-7737, 1994.
- CASTRO, M. E. B. & RIBEIRO, B. M. Production of viral progenie in insect cells undergoing apoptosis induced by a mutant *Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus*. <u>Microbiol. Res.</u>, v. 156, p. 369-376, 2001.
- _____.; SOUZA, M. L.; ARAUJO, S. & BILIMORIA, S. Replication of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus in four lepidopteran cell lines. <u>J. Invertebr.</u> <u>Pathol.</u>, v. 69, p. 40-45, 1997.
- _____.; SOARES, E. F.; SIQUEIRA, C. B.; SOUZA, M. L. & RIBEIRO, B. M. Redução da patogenecidade de um mutante de AgMNPV por indução de apoptose em larvas de *Anticarsia gemmatalis*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n. 36. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002.16 p.
- CERENIUS, L. & SÖDERHÄLL, K. The prophenoloxidase activating-system in invertebrates. <u>Immunol Rev.</u>, v. 198, p. 116-126, 2004.
- CHANG, H. Y. & YANG, X. Proteases for cell suicide: Functions and regulation of caspases. <u>Microbiol. Mol. Biol. Rev.</u>, v. 64, p. 821-846, 2000.

- 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, N. & GERSHBURG, E. The wild-type Autographa californica nuclear polyhedrosis virus induces apoptosis of Spodoptera littoralis cells. <u>Virology</u>, v. 209, p. 519-525, 1995.
- CHERNYSH, S.; KIM, S. I.; BEKKER, G.; PLESKACH, V. A.; FILATOVA, N. A.; ANIKIN, V. B.; PLATONOV, V. G. & BULET, P. Antiviral and antitumor peptides from insects. <u>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</u>, v. 99, p. 12628-12632, 2002.
- 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. <u>Cell</u>, 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.
- CLARKE, T. E. & CLEM, R. J. Lack of involvement of haemocytes in the establishment and spread of infection in *Spodoptera frigiperda* larvae infected with the baculovirus *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus by intrahaemocoelic injection. J. Gen. <u>Virol.</u>, v. 83, p. 1565-1572, 2002.
- _____. & ____. In vivo induction of apoptosis correlating with reduced infectivity during baculovirus infection. J. Virol., v. 77, p. 2227-2232, 2003a.
- _____. & _____. Insect defenses against virus infection: the role of apoptosis. <u>Int. Rev.</u> <u>Immunol.</u>, v. 22, p. 401-424, 2003b.
- 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*. <u>Mol. Cell Biol.</u>, v. 14, p. 5212-5222, 1994b.

- _____.; FECHHEIMER, M. & MILLER, L. K. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. <u>Science</u>, v. 254, p. 1388-1390, 1991.
- .; 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.
- CORSO, I. C.; GAZZONI, D. L. & GATTI, I. M. Ocorrência de poliedrose nuclear em Anticarsia gemmatalis Hübner, 1818, na região sul do Brasil. <u>An. Soc. Entomol.</u> <u>Brasil</u>, v. 6, p. 312-314, 1977.
- CORY, J. S. & MYERS, J. H. The ecology and evolution of baculoviruses. <u>Annu. Rev.</u> <u>Ecol. Evol. Syst.</u>, v. 34, 239-272, 2003.
- CORY, S & ADAMS, J. M. Matters of life and death: programmed cell death at Cold Spring Harbor. <u>Biochim. Biophys. Acta</u>, 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, X.; SHI, X.; PANG, Y. & SU, D. Prevention of baculovirus induced apoptosis of BTI-Tn-5B1-4 (Hi5) cells by the *p35* gene of *Trichopluisa ni* multicapsid nucleopolyhedrovirus. J. Gen. Virol., v. 80, p. 1841-1845, 1999.
- DALMOLIN, C. C.; SANTOS, A. C. B.; RIBEIRO, Z. M. A.; RIBEIRO, B. M.; SOUZA,
 M. L. & CASTRO, M. E. B. Identificação do gene *dnapol* de *Anticarsia gematalis* nucleopolyhedrovirus. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n. 28. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002.14 p.
- DARMON, A. J.; NICHOLSON, D. W. & BLEACKLEY, R. C. Activation of the apoptotic protease CPP32 by citotoxic T-cell-derived granzyme B. <u>Nature</u>, v. 377, p. 446-448, 1995.
- DEBBAS, M. & WHITE, E. Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. <u>Genes Dev.</u>, v. 7, p. 546-554, 1993.
- DE LIMA, L., PINEDO, F. J. R., RIBEIRO, B. M., ZANOTTO, P. M. A & WOLFF, J. L. C. Identification, expression and phylogenetic analysis of the Anticarsia gemmatalis multicapsid nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) helicase gene. <u>Virus Genes</u>, v. 29, p. 345-352, 2004.

- DERKSEN, A. C. G. & GRANADOS, R. R. Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity. <u>Virology</u>, 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. <u>Nature</u>, 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. <u>EMBO J.</u>, v. 17, p. 2215-2223, 1998.
- DIMOPOULOS, G. Insect immunity and its implication in mosquito-malaria interactions. Cell. Microbiol., v. 5, p. 3-14, 2003.
- DU, Q.; LEHAVI, D.; FAKTOR, O.; QI, Y. & CHEJANOVSKY, N. Isolation of an apoptosis suppressor gene of the *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. <u>J. Virol.</u>, v. 73, p. 1278-1285, 1999.
- DUVALL, E. & WYLLIE, A. H. Death and the cell. <u>Immunol Today</u>, v. 7, p. 115-119, 1986.
- EKERT, P. G. & VAUX, D. Apoptosis and the immune system. <u>Br. Med. Bull.</u>, v. 53, p. 591-603, 1997.
- ELLIS, H. M. & HORVITZ, H. R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. <u>Cell</u>, v. 44, p. 817-829, 1986.
- ENGELHARD, E. K. & VOLKMAN, L. E. Developmental resistance in fourth instar *Trichoplusia ni* orally inoculated with *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. <u>Virology</u>, v. 209, p. 384-389, 1995.
- _____.; KAM-MORGAN, L. N. W.; WASHBURN, J. O. & VOLKMAN, L. E. The insect traqueal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. <u>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</u>, v. 91, p. 3224-3227, 1994.
- ESSAWY, M., MALEVILLE, A. & BREHÉLIN, M. The hemocytes of *Heliothis armigera*: ultrastructure, functions, and evolution in the course of larval development. J. Morphol., v. 186, p. 255-264, 1985.
- FADEEL, B. Programmed cell clearance. Cell. Mol. Life Sci., v. 60, p. 2575-2585, 2003.

- FADOK, V. A.; VOELKER, D. R.; CAMPBELL, P. A.; COHEN, J. J.; BRATON, D. L. & HENSON, P. M. Exposure of phosphatitidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. <u>J. Immunol.</u>, v. 148, p. 2207-2216, 1992.
- FALLEIROS, A. M. F.; BOMBONATO, M. T. S. & GREGÓRIO, E. A. Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). <u>Braz. Arch. Biol. Technol.</u>, v. 46, p. 287-294, 2003.
- FALLON, A. M. & SUN, D. Exploration of mosquito immunity using cells in culture. Insect Biochem. Mol. Biol., v. 31, p. 263-278, 2001.
- FAULKNER, P. & CARSTENS, E. B. An overview of the structure and replication of baculoviruses. <u>Curr. Top. Microbiol. Immunol.</u>, v. 131. p. 1-19, 1986.
- FEDERICI, B. A. Baculovirus pathogenesis. In: MILLER, L. K. The Baculoviruses. New York: Plenum Press, 1997, p. 33-59.
- 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. <u>Virology</u>, v. 208, p. 328-335, 1995.
- 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* interpuntella granulosis virus. <u>Virology</u>, 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.
- FUXA, J. R.; RICHTER, A R.; AMEEN, A. O. & HAMMOCK, B. D. Vertical transmission of TnSNPV, TnCPV, AcMNPV and possibly recombinant NPV in *Trichoplusia ni*. J. Invertebr. Pathol., v. 79, p. 44-50, 2002.

- GARCIA-MARUNIAK, A., PAVAN, O. H. & MARUNIAK, J. E. A variable region of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus contains tandemly repeated DNA sequences. Virus Res., v. 41, p. 123-132, 1996.
- GARDINER, E. M. M. & STRAND, M. Monoclonal antibodies bind distinct classes of hemocytes in the moth *Pseudoplusia includens*. <u>J. Insect Physiol.</u>, v.45, p. 113-126, 1999.
- _____.&____. Hematopoiesis in larval *Pseudoplusia includens* and *Spodoptera frugiperda*. <u>Arch Insect Biochem Physiol.</u>, v. 43, p. 147-164, 2000.
- GILLESPIE, J. P.; KANOST, M. R. & TRENCZEK, T. Biologica mediators of insect immunity. <u>Annu. Rev. Entomol.</u>, v. 42, p. 611-643, 1997.
- GIULIANINI, P. G.; BERTOLO, F.; BATTISTELLA,S & AMIRANTE, G. A. Ultrastructure of the hemocytes of *Cetonischema aeruginosa* larvae (Coleoptera: Scarabeidae): invovement of both granulocytes and oenocytoids in in vivo phagocytosis. <u>Tissue & Cell</u>, v. 35, p. 243-251, 2003.
- GRANADOS, R. R. & LAWLER, K. A. *In vivo* pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. <u>Virology</u>, v. 108, p. 297-308, 1981.
- .; GUOXUN, L.; DERSKSEN, 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.
- GRASELA, J. J. & McINTOSH, A. H. In vitro and In vivo host range of Anticarsia gemmatalis Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus. <u>In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal</u>, v. 34, p.79-83, 1998.
- GREEN, D. R. & REED, J. C. Mitocondria and apoptosis. <u>Science</u>, v. 281, p. 1309-1312, 1998.
- GREEN, M. C.; MONSER, K. P. & CLEM, R. J. Ubiquitin protein ligase activity of the anti-apoptotic baculovirus protein Op-IAP3. <u>Virus Res.</u>, v. 105, p. 89-96, 2004.
- 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. <u>J. Gen. Virol.</u>, v. 77, p. 2873-2879, 1996.

- GUIMARÃES, C. A. & LINDEN, R. Programed cell death. Apoptosis and alternative deathstyles. <u>Eur. J.Biochem.</u>, v. 271, p. 1638-16-50, 2004.
- GUPTA, A. P. Hemocyte types: their structures, synonymies, interrelationships, and taxonomic significance. In: _____. Insect hemocytes, development, forms, functions and techniques. Cambridge: Cambridge University Press, 1979. p. 85-154.
- _____. Insect immunocytes and other hemocytes: Roles in cellular and humoral immunity. In: _____. Immunology of Insects and Other Arthropods. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 19-118.
- HAAS STAPLETON, E. J.; WASHBURN, J. O. & VOLKMAN, L. E. Pathogenesis of Autographa californica M nucleopolyhedrovirus in fifth instar Spodoptera frugiperda. J. Gen. Virol. v. 84, p.2033-2040, 2003.
- _____.; ____.& ____. P74 mediates specific binding of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to primary cellular targets in the midgut epithelia of *Heliothis virescens* larvae. J. Virol., v. 78, p. 6876-6791, 2004.
- HAO, Y.; SEKINE, K.; KAWABATA, A.; NAKAMURA, H.; ISHIOKA, T.; OHATA, H.;
 KATAYAMA, R.; HASHIMOTO, C.; ZHANG, X.; NODA, T., TSURUO, T. &
 NAITO, M. Apollon ubiquitinates SMAC and caspase-9, and has an essential cytoprotection function. <u>Nat. Cell Biol.</u>, v. 6, p. 849-860, 2004.
- HARDWICK, J. M. Viral interference with apoptosis. <u>Sem. Cell Dev. Biol.</u>, v. 9, p. 339-349, 1998
- HARVEY, A. J.; BIDWAI, A. P. & MILLER, L. K. Doom, a product of the *Drosophila* mod (mdg4) gene, induces apoptosis and binds to baculovirus inhibitor-of-apoptosis proteins. <u>Mol. Cell. Biol.</u>, v. 17, p. 2835-2843, 1997.
- HENDERSON, S.; HUEN, D.; ROWE, M.; DAWSON, C.; JOHNSON, G. & RICKINSON, A. Epstein-Baar virus-coded BHRF-1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. <u>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</u>, v. 90, p. 8479-8483, 1993.
- HERNIOU, E. A.; OLSZEWSKI, J. A.; CORY, J. S. & O'REILLY, D. R. The genome sequence and evolution of baculoviruses. <u>Annu. Rev. Entomol.</u>, v. 48, p. 211-234, 2003.
- _____.; _____.; O'REILLY, D. R. & CORY, J. S. Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts. J. Virol., v. 78, p. 3244-3251, 2004.
- HERSHBERGER, P. A.; 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. <u>J. Virol.</u>, v. 68, p. 3467-3477, 1994.
- HINK, W. F. Established insect cell line from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. <u>Nature</u>, v. 226, p. 466-467, 1970.
- HOCHMAN, A. Programmed cell death in prokaryotes. <u>Critic. Rev. Microbiol.</u>, v. 23, p. 207-214, 1997.
- HOFFMANN, J. A.; KAFATOS, F. C.; JANEWAY JR., C. A. & EZEKOWITZ, R. A. B. Phylogenetic perspectives in innate immunity. <u>Science</u>, v. 284, p. 1313-1318, 1999.
- HOOVER, K.; WASHBURN, J. O. & VOLKMAN, L. E. Midgut-based resistance of *Heliothis virescens* to baculovirus infection mediated by phytochemicals in cotton. <u>J.</u> <u>Insect Physiol.</u>, v. 46, p. 999-1007, 2000.
- HOROHOV, D. W. & DUNN, P. E. Changes in the circulating hemocyte population of *Manduca sexta* larvae following injection of bacteria. <u>J. Invertebr. Pathol.</u>, v. 40, p. 327-339, 1982.
- HORTON, H. M. & BURAND, J. P. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. <u>J. Virol.</u>, 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. <u>Nature</u>, v. 384, p. 638-641, 1996.
- INCEOGLU, A. B.; KAMITA, S. G.; HINTON, A. C.; HUANG, Q.; SEVERSON, T. F.; KANG, K. & HAMMOCK, B. D. Recombinant baculoviruses for insect control. <u>Pest</u> <u>Manag. Sci.</u>, v. 57, p. 981-9877, 2001.

- IRUSTA, P. M.; CHEN,Y. & HARDWICK, J. M. Viral modulators of cell death provide new links to old pathways. <u>Curr. Op. Cell Biol.</u>, v. 15, p. 700-705, 2003.
- JACOBSON, M. D.; WEIL, M. & RAFF, M. Programmed cell death in animal development. <u>Cell</u>, v. 88, p. 347-354, 1997.
- JAMES, E. R. & GREEN, D. R. Manipulation of apoptosis in the host-parasite interaction. <u>Trends Parasitol.</u>, v. 20, p. 280-287, 2004.
- JARVIS, D. L. Baculovirus Expression Vectors. In: MILLER, L. K. The Baculoviruses. New York: Plenum Press, 1997. p. 237-266.

_____. Developing baculovirus-insect cell expression systems for humanized recombinant glycoprotein production. <u>Virology</u>, v. 310, p. 1-7, 2003.

- 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.
- KABA, S. A.; SCHAAP, D.; ROODE, E. C.; NENE, V.; MUSOKE, A. J.; VLAK, J. M. & VAN OERS, M. M. Improved immunogenecity of novel baculovirus-derived *Theileria parva* p67 subunit antigens. <u>Vet. Parasitol.</u>, v. 121, p. 53-64, 2004.
- KAM, P. C. A. & FERCH, N. I. Apoptosis: mechanisms and clinical implications. Anaesthesia, v. 55, p. 1081-1093, 2000.
- 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.
- KAVANAGH, K & REEVES, E. P. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenecity testing of microbial pathogens. <u>FEMS Microbiol. Rev.</u>,v. 28, p. 101-112, 2004.
- KAWAMOTO, F.; KUMADA, N. & KOBAIASHY, M. Envelopment of the nuclear polyhedrosis virus of the Oriental tussock moth, *Euproctis subflava*. <u>Virology</u>, v. 77, p. 867-871, 1977a.
- _____.; SUTO, C.; KUMADA, N. & KOBAIASHY, M. Cytoplasmic budding of a nuclear polyhedrosis virus and comparative ultrastructural studies of envelopes. <u>Microbiol.</u> <u>Immunol.</u>, v. 21, p. 255-265, 1977b.

- 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. <u>Science</u>, 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. <u>Br. J. Cancer</u>, v. 26, p. 239-257, 1972.
- KIRKPATRICK, B. A.; WASHBURN, J. O.; ENGELHARD, E. K. & VOLKMAN, L. E. Primary infection of insect tracheae by *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. <u>Virology</u>, v. 203, p. 184-186, 1994.
- KLOWDEN, M. J. Physiological systems in insects. San Diego: Academic Press, 2002.
- KOYAMA, A. H.; FUKUMORI, T.;FUJITA, M.; IRIE, H. & ADACHI, A. Physiological significance of apoptosis in animal virus infection. <u>Microbes Infect.</u>, v. 2, p. 1111-1117, 2000.
- _____.; 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. <u>Invest.</u>, v. 45, p. 37-45, 1998.
- LACOUNT, D. J. & FRIESEN, P. D. Role of early and late replication events in induction of apoptosis by baculoviruses. J. Virol., v. 71, p. 1530-1537, 1997.
- LAVINE, M. D. & STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. <u>Insect</u> <u>Biochem.Mol. Biol.</u>,v. 32, p. 1295-1309, 2002.
- _____. & ____. Haemocytes from *Pseudoplusia includens* express multiple α and β integrin subunits. Insect Mol. Biol., v. 12, p. 441-452, 2003.
- LECELLIER, C. H. & VOINNET, O. RNA silencing: no mercy for viruses? <u>Immunol.</u> <u>Rev.</u>, v. 198, p. 285-303, 2004.
- LECLERC, V. & REICHHART, J. M. The immune response of *Drosophila melanogaster*. Immunol. Rev., v. 198, p. 59-71,2004.

- 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. <u>J. Gen. Virol.</u>, v. 79, p. 2293-2300, 1998.
- LI, F.; AMBROSINI, G.; CHU, E. Y.; PLESCIA, J.; TOGNIN, S. & MARCHISIO, P. C. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. <u>Nature</u>, v. 396, p. 580–584, 1998.
- LIANG, C. Y.; WANG, H. Z.; LI, T. X.; HU, Z. H. & CHEM, X. W. High efficiency gene transfer into mammalian kidney cells using baculovirus vectors. <u>Arch. Virol.</u>, v. 149, p. 51-60, 2003.
- LING, E.; SHIRAI, K.; KANEKATSU, R. & KIGUCHI, K. Classification of larval circulating hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*, by acridine orange and propidium iodide staining. Histochem.Cell.Biol.,v. 120, p. 505-511, 2003.
- 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. <u>Cell</u>, v. 17, p. 43-52, 1979.
- LOKER, E. S.; ADEMA, C. M.; ZHANG, S. M. & KEPLER, T. B. Invertebrate immune systems- not homogeneous, not simple, not well understood. <u>Immunol. Rev.</u>,v. 198, p. 10-24, 2004.
- LORENZO, H. K. & SUSIN, S. A. Mitochondrial effectors in caspase-independent cell death. <u>FEBS Letters</u>, v. 557, p. 14-20, 2004.
- 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.
- LUNG, O; WESTENBERG, M; VLAK, J. M.; ZUIDEMA, D. & BLISSARD, G. W. Pseudotyping Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus (AcMNPV): F proteins from group II NPVs are functionally analogous to AcMNPV GP64. <u>J. Virol.</u>, v. 76, p. 5729-5736, 2002.
- 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. <u>Virology</u>, 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.
- MARTELLI, A. M.; BAREGGI, R.; BORTUL, R.; GRILL, V.; NARDUCCI, P. & ZWEYER, M. The nuclear matrix and apoptosis. <u>Histochem. Cell Biol.</u>, v. 108, p. 1-10, 1997.
- MARUNIAK, J. E. Molecular biology of *Anticarsia gemmatalis* baculovirus. <u>Mem. Inst.</u> <u>Oswaldo Cruz</u>, 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., v. 28, p. 195-201, 1999.
- MEDEIROS, R. B.; RESENDE, R. O. & ÁVILA, A. C. The plant virus Tomato spotted wilt tospovirus activates the immune system of its main insect vector, Frankliniella occidentalis. J.Virol., v. 78, p. 4976-4982, 2004.
- 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. <u>EMBO J.</u>, v. 11, p. 5013-5020, 1992.
- MILLER, J. S. & STANLEY, D. W. Eicosanoids mediate microaggregation reactions to bacterial challenge in isolated insect hemocyte preparations. <u>J. Insect. Physiol.</u>, v. 47, p. 1409-1417, 2001.
- 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. <u>Trends Cell Biol.</u>, 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. <u>J. Cell Biol.</u>, 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.

- _____. Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidoptera. <u>Annu.</u> <u>Rev. Entomol.</u>, v. 44, p. 257-289, 1999.
- NAGATA, S. Apoptosis by death factor. Cell, v. 88, p. 355-365, 1997.
- NAITZA, S. & LIGOXYGAKIS, P. Antimicrobial defenses in *Drosophila*: the story so far. <u>Mol.Immunol.</u>, v.40, p.887-896, 2004.
- NARDI, J. B.; PILAS, B.; UJHELYI, E.; GARSHA, K. & KANOST, M. R. Hematopoetic organs of *Manduca Sexta* and hemocyte lineages. <u>Dev. Genes Evol.</u>, v. 213, p. 477-491, 2003.
- OLTVAI, Z. N.; MILLIMAN, C. L. & KORSMEYER, S. J. Bcl-2 heterodimerizes *in vitro* with a conserved homolog BAX, that accelerates programmed cell death. <u>Cell</u>, v. 74, p. 609-619, 1993.
- O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K. & LUCKOW, V. A. Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual. New York: W.H. Freeman and Company, 1992.
- PALLI, S. R.; CAPUTO, G. F.; SOHI, S. S.; BROWNWRIGHT, 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. <u>Virology</u>, v. 222, p. 201-213, 1996.
- PANG, Y.; YU, J. X.; WANG, L. H.; HU, X. H.; BAO, W. D.; LI, G.; CHEN, C.; HAN,
 H.; HU, S. N.; & YANG, H. M. Sequence analysis of the *Spopdoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. <u>Virology</u>, v. 287, p. 391-404, 2001.
- PATMANIDI, A. L.; POSSE, R. D.& KING, L. A. Formation of P10 tubular structures during AcMNPV infection depends on the integrity of host-cell microtubules. <u>Virology</u>, v. 317, p. 308-320, 2003.
- PECH, L. L. & STRAND, M. R. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. J. Cell Sci., v. 109, p. 2053-2060, 1996.

_____. & _____. Plasmatocytes from the moth *Pseudoplusia includens* induce apoptosis from granular cells. <u>J. Insect Physiol.</u>, v. 46, p. 1565-1573, 2000.

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. <u>The Plant Cell</u>, v. 9, p. 1157-1168, 1997.
- PETCHAMPAI, N.; BOONSAENG, V.; WALLACE, J. C. & JITRAPAKDEE, S. Expression of human pyruvate carboxylase in insect cells using the baculovirus system. Biochem.Biophys.Res. Com.,v. 316, p. 177-181, 2004.
- PILLOFF, M. G.; BILEN, M. F.; BELAICH, M. N.; LOZANO, M. E. & GHIRINGHELLI, P. D. Molecular cloning and sequence analysis of the *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nuclear polyhedrosis virus GP64 glycoprotein. <u>Virus Genes</u>, v 26, p. 57-69, 2003.
- PINEDO, F. J. R.; MOSCARDI, F.; LUQUE, T.; OLSZEWSKI, J. A. & RIBEIRO, B. M. Inactivation of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (egt) gene of *Anticarsia* gemmatalis nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) improves its virulence towards its insect host. <u>Biological Control</u>, v. 27, p. 336 - 344, 2003.
- 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.
- PONNUVEL, K. M.; NAKAZAWA, H.; FURUKAWA S.; ASAOKA, A.; ISHIBASHI, J.; TANAKA, H. & YAMAKAWA, M. A lipase isolated from the silkworm *Bombyx mori* shows antiviral activity against nucleopolyhedrovirus. <u>J. Virol.</u>, v. 77, p. 10725-10729, 2003.
- POPHAM, H. J.; BISCHOFF, D. S. & SLAVICEK, J. M. Both Lymantria dispar nucleopolyhedrovirus enhancin genes contribute to viral potency. <u>J. Virol.</u>, v. 75, p. 8639-8648, 2001.
- 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.

- RAHMAN, M. M & GOPINATHAN, K. P. Systemic and in vitro infection process of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. <u>Virus Res.</u>, v. 101, p. 109-118, 2004.
- 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. <u>Proc. Natl. Acd. Sci. USA</u>, v. 89, p. 7742-7746, 1992.
- RAO, R.; FIANDRA, L.; GIORDANA, B.; DE EGUILEOR, M.; CONGIU, T.; BURLINI, N.; ARCIELLO, S.; CORRADO, G. & PENNACHIO, F. AcMNPV ChiA protein disrupts the peritrophic membrane and alters midgut physiology of *Bombyx mori* larvae. <u>Insect. Biochem. Mol. Biol.</u>, v. 34, p. 1205-1213, 2004.
- RAY, C. A.; BLACK, R. A.; KRONHEIM, S. R.; GREENSTREET, T. A.; SLEATH, P.
 R.; SLAVESEN, G. S. & PICKUP, D. J. Viral inhibition of inflammation: Cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1-beta converting enzime. <u>Cell</u>, v. 69, p. 597-604, 1992.
- RAZUCK, F. B.; RIBEIRO, B.; VARGAS, J. H.; WOLFF, J. L. & RIBEIRO, B. M. Characterization of the p10 gene region of *Anticarsia gemmatalis* nucelopolyhedrovirus. <u>Virus Genes</u>, v. 23, p. 243–247, 2002.
- 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.
- _____.; GATTI, C. D. C.; COSTA, M. H.; MOSCARDI, F.; MARUNIAK, J. E.; POSSEE,
 R. D. & ZANOTTO, P. M. A. Construction of a recombinant *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV-2D) harbouring the beta-galactosidase gene. <u>Arch.</u> <u>Virol.</u>, v. 146, p. 1355-1367, 2001.
- RIBEIRO, C.; SIMÕES, N. & BREHÉLIN, M. Insect immunity: the haemocytes of the armyworm *Mythimna unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) and their role in defence reactions. *In vivo* and *in vitro* studies. J. Insect Physiol., v. 42, p. 815-822, 1996.
- RODRIGUES, J. C. M.; SOUZA, M. L.; REILLY, D. O.; VELLOSO, L. M.; PINEDO, F. J. R.; RAZUCK, F. B.; RIBEIRO, B. & RIBEIRO, B. M. Characterization of the Ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (egt) gene of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. <u>Virus Genes</u>, v. 22, p.103-112, 2001.

- ROSHAL, M.; ZHU, Y. & PLANELLES, V. Apoptosis in AIDS. <u>Apoptosis</u>, v. 6, p. 103-116, 2001.
- ROTHE, 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. <u>Cell</u>, 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. <u>EMBO J.</u>, v. 16, p. 6914-6925, 1997.
- RUSSO, J.; BREHÉLIN,. M. & CARTON, Y. Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* cused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. J. Insect Physiol., v. 47, p. 167-172, 2001.
- 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. <u>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</u>, v. 96, p. 4838-4843, 1999.
- SAHDEV, S; TANEJA,T. K.; MOHAN, M.; SAH,N. K.; KHAR, A. K.; HASNAIN, S. E.; ATHAR, M. Baculoviral p35 inhibits oxidant-induced activation of mitochondrial apoptotic pathway. Biochem. Biophys. Res. Comm., v. 307, p. 483-490, 2003.
- SASS, M.; KISS, A. & LOCKE, M. Integument and hemocyte peptides. <u>J. Insect Physiol.</u>, v. 40, p. 407-421, 1994.
- SAVARY, S.; BECKAGE, N.; TAN, F.; PERIQUET, G. & DREZEN, J. M. Exision of the polydnavirus chromossomal 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. <u>Br. Med. Bull.</u>, v. 53, p. 491-508, 1997.
- 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. <u>Cell</u>, 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.
- SCHULENBURG, H.; KURZ, C. L. & EWBANK, J. J. Evolution of the innate immune system: the worm perspective. <u>Immunol. Rev.</u>, v. 198, p. 36-58, 2004.
- 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 gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). <u>In</u> <u>Vitro Cell Dev. Biol.</u>, v. 24, p. 195-198, 1988a.
- _____. & _____. Susceptibility of an established cell line of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) to three nuclear polyhedrosis viruses. J. Invertebr. Pathol., v. 52, p. 453-458, 1988b.
- SILVA, M. T. B. & MOSCARDI, F. Field efficacy of the nucleopolyhedrovirus of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidea). Effect of formulations, water pH, volume and time of application, and type of spray nozzle. <u>Neotrop. Entomol.</u>, v. 31, 75-83, 2002.
- SILVEIRA E. B.; RIBEIRO B. M. & BÁO S. N. Morphological studies of apoptosis in insect cells infected with vApAg, an *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus mutant. J. Submicrosc. Cytol. Pathol., v. 31, p. 543-554, 1999.
- SLACK, J. M.; RIBEIRO, B. M. & SOUZA, M. L. The gp64 locus of Anticarsia gemmatalis multicapsid nucleopolyhedrovirus contains a 3' repair exonuclease homologue and lacks v-cath and Chi-A genes. J. Gen. Virol., v. 85, p. 211-219, 2004.
- SMITH, G. E. & SUMMERS, M. D. Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases. <u>Virology</u>, v. 89, p. 517-527, 1978.

- SOARES, J. S. & RIBEIRO, B. M. Pathology of *Anticarsia gemmatalis* larvae infected with two recombinant *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedrovirus (*Ag*MNPV). <u>Res. Microbiol.</u>, *in press*, 2004.
- STETTLER, P.; TRENCZEK, T.; WYLERT T.; PFISTER-WILHELM, R. & LANZREIN,
 B. Overview of parasitism associated effects on host haemocytes in larval parasitoids and comparison with effects of the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* on its host *Spodoptera littoralis*. J. Insect Physiol., v. 44, p. 817-831, 1998.
- STOLZ, D. B.; PAVAN, C. & DA CUNHA, A. B. Nuclear polyhedrosis virus: A possible example of *de novo* intranuclear membrane morphogenesis. <u>J. Gen. Virol.</u>, v. 19, p. 145-150, 1973.
- STRAND, M. & 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.
- SUMMERS, M. D. Electon microscopic observations on granulosis virus entry, uncoating and replication processes during infection of the midgut cells of *Trichoplusia ni*. <u>J.</u> <u>Ultrastruc. Res.</u>, v. 35, p. 606-625, 1971.
- 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.
- TAMM, I.; TREPEL, M.; CARDÓ-VILA, M.; SUN,Y.; WELSH, K.; CABEZAS, E.; SWARTTERTHWAIT, A.; ARAP, W.; REED, J. C. & PASQUALINI, R. Peptides targeting caspase inhibitors. <u>J. Biol. Chem.</u>, v. 278, p. 14401-14405, 2003.
- TANI, H.; LIMN, C. K.; YAP, C. C.; ONISHI, M.; NOZAKI, M.; NISHIMUNE, Y.;
 OKAHASHI, N.; KITAGAWA, Y.; WATANABE, R.; MOCHIZUKI, R.; MORIISHI,
 K. & MATSUURA, Y. In vitro and in vivo gene delivery by recombinant baculoviruses. J. Virol., v. 77, p. 9799-808, 2003.
- 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. <u>Virology</u>, v. 201, p. 404-407, 1994

- TEODORO, J. G. & BRANTON, P. E. Regulation of apoptosis by viral gene products. <u>J.</u> <u>Virol.</u>, 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 FLICEinhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. <u>Nature</u>, v. 386, p. 517-521, 1997.
- THOMPSON, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. <u>Science</u>, v. 267, p. 1456-1462, 1995.
- THORNBERRY, N. A. & LAZEBNIK, Y. Caspases: Enemies within. <u>Science</u>, v. 281, p. 1312-1316, 1998.
- TRUDEAU, D.; WASHBURN, J. & VOLKMAN, L. E. Central role of haemocytes in Autographa californica M nucleopolyhedrosis pathogenesis in Heliothis virescens and Helicoverpa zea. J. Virol., v. 75, p. 996-1003, 2001.
- TZOU, P.; de GREGÓRIO, E. & LEMAITRE, B. How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. <u>Curr.</u> <u>Opin. Microbiol.</u>, v. 5, p.102-110, 2002.
- 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 citotoxic T lymphocites. <u>Mol. Cell Biol.</u>, 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. <u>Trends</u> <u>Biochem. Sci.</u>, 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 Inseticides 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* (Lepdoptera: Noctuidae). <u>In Vitro</u>, v. 13, p. 213-217, 1977.
- VILAPLANA, L. & O'REILLY, D. R. Functional interaction between *Cydia pomonella granulovirus* IAP proteins. <u>Virus Res.</u>, v. 92, p. 107-111, 2003.
- VILLA, P.; KAUFMANN, S. H. & EARNSHAW, W. C. Caspases and caspases inhibitors. <u>Trends Biochem. Sci.</u>, 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. <u>J. Gen. Virol.</u>, v. 69, p. 765-776, 1988.
- VOLKMAN, L. E. The 64K envelope protein of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. <u>Curr. Top. Microbiol. Immunol.</u>, v. 131, p. 103-118, 1986.
- _____. Nucleopolyhedrovirus interactions with their insect hosts. <u>Adv. Virus Res.</u>, v. 48, p. 313-348, 1997.
- _____. & KEDDIE, B. A. Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis. <u>Sem. Virol.</u>, v.1, p. 249-256, 1990.
- _____. & 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. <u>Virology</u>, 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. <u>J. Virol.</u>, 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. <u>Virology</u>, v. 133, p. 354-362, 1984.

- VUCIC, D.; KAISER, W. J.; & MILLER, L. K. Inhibitior of apoptosis proteins physically interact with and block apoptosis induced by *Drosophila* proteins HID and GRIM. <u>Mol. Cell. Biol.</u>, 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). <u>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</u>, 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. <u>BioTechniques</u>, v. 15, p. 1032-1040, 1993.
- WANG, P. & GRANADOS, R. R. Observations on the presence of the peritrophic membrane in larval *Trichoplusia ni* and its role in limiting baculovirus infection. <u>J.</u> <u>Invertebr. Pathol.</u>, v. 72, p. 57-62, 1998.
- WASHBURN, J. O.; KIRKPATRICK, B. A. & VOLKMAN, L. E. Comparative pathogenesis of Autographa californica M nuclear polyhedrosis virus in larvae of *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens*. Virology, v. 209, p. 561-568, 1995.
- _____.; ____. & ____. Insect protection against viruses. <u>Nature</u>, v. 383, p. 767, 1996.
- _____.; WONG, J. F. & VOLKMAN, L. E. Comparative pathogenesis of *Helicoverpa zea* S nucleopolyhedrovirus in noctuidae larvae. J. Gen. Virol., v. 82, p. 1777-1784, 2001.
- _____.; TRUDEAU, D.; WONG, J. F. & VOLKMAN, L. E. Early pathogenesis of *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* in *Heliothis virescens*: a comparison of the "M" and "S" strategies for establishing fatal infection. <u>J. Gen.</u> <u>Virol.</u>, v. 84, p. 343-351, 2003a.
- _____.; CHAN, E. Y.; VOLKMAN, L. E.; AUMILLER, J. J. & JARVIS, D. L. Early synthesis of budded virus envelope fusion protein GP64 enhances *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus virulence in orally infected *Heliothis virescens*. J. Virol., v. 77, p. 280-290, 2003b.
 - ____; HAAS-STAPLETON, E. J.; TAN, F. F.; BECKAGE, N. E. & VOLKMAN, L. E. Co-infection of *Manduca sexta* larvae with polydnavirus from *Cotesia congregata* increase susceptibility to fatal infection by *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus. J. Insect Physiol., v. 46, p. 179-190, 2000.

- WILLIANS, 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 insertiondeletion mutants. <u>J. Gen. Virol.</u>, v. 70, p. 187-202, 1989.
- WILSON, M. E. & CONSIGLI, R. A. Characterization of a protein kinase associated with purified capsids of the granulosis virus infecting *Plodia interplunctella*. <u>Virology</u>, v. 143, p. 516-525, 1985.
- WOLFF, J. L. C.; RIBEIRO, B. M.; GARCIA-MARUNIAK, A.; MARUNIAK, J. E.; MOSCARDI, F.; SOUZA, M. L.; CASTRO, M. E. B. & ZANOTO, P. M. A. The *Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) genome. <u>Vírus: Rev. & Res.</u>, v. 9 sup. 1, p. 40-41, 2004.
- WYLLIE, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. <u>Nature</u>, 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. <u>Nature</u>, v. 377, p. 248-251, 1995.
- YAMASHITA, M. & IWABUCHI, K. *Bombyx mori* prohemocyte division and differentiation in individual microcultures. J. Insect Physiol., v. 47, p. 325-331, 2001.
- 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 citochrome C from mitochondria blocked. <u>Science</u>, v. 275, p. 1129-1132, 1997.
- YEW, P. R. & BERK, A. J. Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. <u>Nature</u>, 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. <u>J. Struct. Biol.</u>, v. 110, p. 141-153, 1993.

- YOUNG, L. S.; DAWSON, C. W. & ELIOPOULOS, A. G. Viruses and apoptosis. <u>Br.</u> <u>Med. Bull.</u>, 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-1βconverting enzyme. <u>Cell</u>, 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. <u>J.</u> <u>Invertebr. Pathol.</u>, 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. <u>J. Gen. Virol.</u>, v. 73, p. 1049-1056, 1992.
- ZHANG, P.; YANG, K.; DAI, X.; PANG, Y. & SU, D. Infection of wild-type Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus induces in vivo apoptosis of Spodoptera litura larvae. J. Gen. Virol., v. 83, p. 3003-3011, 2002.
- 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. <u>Biochemistry</u>, 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.