

ALTERAÇÕES E MODO DE AÇÃO DAS PARTÍCULAS DO
VÍRUS DA POLIEDROSE NUCLEAR E ESTUDOS AUTO-
RADIOGRÁFICOS EM CÉLULAS DE *Bombyx mori* L., 1758
(Lep., Bombycidae)

MARIA DAS GRAÇAS ONGARELLI

Orientador: DARCY MARTINS DA SILVA

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Energia Nuclear na
Agricultura.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro, 1979

Aos meus pais

Edgard e Ana

que muito contribuíram
para a minha formação

e ao meu irmão

Edgard Roberto

pelo incentivo,

D E D I C O

AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que de uma forma ou de outra permitiram a realização deste trabalho e em especial:

Ao Prof. Dr. *Darcy Martins da Silva*, pela valiosa orientação e também pela amizade, dedicação e incentivo durante o Curso de Pós-Graduação, colaborando de forma decisiva para a minha formação científica.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), na pessoa do diretor Prof. Dr. *Admar Cervellini*, onde o presente trabalho foi realizado.

À Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), pelas facilidades oferecidas durante a realização do Curso de Pós-Graduação e pela concessão de bolsa de estudo.

Ao Plano de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PLANFAP) do Ministério das Minas e Energia, pelo apoio prestado durante a realização do curso e pela concessão de bolsa de estudo.

Ao Projeto UNDP/IAEA/BRA/78/006 para o Desenvolvimento da Produção Agrícola através da Aplicação de Técnicas Nucleares, na pessoa do Dr. *Peter Vose*, que muito contribuiu para a realização deste trabalho.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP), nas pessoas dos Profs. Drs. *Lourenço Bozzo* e *Cássio G. Munhoz*, pela gentileza na utilização do fotomicroscópio.

Ao Prof. Dr. *Epaninondas S. B. Ferraz*, pela consideração e amizade.

Aos Colegas do Setor de Microscopia Eletrônica do CENA, pelos bons momentos passados juntos e pela ajuda quando foi necessária.

Ao *José Elias Gomes*, técnico do setor, pela auxílio na obtenção das fotomicrografias.

Aos Prof. Dr. *Paulo L. Libardi* e M.S. *Henry E. Bajungu*, pela versão do resumo para o inglês.

À Sr.^a *Tekla Eunice Klar*, pelos trabalhos de datilografia.

Ao Sr. *José Vitti*, pelos serviços de reprodução fotográfica.

Í N D I C E

	Página
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	6
3.1. Considerações gerais sobre a poliedrose nuclear.....	6
3.1.1. Alterações intracelulares provocadas pelo NPV	8
3.2. Os poliedros	9
3.3. Técnicas utilizadas para a liberação das partículas de NPV dos poliedros	12
3.4. As partículas de NPV	14
3.5. Técnicas de coloração negativa	15
3.6. Técnica de metalização ou sombreamento	16
3.7. Técnicas de autoradiografia	17
3.8. Síntese do DNA do vírus da poliedrose nuclear	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1. Hospedeiro utilizado	20
4.2. Fontes de inóculo e inoculação	21
4.3. Tratamento alcalino para liberação das partículas de NPV do poliedro	21

	Página
4.3.1. Coloração negativa	22
4.3.2. Metalização ou sombreamento	22
4.4. Técnicas utilizadas para o tratamento do espécime.....	23
4.4.1. Técnica usual a nível de microscopia eletrônica..	23
4.4.2. Autorradiografia	26
4.4.2.1. Técnica do "Streaking-film" para microscopia óptica (BIENZ, 1977).....	26
4.5. Exame dos espécimes.....	27
4.6. Técnica para as medidas de partículas de vírus.....	28
4.7. Técnica para as medidas de densidade de grãos de prata...	28
4.8. Testes estatísticos aplicados	28
 5. RESULTADOS	
5.1. Estudos com o vírus da poliedrose nuclear (NPV) afetando núcleos de células colunares do intestino médio de lagartas de <i>B. mori</i> e <i>A. gemmatalis</i>	30
5.2. Estudos com o vírus da poliedrose nuclear (NPV) afetando núcleos de células da hemolinfa de lagartas de <i>B. mori</i> ...	35
5.3. Estudos com o vírus da poliedrose nuclear (NPV) afetando núcleos de células do corpo gorduroso de lagartas de <i>B. mori</i>	35
5.4. Liberação das partículas de NPV do poliedro	37

	Página
6. DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÕES	53
8. SUMMARY	55
9. LITERATURA CITADA	57

LISTA DAS TABELAS

	Página
Tabela 1 - Comprimentos e larguras das partículas de NPV com e sem membranas em células colunares do intestino médio de <i>B. mori</i> e <i>A. gemmatalis</i> e os resultados dos testes F e de Tukey	32
Tabela 2 - Comprimentos e larguras das partículas de NPV sem membranas encontradas em nucleoplasma e poliedro de células colunares do intestino médio de <i>B. mori</i> e os resultados dos testes F e de Tukey	34
Tabela 3 - Áreas dos núcleos de células do corpo gorduroso de lagartas de <i>B. mori</i> afetados pelo NPV e sadios.....	36
Tabela 4 - Densidades dos grãos de prata em regiões nucleares e citoplasmáticas de células do corpo gorduroso de lagartas de <i>B. mori</i> afetadas pelo NPV e sadias.....	38

LISTA DAS FIGURAS

	Página
Figura 1 - Células colunares do intestino médio de <i>B. mori</i> afetadas pelo NPV	40
Figura 2 - Desenvolvimento do NPV em hemócitos de <i>B. mori</i> ..	41
Figura 3 - Células do corpo gorduroso de <i>B. mori</i>	42
Figura 4 - Partículas de NPV liberadas do poliedro.....	43

1. RESUMO

A presente Dissertação trata de alguns aspectos do processo patológico causado pelo vírus da poliedrose nuclear (NPV) afetando duas espécies de Lepidoptera: *Bombyx mori* L. 1758 (Lep., Bombycidae) e *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lep., Noctuidae), do dimensionamento das partículas infecciosas e incorporação de timidina tritiada no DNA viral.

Através de fotomicrografias de cortes ultra e semifinos de células de corpo gorduroso, células colunares do intestino médio e hemócitos de lagartas dos insetos doentes, constatou-se que o NPV estudado pode se desenvolver em quaisquer dessas células. Observações das fotomicrografias dos hemócitos em especial, apresentaram evidências sobre as vias pelas quais o NPV se sistematiza na lagarta.

O aumento de volume dos núcleos de células do corpo gorduroso de lagartas de *B. mori* apresentando os primeiros sintomas da doença mostrou ser da ordem de 12,4 vezes maior que o de células sadias.

A organização dos poliedros em hemócitos apresentou características com algumas diferenças em relação aos poliedros de outros tipos de células.

Com respeito às dimensões das partículas de NPV de um mesmo inóculo afetando células colunares do intestino médio de lagartas de *B. mori* e *A. gemmatalis* assim como de partículas incluídas em poliedros e livres no nucleoplasma, foram notadas diferenças estatisticamente significativas. As médias das larguras das partículas de NPV em *B. mori* (106,7 e 50,4 nm) foram maiores que as de *A. gemmatalis* (90,2 e 46,1 nm). As partículas de NPV no interior dos poliedros foram menores em comprimento e largura (270,9 e 43,3 nm) do que as partículas livres no nucleoplasma (300,2 e 47,3 nm) de células de *B. mori*.

Os valores médios das partículas liberadas do poliedro em solução alcalina e observadas pelas técnicas de coloração negativa e metalização com platina foram 361 x 52 nm e 400 x 85 nm, respectivamente.

O tratamento de poliedros em solução alcalina no período de 100 minutos provocou alterações das partículas que exibiram as membranas sem o nucleocapsídeo interno. Partículas íntegras também foram observadas.

A incorporação da timidina tritiada após 6 horas de tratamento medida através da densidade de grãos de prata/área revelou que o núcleo da célula afetada pelo NPV incorporou em média 1,51 gr/ μm^2 e o da célula sadia 0,30 gr/ μm^2 resultados estes diferindo significativamente. A incorporação da timidina tritiada no citoplasma de lagartas sadias e afetadas pelo NPV não apresentou diferenças significativas.

Esses resultados indicam que a síntese do DNA viral se dá no núcleo da célula afetada pelo NPV.

2. INTRODUÇÃO

Embora bastante desenvolvida a patologia de insetos em outros países, no Brasil pouco é conhecido a respeito. Com a epizotia em lagartas de bicho da seda, *Bombyx mori* L., 1758 (Lep., Bombycidae) na região de Gália-SP em fins de 1973 e posteriormente em Charqueada-SP, iniciaram-se pesquisas no Centro de Energia Nuclear na Agricultura - Setor de Microscopia Eletrônica, que vieram mostrar a necessidade de se conhecer melhor as doenças de insetos, especialmente aquela causada pelo vírus da poliedrose nuclear (NPV) já que as referências bibliográficas brasileiras se baseiam quase que exclusivamente em sintomas, critério este pouco satisfatório.

Em 1976 iniciaram-se estudos com lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lep., Noctuidae) originárias de Rolândia PR, as quais apresentavam uma doença que posteriormente foi identificada por GATTI *et alii* (1977) também causada pelo NPV.

Visando pois contribuir para um melhor conhecimento do NPV em nosso meio foi realizada a presente Dissertação com os seguintes objetivos:

1. Examinar e analisar alguns aspectos do processo patológico em lagartas de *B. mori* afetadas pelo NPV.
2. Comparar do ponto de vista estatístico as dimensões do NPV em células de *B. mori* e *A. gemmatalis* e em poliedros e nucleoplasmas de *B. mori*.
3. Estudar o padrão de incorporação de timidina tritiada das células doentes e sadias de *B. mori* através de autoradiografias a nível de microscopia óptica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Considerações gerais sobre a poliedrose nuclear

Segundo SMITH (1967), as partículas de vírus causadoras de doenças em insetos incluídas em cristais de proteína são divididas em dois grandes grupos. O primeiro classificado como "poliedroses", onde muitas partículas de vírus estão incluídas em cristais de proteína usualmente chamados de poliedros e o segundo como "granulosos", onde partículas de vírus isoladas ou raramente em grupo de duas estão incluídas em minúsculos cristais ou "grânulos" ou ainda "cápsulas".

O grupo das poliedroses está dividido em poliedrose citoplasmática, onde os cristais de proteína contendo as partículas de vírus se encontram no citoplasma de células afetadas e poliedrose nuclear onde esses cristais se encontram no núcleo, grupo este estudado na presente Dissertação.

Segundo AIZAWA (1963), o NPV afeta cerca de 200 espécies de insetos entre as ordens Lepidoptera, Hymenoptera e Diptera, sendo que esta virose ocorre principalmente em Lepidoptera.

A maioria das viroses de insetos ataca principalmente o estágio larval (SMITH, 1967), mas isso não significa que o inseto adulto como no caso dos Lepidoptera seja imune à infecção, sendo na maioria dos casos altamente resistente.

De acordo com BERGOLD (1963), os aspectos gerais sobre a infecção causada pelo NPV foram discutidos inicialmente por Paillot (1930), Bergold (1943), Steinhaus (1946), Smith (1958) e Krieg (1961).

No Brasil, os primeiros estudos sobre poliedroses em lagartas de *B. mori* foram realizados por GATTI *et alii* (1976).

No caso de *B. mori* as lagartas infectadas não mostram sintomas da doença até o 2º ou 3º dia de incubação, mas após um avanço de 5 a 7 dias as lagartas perdem o apetite e tornam-se flácidas. As membranas intersegmentais apresentam-se inchadas e o tegumento é facilmente rompido. Com a ruptura do tegumento a hemolinfa de aspecto leitoso flui das lagartas que posteriormente morrem (BERGOLD, 1963).

Segundo HARRAP e ROBERTSON (1968), o desenvolvimento da poliedrose nuclear em lagartas de Lepidoptera está normalmente confinado a núcleos de hemócitos, células epiteliais da traquéia, hipoderme e células do corpo gorduroso, raramente ocorrendo em células do intestino médio. Contudo, na presente Dissertação o NPV foi estudado em células do corpo gorduroso e em células do intestino médio.

De acordo com HARRAP (1970), a infecção através de microvilosidades de células do intestino médio pode ser o estágio inicial de infecção pelo NPV, embora o processo apresente algumas diferenças com os das células anteriormente mencionadas.

TANADA e HESS (1975) estudando a poliedrose nuclear em *Pseudaletia unipuncta* descrevem o processo de sistematização a partir do núcleo da célula colunar do intestino médio pelos poros nucleares formando cisternas ou invaginações no envelope nuclear e por esse meio passando para o citoplasma. Partículas com ou sem membranas posteriormente atravessam as membranas da célula que por meio do retículo endoplasmático alcançam outras células, a membrana basal, células epiteliais da traquéia ou hemócitos.

SMITH (1967) cita dois casos em insetos da ordem Lepidoptera, nos quais o NPV parece multiplicar no núcleo de células epiteliais do intestino médio, ou seja, lagartas de *Gilpinia hercyniae* Htg (Balch e Bird, 1944) e lagartas de *Plusia chalcytes* (Laudeho e Amargier, 1963). HARRAP e ROBERTSON (1968) confirmam a poliedrose nuclear em células colunares de intestino médio do Lepidoptera *Aglais urticae*. GATTI *et alii* (1976) iniciaram estudos sobre poliedroses em *B. mori* e GATTI *et alii* (1977), detectaram o NPV em células colunares do intestino médio de *A. gemmatalis*.

SMITH (1967) menciona a transmissão transovariana do NPV como forma latente de infecção.

3.1.1. Alterações intracelulares provocadas pelo NPV

BERGOLD (1963) relata que no estágio inicial de infecção de *B. mori* o núcleo das células afetadas pelo NPV apresenta agregados de cromatina e pequenos grânulos como forte movimento Browniano. Esses grânulos de 0,2 a 0,4 μm de diâmetro foram denominados de "propoliedros" (SMITH e XEROS (1953a) e são encontrados na zona do anel nuclear. Esta região

foi detectada também nos trabalhos de SMITH e XEROS (1953b) e MARTIGNONI e SCALLION (1961). HARRAP e ROBERTSON (1968); HARRAP (1972b) utilizam o termo estroma virogênico numa tentativa de substituição aos agregados de cromatina.

Os núcleos das células infectadas hipertrofiam sendo esta uma das características principais da poliedrose nuclear. Como esses núcleos se encontram cheios de poliedros, ocupam quase todas as células que finalmente são destruídas pelo crescimento dos poliedros, com posterior liberação destes na hemocela da lagarta (SMITH e XEROS, 1953b).

Devido a multiplicação do vírus e a formação dos poliedros, os sintomas externos da doença vão gradativamente se acentuando até se tornarem claramente aparentes e provocarem a morte do hospedeiro (AIZAWA, 1963).

3.2. Os poliedros

Os poliedros nucleares podem ser vistos ao microscópio óptico e, segundo BERGOLD (1963), Maestri e Cornália (1856), foram os primeiros a relatá-los. VON PROWAZER (1907) foi provavelmente o primeiro a observar partículas de vírus dentro do poliedro, contudo as partículas de vírus só puderam ser isoladas e identificadas como agente viral da infecção por BERGOLD (1947) após o advento do microscópio eletrônico.

Os poliedros nucleares variam consideravelmente tanto na forma como no tamanho e de inseto para inseto (SMITH, 1967).

Estudos sobre a natureza do ácido nucleico do NPV revela-

ram que o mesmo é constituído de DNA (WYATT, 1952) e que além dele controlar o fenótipo do vírus poderia controlar também a forma dos poliedros (VAUGHN, 1968).

SMITH e XEROS (1953b); Vago e Chastang (1960) citados por VAUGHN, 1968; SHIGEMATSU e SUZUKI, 1971; THOMAS e GOURANTON, 1975, afirmam que o tamanho do poliedro é determinado pelo metabolismo da célula infectada que se encontra alterado nessa condição.

O tamanho dos poliedros é relativamente pequeno quando muitos deles são formados numa célula, contudo o tamanho é relativamente grande quando é formado um número menor deles (AIZAWA, 1963).

De acordo com SMITH e XEROS (1953a) os poliedros são formados todos de uma só vez e posteriormente aumentam de tamanho, mas em *Choristoneura fumiferana* Clemens AIZAWA (1963) afirma que além do crescimento dos poliedros ocorre também aumento do número deles no curso da infecção.

O diâmetro dos poliedros varia de 0,5 a 15 μm de acordo com a espécie do inseto, podendo variar consideravelmente num mesmo inseto (SMITH, 1967).

SHIGEMATSU e SUZUKI (1971) estabelecem a forma básica trapezoidal equilátera para explicar as diversas formas de ocorrência dos poliedros em formas hexagonais, quadradas e triangulares.

Em *B. mori*, o diâmetro dos poliedros varia de 3 a 5 μm , sendo de forma normalmente hexagonal (AIZAWA, 1963) e do tipo dodecaedro (BERGOLD, 1963)

Segundo BERGOLD (1963), as primeiras análises químicas dos poliedros foram realizadas por Bolle (1873, 1893). Este autor encontrou que os poliedros consistem de proteínas e não contêm lipídeos. As proteínas representam 95% do peso total e as partículas de vírus representam os 5% restantes.

Os primeiros trabalhos sobre o conteúdo de aminoácidos de proteína dos poliedros foram realizados por Desnuelle *et alii* (1943) e Desnuelle e Chang (1943) encontrando maiores porcentagens de arginina e menores porcentagens de cisteína e cistina, não apresentando grandes variações na composição qualitativa de um inseto para outro. Contudo, as análises realizadas por Wellington (1951; 1954) mostraram que os aminoácidos predominantes em *B. mori* foram leucina e/ou isoleucina (BERGOLD, 1963). Já SHIGEMATSU e SUZUKI (1971) encontraram altas concentrações dos ácidos aspártico e glutâmico, além de lisina e tirosina.

A fina estrutura da rede cristalina das moléculas de proteína dos poliedros foi estudada por MORGAN *et alii* (1955, 1956). Eles observaram que a distribuição e a posição das partículas de vírus dentro da rede cristalina é completamente ao acaso. Essa distribuição ao acaso não afeta a cristalização. Isto poderia ser entendido se a partícula de vírus agisse como centro de cristalização do poliedro. Entretanto, nenhuma evidência foi ainda obtida, pois não se observou nenhum crescimento concêntrico de moléculas de proteína ao redor das partículas de vírus. Segundo BERGOLD (1963), as moléculas de proteína dos poliedros são arranjadas num sistema cúbico de face centrada.

Bolle (1873, 1893), citado por BERGOLD (1963) demonstrou

que os poliedros são insolúveis em água, não sendo decompostos por processos de putrefação. O pH do meio no qual os poliedros estão suspensos nunca deve estar abaixo de 5,0 ou acima de 8,5, pHs que provocam dissoluções dos mesmos.

O método mais rápido de se obter poliedros numa forma pura e o uso da homolinfa fresca de lagartas doentes antes da morte (BERGOLD, 1963). Este método também foi utilizado no presente trabalho.

O poliedro pode ser considerado como um meio efetivo de proteção para a infectividade da partícula de vírus devido a sua extrema resistência aos tratamentos físicos e químicos e a partícula de vírus incorporada nele pode não ter posterior função infectiva na mesma lagarta hospedeira (HARRAP e ROBERTSON, 1968).

Os poliedros podem ser estocados na forma de pó por 20 anos sem perda da infectividade das partículas de vírus (BERGOLD, 1963).

3.3. Técnicas utilizadas para a liberação das partículas de NPV dos poliedros.

Para a liberação das partículas de vírus, os poliedros podem ser dissolvidos em soluções alcalinas fracas, técnica esta utilizada na presente Dissertação. A concentração de álcali necessária para dissolvê-los deve ser determinada para cada espécie de inseto a fim de prevenir a destruição do vírus. A concentração de álcali tem que ser suficientemente alta para dissolver os poliedros mas não tão grande que destrua as partículas. A medida das partículas de vírus após esse tratamento podem apresentar diferenças quando comparadas com as encontradas dentro das células (BERGOLD, 1963).

BERGOLD (1963) comparando a morfologia das partículas de vírus, pode observar mudanças consideráveis em algumas partículas durante o tratamento com solução alcalina. O NPV pode ser desintegrado em estruturas morfológicamente diferentes que são reveladas através do tratamento. De uma maneira geral, as partículas do NPV começam a se desintegrar numa concentração acima de 30% da necessária para sua liberação dos poliedros. Em *B. mori* as partículas de NPV começam a se desintegrarem em Na_2CO_3 0,0025M e a primeira mudança estrutural observada foi o aparecimento de uma pequena protusão numa das extremidades da partícula. A membrana externa é despreendida da partícula de vírus a 0,025M de Na_2CO_3 . Com o aumento da concentração de álcali as partículas em forma de bastonetes começam a se desintegrar em 6 a 8 sub-unidades esféricas.

Segundo BERGOLD (1963) os poliedros não são dissolvidos em água quente ou fria, álcool, éter, clorofórmio, benzol ou acetona. Eles são dissolvidos contudo em soluções de NaOH, KOH, NH_3 , H_2SO_4 e $\text{CH}_2\text{-COOH}$.

Para a liberação de partículas de NPV de *B. mori* BERGOLD (1963) utilizou soluções alcalinas de 0,005M a 0,3M Na_2CO_3 + NaCl 0,05M pelo período de 1 a 3 h.

KOSLOV *et alii* (1966) utilizaram uma solução de Na_2CO_3 0,05 M + NaCl 0,1 M a pH 11 para a liberação de partículas de vírus do poliedro de *B. mori* (KOSLOV e ALEXEENKO, 1967).

SHIGEMATSU e SUZUKI (1971) suspenderam os poliedros de NPV de *B. mori* numa solução 0,05 M Na_2CO_3 + 0,05 M NaCl por uma hora à temperatura ambiente e centrifugou por 60 minutos a 40000 rpm.

TANADA (1959) utilizou uma solução 0,1 M Na_2CO_3 seguida de centrifugações e lavagens para a liberação de partículas de NPV de *Pseudaletia unipuncta* Haworth.

BENZ (1963) utilizou uma solução 0,05 M Na_2CO_3 + 0,05 M NaCl para a liberação de partículas de NPV de *Malacosoma abpicola* Staudinger.

O corante negativo utilizado pela maioria dos autores para o exame das partículas do NPV é o ácido fosfotungstico (PTA), HARRAP (1972a) utilizou acetato de uranila obtendo melhores resultados.

3.4. As partículas do NPV

Segundo BERGOLD (1963) as partículas do NPV em *B. mori* ocorrem dentro dos poliedros principalmente isoladas e ocasionalmente em feixes. Partículas livres podem apresentar com membranas quase circulares. Esse autor caracteriza as partículas de vírus com forma de bastonetes constituídos de DNA e dupla membrana protéica medindo de 200 a 400 nm de comprimento e 20 a 50 nm de largura.

KOSAKA *et alii* (1971) encontraram dois tamanhos diferentes para as partículas do NPV em *B. mori*, ou seja, 330 x 80 nm e 360 x 60 nm confirmando a infectividade para as duas.

De acordo com KOSLOV e ALEXEENKO (1967), Krieg (1961) propôs um modelo da estrutura do NPV em *B. mori* semelhante ao vírus do mosaico do fumo (TMV), com exceção do ácido nucleico que no TMV é RNA e no NPV é DNA e da dupla membrana ausente no TMV. KOSLOV e ALEXEENKO (1967) sugerem modificações para o modelo de Krieg como quatro filamentos de DNA enrolados 2 a 2 envolvidos por dupla membrana íntima e uma membrana de desenvolvimento mais densa; as medidas das partículas propostas pelo autor são de 400 x 90 nm com a membrana de desenvolvimento e 340 x 60 nm com a dupla membrana íntima.

3.5. Técnica de coloração negativa

O espécime biológico contém átomos de baixo número atômico que não oferecem bom grau de espalhamento eletrônico, necessitando o espécime de um realce de contraste. A coloração positiva com acetato de uranila ou ácido fosfotungstíco (PTA) e técnica de metalização podem oferecer este contraste.

Para o estudo de componentes subcelulares, entretanto, tais como estruturas de superfície de bactérias, partículas de vírus e macromoléculas de proteína torna-se necessário uma alta resolução conseguida através da técnica de coloração negativa.

Segundo HASCHEMEYER e MYERS (1972) foi Hall (1955) quem descreveu os fundamentos da técnica de coloração negativa em estudos de vírus.

BRENNER e HORNE (1959) descreveram a técnica da pulverização e de acordo com HASCHEMEYER e MYERS (1972), Husley e Zubay (1960) propuseram pela primeira vez a técnica da gota utilizada nesta Dissertação.

Ao microscópio eletrônico, as partículas coloridas negativamente aparecem como áreas claras devido ao baixo poder de espalhamento da partícula comparado com a maior densidade do corante ao redor. O contraste da imagem final se torna reverso quando comparado com a coloração positiva.

Para partículas com alto ponto isoelétrico os corantes

negativos mais recomendados são: fosfotungstato, molibdato de amônia, oxalato, silicotungstato, oxalato de uranila. Para partículas com baixo ponto isoelétrico os corantes negativos mais recomendados são: acetato de uranila ou formato de uranila (HASCHEMEYER e MYERS, 1972).

3.6. Técnica de metalização ou sombreamento

Os objetivos gerais para o uso da técnica de metalização são os seguintes:

1. produzir o contraste de uma réplica
2. produzir efeito tridimensional
3. medição de altura ou tamanho de objetos
4. determinação de forma de objetos.

A técnica de metalização, segundo HENDERSON e GRIFFITHS (1972) foi originalmente desenvolvida por Williams e Wyckoff (1946) e exceto para o dimensionamento e caracterização de superfícies de bactérias e vírus, tem poucas aplicações para materiais biológicos. A técnica de metalização é muito utilizada para estudos de dimensionamento e forma de cristais de sais. Antes do desenvolvimento da técnica de coloração negativa, a técnica de metalização era considerada um dos meios de identificação de partículas pequenas.

De acordo com BRADLEY (1967), o grau de resolução obtido ao microscópio eletrônico, depende da espessura da cobertura e do metal utilizado. Em geral, metais eletrodensos com alto ponto de fusão dão partículas menores quando evaporadas, sendo a platina o metal mais conveniente e utilizado nesta Dissertação. Ouro, cromo, ouro/paládio, paládio

são também muito recomendados. Quando se requer altíssimas resoluções aconselha-se o uso da técnica de metalização com platina/carbono de Bradley (1959).

3.7. Técnica de autoradiografia

A autoradiografia é uma técnica que tem como objetivos localizar e visualizar um traçador radioativo dentro de uma célula, de um órgão ou de um organismo todo.

Essa técnica é de grande aplicação na Biologia e se baseia na propriedade das radiações emitidas pelos radioisótopos de sensibilizar emulsões fotográficas através da redução da prata.

Esse princípio aplica-se à macroautoradiografias, quando se deseja encontrar o traçador radioativo em grandes partes de um animal ou planta, bem como para autoradiografias a nível de microscopia óptica e eletrônica, esta última permitindo localizar a radioatividade em partículas subcelulares.

Para estudos de identificação de locais de síntese tanto de DNA como RNA virais, a autoradiografia a nível de microscopia óptica e eletrônica é a técnica mais utilizada.

Segundo BLUMEN e MERZEL (1976), foram Doniach e Pelc (1950) que descreveram a técnica do "Stripping-film" para autoradiografia a nível de microscopia óptica e Kopriwa e Leblond (1962) descreveram a técnica do "Dipping-film" também para microscopia óptica.

De acordo com BIENZ (1977), a técnica do "Dipping-film"

para autoradiografia a nível de microscopia eletrônica é de Salpeter(1966) e Kopriva (1973). A técnica de alça para microscopia eletrônica é de CARO e VAN TUBERGEN (1962) modificada por STEVENS (1966).

A técnica utilizada nesta Dissertação é a do "Streaking-film" (BIENZ, 1977) para autoradiografia a nível de microscopia óptica.

3.8. Síntese do DNA do vírus da poliedrose nuclear

SHIGEMATSU (1971) estudando o NPV de *B. mori* em hemócitos afirma que durante o curso da infecção ocorre uma degeneração da célula hospedeira no período de síntese do DNA viral com a formação dos cristais de proteína do poliedro.

Segundo AIZAWA (1963), dois dias após a infecção com o NPV, o conteúdo de RNA do citoplasma e do nucleolo aumenta acompanhando o aumento do DNA viral até o começo da formação do poliedro. Subsequentemente o nucleolo se desintegra e o conteúdo de RNA do citoplasma diminui.

Esse aumento do DNA viral até o começo da formação do poliedro é confirmado em estudos realizados por WATANABE (1972) com células de corpo gorduroso de *B. mori* afetadas pelo NPV. O autor também afirma que são nos filamentos de cromatina do núcleo que ocorre a síntese do DNA viral.

MORRIS (1968) estudando células do corpo gorduroso de Lepidoptera afirma que depois desse aumento progressivo a síntese decresce e cessa no momento em que os poliedros estão maduros.

HIMENO *et alii* (1976) realizaram estudos em cultura de

tecido de células embrionárias de *B. mori* através da incorporação do ^{32}P no DNA e RNA celulares. Através das células sadias e afetadas pelo NPV submetidas a tratamentos com cloranfenicol e mitomicina C foi demonstrado que a RNA-polimerase é mais estável que a DNA-polimerase codificadas pelo DNA viral.

Observou-se também nesse experimento que a presença do vírus pode provocar a inibição da síntese do DNA da célula hospedeira.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Hospedeiro utilizado

No presente estudo, os insetos utilizados foram lagartas híbridas de *Bombyx mori* L., 1758 (Lep., Bombycidae) (bicho da seda), procedentes de ranchos de criação da firma Indústrias de Seda Rivaben S. A. do município de Charqueada-SP.

As lagartas escolhidas para inoculação se encontravam no 3º estágio de desenvolvimento, medindo aproximadamente 1,5 cm de comprimento e foram inoculadas com vírus da poliedrose nuclear (NPV) um dia após a ecdise.

Lagartas sadias da mesma espécie e no mesmo estágio de desenvolvimento foram mantidas em laboratório como controle.

Foram utilizados dois lotes de 50 lagartas; um lote sofreu inoculação e outro serviu de controle. Apenas 3 ou 4 lagartas de cada lote foram submetidas aos tratamentos necessários para estudos a nível de microscopia. Todas as lagartas foram alimentadas com folhas de amoreira.

4.2. Fontes de inóculo e inoculação

Lagartas mortas de *B. mori* afetadas pelo NPV foram trituradas com água em liquidificador.

O suco obtido foi filtrado em algodão cru e centrifugado 2 vezes a 1000 rpm por 30 minutos numa ultracentrífuga BECKMAN Model L-2.

Os precipitados foram descartados.

O último sobrenadante foi ressuspensionado em água destilada e ultracentrifugado a 10000 rpm por 20 minutos.

O precipitado foi colocado em placas de Petri a 4°C por 24 horas para secagem.

Hemolinfa de lagartas afetadas ainda vivas, também foi utilizada para a inoculação após secagem em placas de Petri.

O inóculo na forma de pó seco foi ressuspensionado em água destilada e pincelado em folhas de amoreira sendo portanto realizada a inoculação através da via oral.

4.3. Tratamento alcalino para liberação das partículas de NPV do poliedro

Os poliedros contendo partículas de NPV foram tratados com base no método de SMITH (1967), apresentando algumas modificações.

Em água bidestilada e livre de CO₂ foi preparada uma solução de Na₂CO₃ 0,005 M mais uma solução de NaCl 0,5 M.

Utilizou-se 5 mg do inóculo para cada ml de solução.

A mistura foi conservada a 4°C por 100 minutos. Logo em seguida, foram retiradas várias amostras, as quais foram submetidas aos processos de coloração negativa e metalização.

4.3.1. *Coloração negativa*

Essa técnica (HUSLEY e ZUBAY, 1960) consiste na utilização de uma solução aquosa de acetato de uranila a 2,5%.

Sobre grades de cobre de 400 "mesh" previamente cobertas com películas de parlódio e carvão, foram depositadas, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, uma gota para cada amostra. Após a eliminação do excesso de líquido por meio de um papel de filtro, colocou-se uma gota de corante acetato de uranila, sendo também seu excesso retirado com papel de filtro.

Logo após as grades foram examinadas ao microscópio eletrônico.

4.3.2. *Metalização ou sombreamento*

O metal utilizado foi a platina.

Essa técnica foi realizada num metalizador VBG 500 da SIEMENS.

O processo consta do estabelecimento de uma diferença de potencial num filamento de tungstênio, o qual aquece um fio de platina que

se encontra enrolado no filamento. Esse aquecimento, a alto vácuo, chega até o ponto de fusão da platina, que se espalha em pequenos grânulos cobrindo as grades que se encontram dispostas no metalizador (WILLIAMS e WYCKOFF, 1946).

As grades utilizadas continham amostras do tratamento alcalino realizado com os poliedros. Posteriormente, essas grades foram levadas para o exame ao microscópio eletrônico.

4.4. Técnicas utilizadas para o tratamento do espécime

Foram coletados 4 ml de hemolinfa de lagartas de *B.mori* sadias e 4 ml de hemolinfa afetada pelo NPV, 10 a 12 dias após a inoculação. Essa hemolinfa foi centrifugada a 2000 rpm por 15 minutos para a obtenção dos hemócitos.

Foram dissecadas longitudinalmente lagartas sadias e afetadas pelo NPV e retirados pedaços do intestino médio com aproximadamente 5 mm de comprimento.

Tanto os hemócitos como os pedaços do intestino médio sofreram os seguintes tratamentos:

4.4.1. *Técnica usual a nível de microscopia eletrônica*

Fixação - com glutaraldeído 6,5% em tampão cacodilato
0,125 M pH 7,2 durante uma hora e meia a 4°C.

Pós-fixação - com ácido ósmico 2% em tampão cacodilato
0,125 M pH 7,2 durante uma hora, a 4°C.

Pré-coloração - em solução de acetato de uranila 2% dissolvido em acetona 75% durante toda noite.

Desidratação - 2 trocas em acetona 90% de 10 minutos cada, seguida de 3 trocas em acetona 100% de 20 minutos cada e mais 2 trocas em óxido de propileno de 15 minutos cada.

Infiltração - com resina Epon 812 (LUFT, 1961) acrescida de óxido de propileno nas seguintes proporções:
Epon 1:1 óxido de propileno - 2 horas - 37°C
Epon 2:1 óxido de propileno - 2 horas - 37°C
Epon puro durante toda a noite - 4°C.

Inclusão - os espécimes foram colocados em moldes de borracha apropriados juntamente com a resina pura. A polimerização da resina foi realizada levando-se os moldes contendo os espécimes, às estufas de 38°C, 45°C e 60°C durante 8, 16 e 32 horas, respectivamente.

Em seguida foi realizada a microtomia.

Essa mesma técnica foi utilizada para microscopia óptica

Microtomia

Foram feitos cortes ultra e semifinos dos espécimes sadio e doente, utilizando-se um ultramicrotomo de avanço mecânico, modelo MT-1, da SORVALL. Em ambos os casos, operou-se com navalhas de vidro cristal de 6 mm de espessura.

Os cortes ultra-finos, com espessura entre 0,03 e 0,06 μm foram colocados em grades de cobre de 400 "mesh" previamente cobertas com películas de parlódio e carvão.

Os cortes semifinos de 0,1 μm de espessura, foram colocados em lâminas de vidro previamente limpas com detergente e solução álcool 1:1 eter.

Coloração dos cortes

A coloração dos cortes semifinos foi realizada com azul de metileno filtrado e colocado sobre os cortes.

As lâminas contendo os cortes, foram aquecidas por um minuto e o excesso do corante foi retirado com água destilada corrente; as lâminas foram colocadas para secar a 37°C e logo após levadas para o exame ao microscópio óptico.

A coloração dos cortes ultra-finos, foi realizada com uma solução aquosa de acetato de uranila 2,5% durante 6 minutos.

Os cortes ultra-finos ainda foram coloridos com solução de citrato de chumbo (REYNOLDS, 1962) durante 4 minutos e logo após examinadas ao M.E.

4.4.2. Autoradiografia

Em lagartas de *B. mori* sadias e afetadas pelo NPV após 10 a 12 dias da inoculação foi injetado 1 μ l de timidina tritiada (NEW ENGLAND NUCLEAR) por lagarta. Esse precursor radioativo apresentava-se com uma atividade específica de 20 Ci/mmol numa concentração de 0,25 m Ci/0,5 ml de água estéril.

Após 6 horas de tratamento as lagartas foram dissecadas longitudinalmente utilizando-se fragmentos do corpo gorduroso que foram fixados em glutaraldeído 6,5% em tampão cacodilato 0,125 M pH 7,2 por 8 horas.

Em seguida foram feitas em torno de 10 lavagens em tampão cacodilato 0,125 M pH 7,2 durante 24 horas.

Após esse tratamento, os espécimes seguiram os processos da técnica usual de microscopia eletrônica, já citada.

4.4.2.1. Técnica do "Streaking-film" para microscopia óptica (BIENZ, 1977)

Após a microtomia, os cortes semifinos foram cobertos com emulsão fotográfica Ilford L-4 Nuclear Research da CIBA-GEIGY.

A emulsão foi diluída em água bidistilada (1:1) em banho-maria a 45°C. Após a diluição foi mantida a 32°C.

Foram colocadas com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, 2 a 3 gotas da emulsão sobre cada lâmina. Essas gotas foram espalhadas e

as lâminas foram colocadas em caixas pretas vedadas, a 4°C e atmosfera seca.

Toda vidraria usada para manipulação da emulsão fotográfica foi previamente fervida em solução de H₂O₂ a 15% por aproximadamente, 20 minutos, lavada com água destilada e secada em estufa.

Foram retiradas amostras 10 dias posteriores a cobertura obtendo-se assim o tempo de exposição adequado.

Após o tempo de exposição as lâminas foram reveladas com revelador Dektol da KODAK durante 4 minutos e fixadas com fixador KODAK para papel durante 5 minutos, ambos a 22°C.

As lâminas foram lavadas em água destilada corrente e postas para secar a 37°C. Logo após coloridas e levadas para o exame ao microscópio óptico.

4.5. Exame dos espécimes

As grades contendo os cortes ultrafinos foram examinados num microscópio eletrônico de transmissão Elmiskop IA da SIEMENS, operando a 80000 volts.

Os negativos fotográficos foram obtidos utilizando-se chapas de vidro tipo Projector Slide Plates da KODAK, de 6,5 x 9 cm.

As lâminas de vidro contendo os cortes semifinos foram examinados num Fotomicroscópio II da ZEISS.

Os negativos fotográficos foram obtidos utilizando-se um

filme rígido Panatomic X de ASA 32 da KODAK.

As fotomicrografias foram obtidas através dos processos fotográficos comumente usados em laboratório.

4.6. Técnica para as medidas de partículas de vírus

As chapas fotográficas que continham as partículas de vírus da poliedrose nuclear em células colunares do intestino médio de *A. gemmatalis* (GATTI *et alii*, 1977) e *B. mori* foram levadas a um ampliador fotográfico Focomat II C da LEITZ-WETZLAR a fim de se medir os comprimentos e larguras das partículas através da projeção.

4.7. Técnica para as medidas de densidade de grãos de prata

Através das fotomicrografias obtidas ao microscópio óptico, foi anotado o número de grãos de prata em regiões nuclear e citoplasmática das células sadias e afetadas.

Através de um planímetro foram medidas as áreas correspondentes para cada região e calculada a densidade dos grãos de prata.

4.8. Testes estatísticos aplicados

Foram realizados testes F e de Tukey com as medidas das partículas de NPV em células colunares do intestino médio de *B. mori* e *A. gemmatalis*. Os mesmos testes foram realizados com as densidades de

grãos de prata encontradas em núcleos de células do corpo gorduroso de *B. mori* afetados pelo NPV e sadios. Também foram aplicados os testes com as medidas de núcleos doentes e sadios.

5. RESULTADOS

5.1. Estudos com o vírus da poliedrose nuclear (NPV) afetando núcleos de células colunares do intestino médio de lagartas de *B. mori* e *A. gemmatalis*

Das eletrofotomicrografias obtidas pode-se observar a ocorrência de partículas de NPV em núcleos de células colunares do intestino médio de *B. mori* afetadas. Essas partículas foram encontradas tanto incluídas em poliedros nucleares (Fig. 1A) como em nucleoplasma de células (Fig. 1B).

No nucleoplasma foram encontradas partículas isoladas ou em feixes, apresentando-se na forma de bastonetes envolvidos ou não por dupla membrana (Fig. 1B).

A Fig. 1C demonstra a ocorrência de partículas de NPV envolvidas por uma membrana quase circular. Essas partículas estão localizadas fora da célula colunar, provavelmente na região da membrana basal.

As medidas de 40 partículas de vírus, sendo 40 encontradas em núcleos de células colunares do intestino médio de *B. mori* e 40 encontradas em núcleos de células colunares do intestino médio de *A. gemmatalis* (GATTI *et alii*, 1977) bem como os resultados dos testes F e de Tukey realizados estão dispostos na Tabela 1.

As análises dos testes F e de Tukey realizadas com as partículas de NPV encontradas em *B. mori* e *A. gemmatalis* mostraram não haver diferenças significativas entre os comprimentos dessas partículas, tanto com dupla como sem membranas.

As análises dos testes F e de Tukey realizados para as medidas de largura, demonstraram que as partículas encontradas em *B. mori* apresentam largura maior que as encontradas em *A. gemmatalis*.

As medidas de 40 partículas de vírus sem membranas, sendo 20 encontradas em nucleoplasma de células de *B. mori* e 20 encontradas em poliedros desses mesmos núcleos, bem como os resultados dos testes F e de Tukey realizados estão dispostos na Tabela 2.

As análises dos testes F e de Tukey realizadas com partículas de NPV sem membranas, encontradas no nucleoplasma de células de *B. mori* e nos poliedros desses mesmos núcleos, revelaram que as do nucleoplasma são maiores que as dos poliedros.

Tabela 1 - Comprimentos e larguras das partículas de NPV com e sem membranas em células colunares do intestino médio de *B. mori* e *A. gemmatalis* e os resultados dos testes F e de Tukey.

NPV em células de <i>B. mori</i>				NPV em células de <i>A. gemmatalis</i>			
comp. c/ memb. (nm)	comp. s/ memb. (nm)	larg. c/ memb. (nm)	larg. s/ memb. (nm)	comp. c/ memb. (nm)	comp. s/ memb. (nm)	larg. c/ memb. (nm)	larg. s/ memb. (nm)
384,5	306,0	90,0	49,0	322,2	225,5	92,9	46,4
379,6	314,1	98,1	44,1	322,2	322,2	92,9	46,4
368,1	289,6	98,1	44,1	332,9	322,2	101,4	42,2
351,8	281,4	106,3	49,0	302,0	343,6	92,8	50,7
376,3	319,0	109,6	49,0	322,2	360,3	101,4	46,4
351,8	281,4	93,2	52,3	281,9	332,6	92,9	54,9
363,2	273,2	117,8	44,1	268,5	332,6	101,4	46,4
335,4	281,4	93,2	40,9	257,7	332,6	109,8	46,4
343,6	265,0	117,8	60,5	343,6	324,2	109,8	42,2
346,9	278,1	114,5	52,3	343,6	229,1	101,4	46,4
363,2	297,8	117,8	44,1	343,6	229,1	92,9	54,9
368,1	281,4	117,8	49,0	300,7	229,1	91,5	40,3
387,8	297,8	101,4	57,2	300,7	257,7	99,8	40,3
351,8	270,0	117,8	49,0	390,8	257,7	99,8	40,3
351,8	281,4	109,6	49,0	382,4	257,7	107,4	50,3
368,1	302,7	122,7	40,9	443,4	257,7	80,5	40,3
360,0	270,0	117,8	52,3	415,7	279,2	80,5	40,3
404,1	306,0	90,0	52,3	408,1	257,7	85,9	40,3
404,1	338,7	90,0	49,0	386,6	257,7	85,9	42,9
343,6	327,2	106,3	49,0	434,9	257,7	68,7	51,5
384,5	286,3	106,3	49,0	370,5	257,7	73,0	42,9
363,2	306,0	117,3	49,0	375,9	267,3	73,0	46,0
338,7	300,0	93,2	52,3	289,9	267,3	73,0	42,9
355,0	306,0	85,0	44,1	311,4	279,2	68,7	41,6
343,6	297,8	114,5	44,1	347,9	313,5	81,6	41,6
378,4	273,2	98,1	57,2	309,2	274,9	68,7	42,9
327,2	261,8	114,5	55,6	300,6	279,2	80,5	33,3
409,0	317,4	114,5	61,3	309,2	274,9	114,5	42,9
360,0	284,7	90,0	55,6	274,9	257,7	107,3	32,2
343,6	278,1	92,0	55,6	343,6	283,5	100,2	32,2
368,1	310,9	96,1	40,9	262,0	223,3	100,2	33,0
419,3	327,2	122,7	45,0	359,7	306,0	114,5	53,6
319,3	331,3	102,2	45,0	357,9	300,6	100,2	57,2
341,5	286,3	112,5	61,3	386,5	336,4	107,3	57,2
341,5	276,1	112,5	51,1	357,9	300,6	73,3	57,2
341,5	286,3	122,7	55,2	343,6	279,2	68,7	57,2
409,0	319,0	114,5	46,3	350,8	293,5	77,3	57,2
368,1	305,4	122,7	54,5	372,2	322,1	73,0	57,2
340,9	250,9	114,5	60,0	357,9	322,1	77,3	64,4
343,6	284,7	93,2	55,6	309,2	286,4	80,5	42,9

$\bar{x}=356,3$ $\bar{x}=293,8$ $\bar{x}=106,7$ $\bar{x}=50,4$ $\bar{x}=339,9$ $\bar{x}=284,6$ $\bar{x}=90,2$ $\bar{x}=46,1$

\bar{x} = média

continua...

continuação

Partículas	de NPV	Hospedeiros		F	Tukey (Δ)
		<i>B.mori</i>	<i>A.gemmatalis</i>		
Comprimento (nm)	c/membrana ¹	356,3	339,9	1,01 ^{ns}	32,73
	s/membrana ²	293,8	284,6	1,92 ^{ns}	13,26
Largura (nm)	c/membrana ³	106,7	90,2	32,69 ^{**}	5,81
	s/membrana ⁴	50,4	46,1	7,84 ^{**}	3,08

ns - não significativo

** - significativo a nível de 1% de probabilidade

1 diferença de médias para o teste de Tukey = 16,4^{ns}

2 diferença de médias para o teste de Tukey = 9,2^{ns}

3 diferença de médias para o teste de Tukey = 16,5^{**}

4 diferença de médias para o teste de Tukey = 4,3^{**}

Tabela 2 - Comprimentos e larguras das partículas de NPV sem membranas encontradas em nucleoplasma e poliedro de células colunares do intestino médio de *B. mori* e os resultados dos testes F e de Tukey

Nucleoplasma comp.s/membr.(nm)	Poliedro comp.s/membr.(nm)	Nucleoplasma larg.s/membr.(nm)	Poliedro larg.s/membr.(nm)
327,2	281,4	49,0	44,1
281,4	270,0	44,1	44,1
286,3	281,4	57,2	52,3
289,6	270,0	44,1	44,1
310,9	253,6	49,0	40,9
319,0	253,6	49,0	36,0
289,6	278,1	40,9	49,0
289,6	273,2	52,3	40,9
273,2	278,1	49,0	36,0
289,6	245,4	52,3	44,1
286,6	273,2	49,0	40,9
310,9	281,4	40,9	44,1
327,2	281,4	45,0	40,9
297,8	286,3	49,0	49,0
331,3	273,2	45,0	49,0
319,0	270,0	52,3	52,3
286,3	270,0	40,9	40,9
317,4	278,1	52,3	40,9
281,4	245,4	40,9	36,0
289,6	273,2	44,1	40,9
$\bar{x}=300,2$	$\bar{x}=270,9$	$\bar{x}=47,3$	$\bar{x}=43,3$

\bar{x} = média

Partículas de NPV	Nucleoplasma	Poliedro	F	Tukey (Δ)
Comprimento ¹ s/membr.(nm)	300,2	270,9	36,88**	9,78
Largura ² s/membr.(nm)	47,3	43,3	6,86*	3,09

* significativo a nível de 5% de probabilidade

** significativo a nível de 1% de probabilidade

¹ diferença de médias para o teste de Tukey = 29,3**

² diferença de médias para o teste de Tukey = 4,0**

5.2. Estudos com o vírus da poliedrose nuclear (NPV) afetando núcleos de células da hemolinfa de lagartas de *B. mori*

Foi observado através de eletrofotomicrografias (Fig. 2) a formação de poliedros em hemócitos de *B. mori* afetados pelo NPV.

Os poliedros nessas células apresentam uma região central menos densa de aparência amorfa e um bordo mais denso (Fig. 2C).

Pode-se observar através da Fig. 2 etapas sequenciais da degeneração do hemócito até que o poliedro se torne livre na hemocela do inseto.

5.3. Estudos com o vírus da poliedrose nuclear (NPV) afetando núcleos de células do corpo gorduroso de lagartas de *B. mori*

Das fotomicrografias ao microscópio óptico pode-se observar a ocorrência de poliedros (Fig. 3D) em núcleos de células do corpo gorduroso de lagartas de *B. mori* afetados pelo NPV. Nos núcleos de células sadias não foi observada a ocorrência desses poliedros (Fig. 3B).

Foi observada também a formação do estroma virogênico, local de formação da partícula de vírus a partir de proteínas e ácido nucleico virais (Fig. 3C).

Nas células afetadas pelo NPV foi observado um aumento relativamente grande dos núcleos (Fig. 3A e 3C) quando comparados com núcleos de células sadias (Fig. 3B).

As medidas das áreas dos núcleos doentes e sadios e os resultados dos testes F e de Tukey são encontrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Áreas dos núcleos de células do corpo gorduroso de lagartas de *B. mori* afetados pelo NPV e sadios

Áreas dos núcleos afetados (μm^2)		Áreas dos núcleos sadios (μm^2)	
8,31	12,09	2,56	2,88
32,99	18,65	3,20	3,36
23,32	6,74	1,92	3,36
31,95	28,50	2,88	2,56
15,20	11,23	2,72	3,20
15,03	20,56	1,76	3,68
12,09	11,05	1,60	4,00
16,75	13,30	2,72	3,20
15,54	8,98	1,92	5,92
6,05	14,68	2,08	2,40
13,82	14,51	2,56	2,72
6,91	15,72	4,96	2,88
11,05		2,72	
$\bar{x} = 15,80$		$\bar{x} = 2,95$	

\bar{x} = média

Áreas			
Afetadas	Sadias	F	Tukey (Δ)
15,80	2,95	38,14**	5,92

** Significativo a nível de 1% de probabilidade
Diferença de médias para o teste de Tukey = 13,85**

Através das medidas das áreas dos núcleos encontrou-se um volume médio de $47,24 \mu\text{m}^3$ para o núcleo afetado pelo vírus e $3,81 \mu\text{m}^3$ para o núcleo sadio e a razão de 12,4:1 entre os dois.

A presença dos grãos de prata (Fig. 3) tanto em núcleos como citoplasma de células do corpo gorduroso de *B. mori* afetados e sadios levaram ao cálculo da densidade ($\text{gr}/\mu\text{m}^2$) dos grãos encontrados nas regiões nucleares e citoplasmáticas dessas células (Tabela 4).

As análises dos testes F e de Tukey realizadas com as densidades de grãos de prata em regiões nucleares afetadas e sadias demonstraram haver uma maior concentração de timidina tritiada nos núcleos doentes (Tabela 4).

As análises dos testes F e de Tukey realizadas com as densidades de grãos de prata em regiões citoplasmáticas afetadas e sadias demonstraram não haver diferenças significativas entre elas (Tabela 4).

5.4. Liberação das partículas de NPV do poliedro

Após o tratamento alcalino dos poliedros contendo partículas de NPV foram encontradas partículas íntegras (Fig. 4A) e parcialmente vazias (Fig. 4B).

A Fig. 4C demonstra um poliedro que não sofreu desintegração. Ao lado nota-se uma partícula de vírus.

O acetato de uranila a 2,5% mostrou maior eficiência de

Tabela 4 - Densidades dos grãos de prata em regiões nucleares e citoplasmáticas de células do corpo gorduroso de lagartas de *B. mori* afetadas pelo NPV e sadias

Células afetadas pelo NPV		Células sadias	
densidade (grãos/ μm^2) da região		densidade (grãos/ μm^2) da região	
nuclear	citoplasmática	nuclear	citoplasmática
0,53	0,09	0,48	0,26
0,91	0,03	0,42	0,54
0,20	0,45	0,17	0,21
0,12	0,37	0,21	0,27
2,17	0,15	0,00	0,26
5,57	0,29	0,31	0,34
5,09	0,33	0,56	0,33
1,27	0,25	0,45	0,44
0,35	0,01	0,28	0,40
0,88	0,03	1,47	0,41
0,92	0,05	0,20	0,22
3,19	0,28	0,42	0,19
1,42	0,34	0,17	0,19
2,09	0,28	0,34	0,18
1,75	0,27	0,05	0,06
1,08	0,70	0,17	0,28
1,27	0,89	0,16	0,15
3,24	0,99	0,26	0,19
0,63	0,08	0,05	0,07
0,56	0,07	0,00	0,06
0,35	0,09	0,11	0,19
0,56	0,17	0,41	0,29
1,17	0,04	0,21	0,15
0,92	0,04	0,30	0,20
1,47	0,13	0,26	0,14
$\bar{x}=1,51$	$\bar{x}=0,26$	$\bar{x}=0,30$	$\bar{x}=0,24$

\bar{x} = média

Regiões	Doente	Sadia	F	Tukey (Δ)
Nuclear ¹ (gr/ μm^2)	1,51	0,30	8,47**	1,18
Citoplasmática ² (gr/ μm^2)	0,26	0,24		0,12

** - significativo a nível de 1% de probabilidade

¹ diferença de médias para o teste de Tukey = 1,21**

² diferença de médias para o teste de Tukey = 0,02^{ns}

coloração do que o ácido fosfotungstico (PTA) normalmente utilizado para colorações negativas (Fig. 4A, 4B e 4C).

A Fig. 4D demonstra partículas de NPV e cristais parcialmente destruídos após o tratamento alcalino e a metalização com platina.

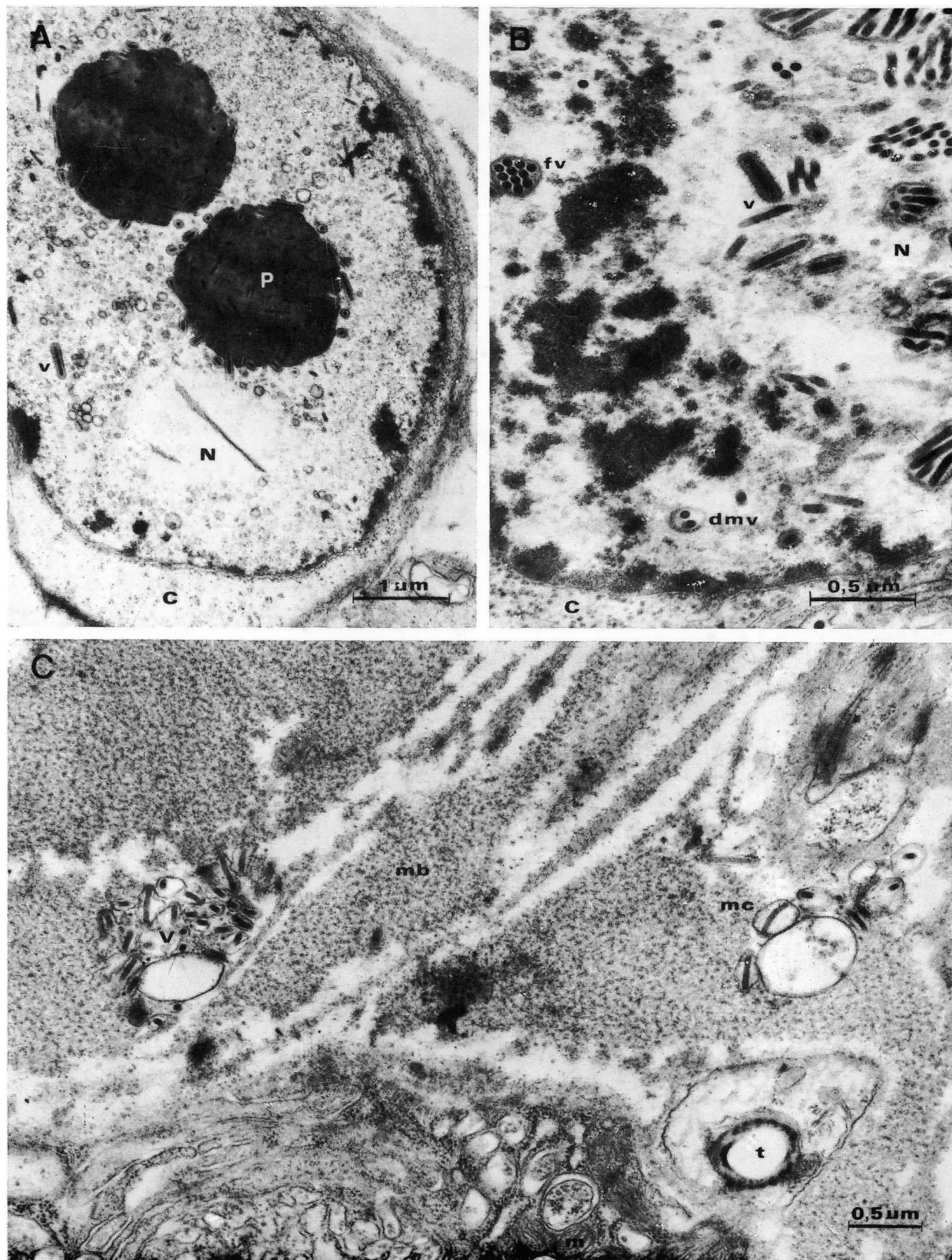


Fig. 1 - Células colunares do intestino médio de *B. mori* afetadas pelo NPV. C= citoplasma, N= núcleo, P= poliedro, v= partículas de vírus, fv= feixe de vírus, dms= dupla membrana do vírus, mb= membrana basal, mc= membrana circular, t= traquéia, m= mitocôndria.

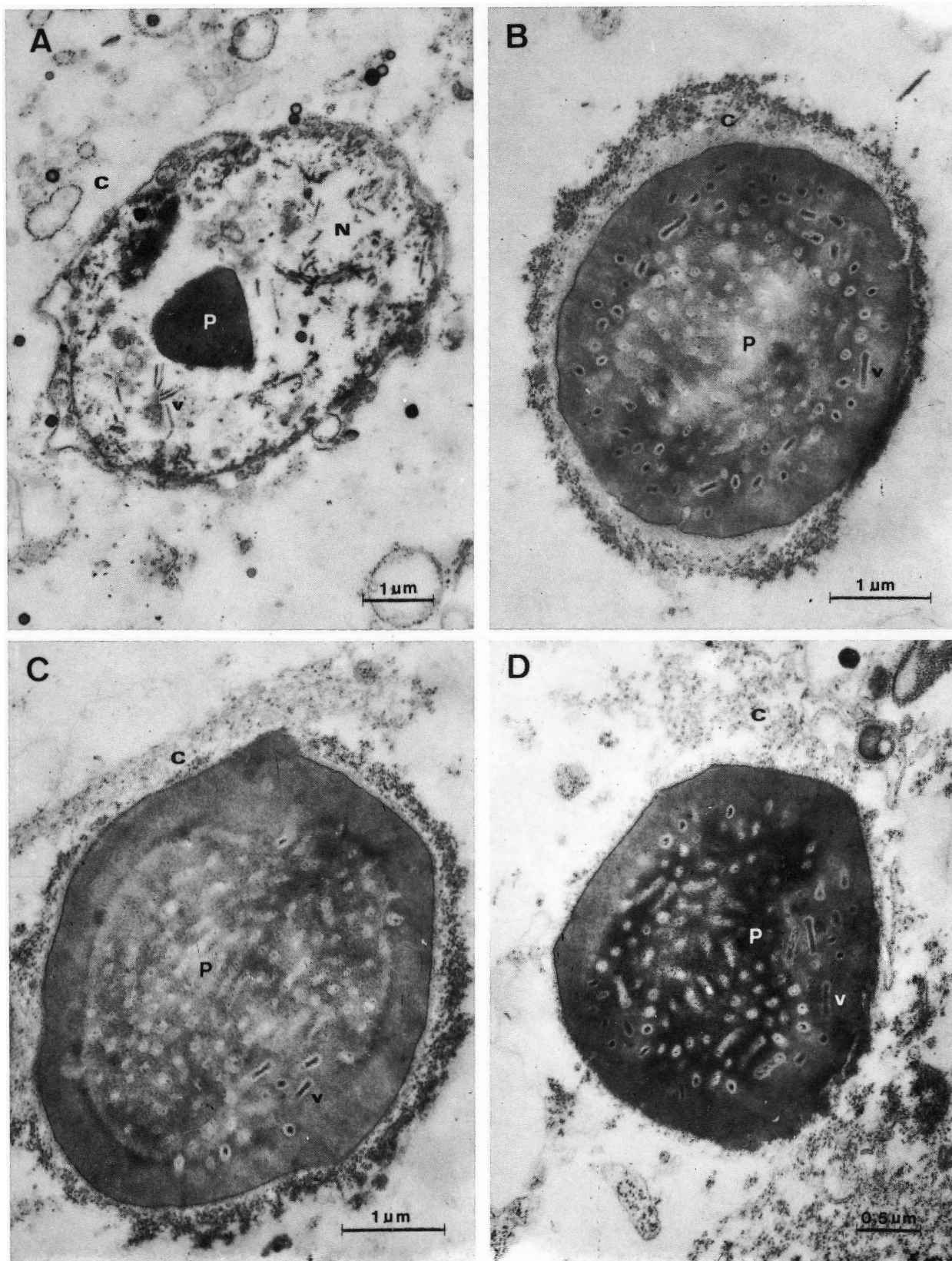


Fig. 2 - Desenvolvimento do NPV em hemócitos de *B. mori*. C= citoplasma, N= núcleo, P= poliedro, v= partículas de vírus.

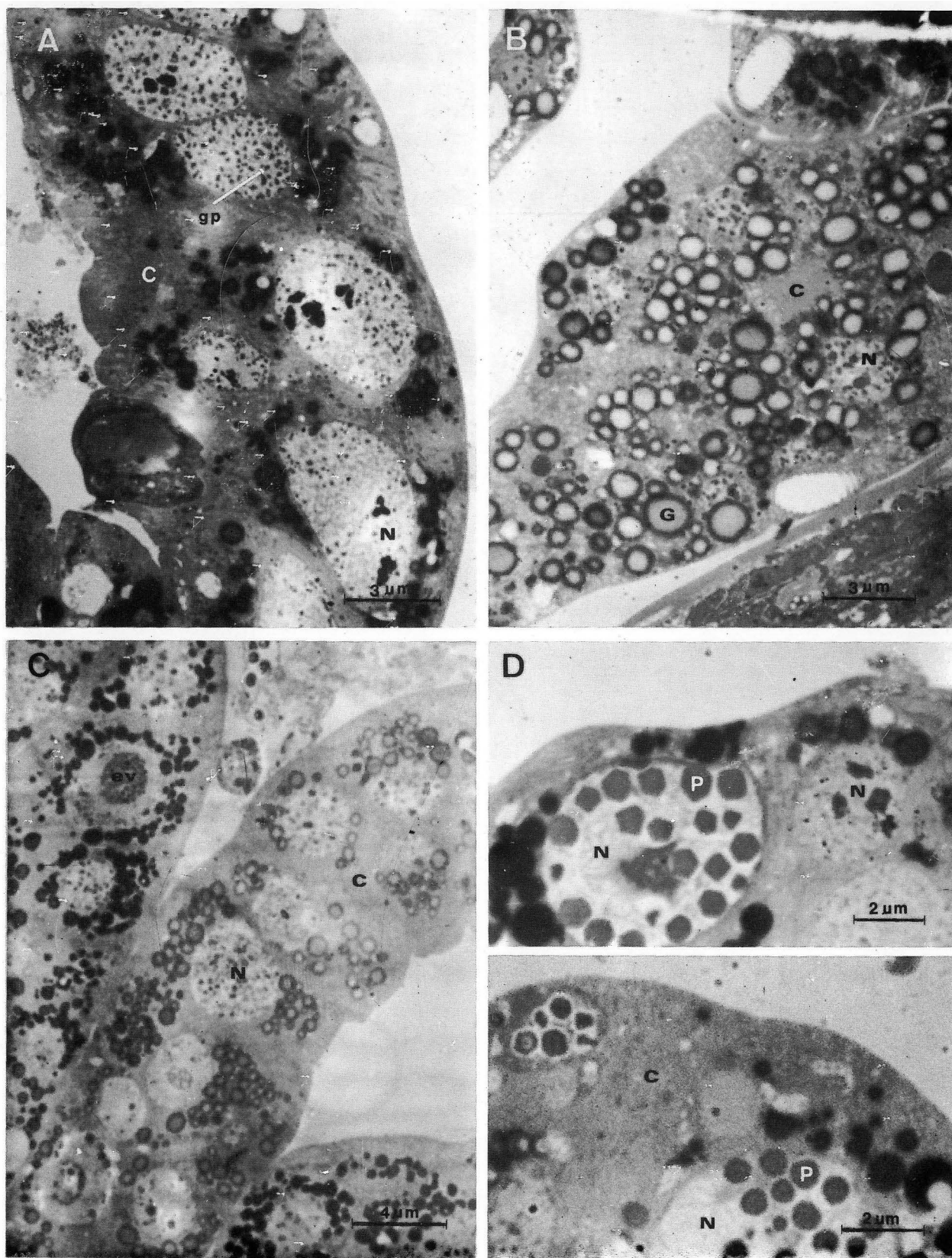


Fig. 3 - Células do corpo gorduroso de *B. mori*. A, C e D = Células afetadas pelo NPV. B = Células saudáveis. C= citoplasma, N= núcleo, G= gotícula de gordura, gp= grãos de prata, ev= estroma virogênico, P= poliedro.

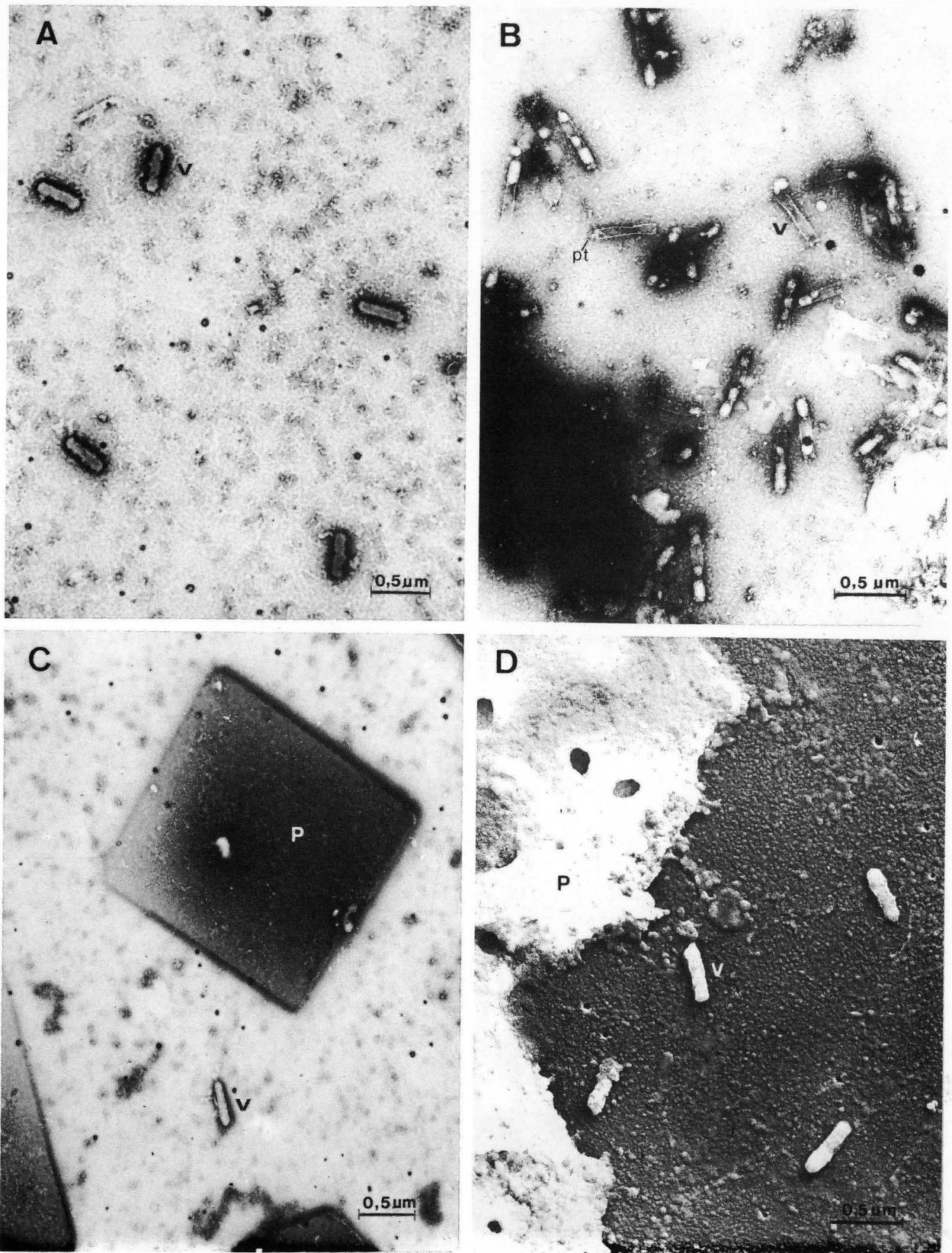


Fig. 4 - Partículas de NPV liberadas do poliedro. Coloração negativa com acetato de uranila 2,5%
 A = Partículas íntegras (v). B = partículas parcialmente destruídas (v), protusão da
 partícula (pt), C = poliedro (P), partícula de vírus (v). Metalização com platina: D =
 poliedro (P), partículas de vírus (v).

6. DISCUSSÃO

A literatura sobre poliedrose nuclear em insetos apresenta muitos fatos conflitantes, inexplicáveis além de certos conceitos carentes de dados mais seguros e por isso mesmo discutíveis.

Na presente Dissertação foram propostos objetivos que visaram estudar alguns aspectos sobre o modo de ação do vírus da poliedrose nuclear que ocorre em duas espécies de Lepidoptera: *B. mori* e *A. gemmatalis*, além do dimensionamento das partículas infecciosas e incorporação do precursor radioativo no DNA viral.

Com respeito ao modo de ação do vírus, é interessante lembrar que o NPV pode ser transmitido pela via transovariana (SMITH, 1967), fato este de grande importância prática, esclarecendo uma das maneiras pelas quais pode ser iniciada uma epizotia.

O exame das fotomicrografias obtidas nesta pesquisa revelaram a ocorrência das partículas do NPV em núcleos de células do corpo gorduroso (Fig. 3) e de células colunares do intestino médio (Fig. 1) de *B. mori* e que o vírus estudado pertence a um grupo distinto daqueles que

não afetam células do intestino médio. Esse é um dos pontos que levanta dúvidas a respeito de uma especificidade celular real ou se devido à necessidade de estudos mais completos, é dependente de fatores exógenos ou endógenos.

As eletrofotomicrografias mostraram também que partículas de NPV completas e desprovidas de membranas em grande quantidade no núcleo celular (Fig. 1A e 1B) além das que se encontraram fora da célula nas adjacências da membrana basal (Fig. 1C) e hemócitos (Fig. 2) compõem um quadro indicativo sobre as etapas de sistematização da doença em *B. mori* que coincidem com as descritas para o NPV por diversos autores (SMITH, 1967; HARRAP, 1970; TANAOA, 1975) com referência a poliedros nuclear de insetos.

As fotomicrografias revelaram também que a formação de poliedros parece ocorrer no final do ciclo da doença e em muitos casos foi observada a zona anelar mencionada por diversos autores (SMITH e XEROS, 1953b; MARTIGNONI e SCALLION, 1961; BERGOLO, 1963), conforme se pode notar na Fig. 3D. Essa fase realmente ocorre após a formação de áreas granulares no núcleo as quais tem sido caracterizadas como estroma virogênico (Fig. 3C) por vários pesquisadores (XEROS, 1955, 1956; HARRAP, 1972b). Cabe aqui mencionar que os experimentos iniciais levaram os autores a afirmarem que o local de síntese das partículas era constituído de massas de cromatina nuclear (SMITH e XEROS, 1953b; BERGOLD, 1963), mas pelos conhecimentos atuais parece mais razoável o estroma como área de acumulação de DNA e proteínas virais transcritas e codificadas pelo próprio DNA viral.

Com respeito à formação dos poliedros como etapa final da doença existem diversos aspectos suscetíveis de discussão, pois os conceitos de natureza bioquímica merecem ainda considerações diversas em vista da

potencial função protetora das partículas do NPV (HARRAP e ROBERTSON, 1968).

Há autores que repetidamente afirmam que a formação dos poliedros ocorre como decorrência de distorções do metabolismo celular dando a entender que tais distorções estão indiretamente relacionadas com a replicação do vírus (SMITH e XEROS, 1953b; Vago e Chastang, 1960, citados por VAUGHN, 1968; THOMAS e GOURANTON, 1975). SHIGEMATSU e SUZUKI (1971) num trabalho clássico convincentemente estabelece a forma básica trapezoidal equilátera para explicar as diversas formas de ocorrência dos cristais com formas hexagonais, quadradas e triangulares e acrescentam que a forma dos poliedros não seria dirigida pela natureza genética do vírus mas dependeria de processos distintos causados por um defeito na sequência metabólica das células hospedeiras.

Essa conceituação parece atribuir importância secundária para a síntese das macromoléculas protéicas cuja natureza física e química reflete o tipo e a sequência dos aminoácidos codificados pelo DNA viral. Essa proteína contendo alta concentração dos ácidos aspártico e glutâmico, além de lisina e tirosina (SHIGEMATSU e SUZUKI, 1971) não é encontrada em células sadias. Tudo indica que é uma proteína cuja síntese se inicia nos estágios finais do ciclo por um tipo de regulação semelhante ao das proteínas tardias encontradas no bacteriófago T2 de *E. coli* (WATSON, 1976; LURIA e DARNELL, 1978).

Outra consideração relacionada a essa etapa do ciclo da poliedrose é que no início da formação dos poliedros observada nesta Dissertação (Fig. 3A) notou-se incorporação de timidina tritiada, revelan

do que a atividade biossintética do vírus e da célula hospedeira podiam estar em franco andamento. Essa observação parece indicar que a biossíntese das proteínas do poliedro independe até certo ponto do grau de degeneração da célula hospedeira.

Embora a evolução da doença iniciada pelas células do ovário infectado ou por infecção através das células do intestino médio se desenvolva segundo um padrão muito semelhante nas células do corpo gorduroso ou colunares, é possível que o desenvolvimento dos poliedros tenham significativas diferenças como se observou nas várias fases da organização dos poliedros em hemócitos (Fig. 2).

TANADA e HESS (1975) estudando a poliedrose nuclear em *Pseudaletia unipuncta* descrevem com detalhe o processo de sistematização a partir do núcleo da célula colunar pelos poros nucleares formando cisternas ou invaginações no envelope nuclear e por esse meio passando para o citoplasma. Partículas com ou sem membranas posteriormente atravessam as membranas da célula que por meio do retículo endoplasmático alcançam outras células, a membrana basal, células epiteliais da traquéia ou hemócitos. Nessa descrição não há menção sobre um aspecto particular dos poliedros em hemócitos que apresentam uma região central menos densa de aparência amorfa e um bordo espesso mais denso (Fig. 2C). Observou-se também etapas sequenciais da degeneração da célula hospedeira até que o poliedro se tornasse livre na hemocela do inseto (Fig. 2).

Nas células do corpo gorduroso logo no início da infecção se observou característica hipertrofia do núcleo, quando se comparou células doentes (Fig. 3A) com sadias (Fig. 3B).

Na presente Dissertação contudo, para se ter uma idéia da razão média entre o volume dos núcleos hipertrofiados com os primeiros sintomas da doença foram medidas as áreas dos núcleos doentes e sadios. A análise estatística demonstrou uma diferença entre eles a nível de 1% de probabilidade (Tabela 3) e a razão encontrada entre os volumes foi da ordem de 12,4:1.

O interesse pelo estudo das dimensões das partículas do vírus nasceu da observação das diferenças entre as dimensões das partículas do NPV encontradas na literatura (BERGOLD, 1963; KOSLOV e ALEXEENKO, 1967). Adicionalmente esse interesse tornou-se maior devido aos resultados do trabalho de KOSAKA *et alii* (1971) determinando pelo menos dois tipos de partículas infecciosas de NPV (330 x 80 nm e 360 x 60 nm).

Sabe-se que as populações naturais de vírus são constituídas de uma mistura de raças podendo mesmo haver predominância de uma delas de acordo com o tecido ou espécie de inseto. Por esse motivo, foram determinados os comprimentos e as larguras das partículas do NPV em lagartas de *A. gemmatalis* e *B. mori* (Tabela 1). Tomadas as medidas através de extensiva e variada amostragem, visando caracterizá-la do ponto de vista estatístico para compensar o posicionamento das partículas no tecido, os dados foram analisados pelos testes F e de Tukey (Tabela 1). Os resultados parecem indicar a influência da espécie do inseto hospedeiro, pois, foram encontradas diferenças significativas entre as larguras das partículas com e sem membranas em núcleos de células colunares do intestino de *B. mori* e *A. gemmatalis*.

Apesar de não terem sido encontradas diferenças entre os comprimentos das partículas com e sem membranas nos tecidos das lagartas

dos dois insetos (Tabela 1), não pode ser descartada a possibilidade da influência do microambiente celular.

A ocorrência de partículas de vírus no interior dos poliedros (Fig. 1A) e partículas livres no nucleoplasma (Fig. 1B) sugere a possível influência dessas condições sobre o dimensionamento das mesmas.

Tomando-se como base apenas o nucleocapsídeo das partículas incluídas no poliedro e das partículas livres no nucleoplasma foram feitas amostragens das fotomicrografias e as dimensões das partículas foram analisadas pelos testes F e de Tukey (Tabela 2). Os resultados mostraram que tanto o comprimento como a largura do NPV diferem significativamente sugerindo um efeito de natureza mecânica exercido pelas macromoléculas da proteína do poliedro sobre o vírus. Contudo, não fica de todo eliminada a possibilidade de partículas de NPV diferenciadas sejam preferencialmente incluídas (HARRAP, 1972b), pois, ao que se sabe, em muitos casos, apenas 5% do peso do poliedro é constituído de vírus (BERGOLD, 1963).

Os resultados do dimensionamento das partículas obtidas nesta Dissertação levanta, em última análise, o problema dos fatores que podem influir nas dimensões ressaltando a relação das mesmas *in vivo* e *in vitro*. Em tese, para os vírus complexos como o NPV há necessidade de experimentos planejados para se avaliar com segurança até que ponto atuam a seleção de raças do vírus, o genótipo do mesmo e o microambiente em que ele se desenvolve.

As pesquisas autoradiográficas a nível de microscopia óptica com o objetivo de estudar a incorporação do precursor radioativo, timidina tritiada, no DNA do NPV replicado nas células do corpo gorduroso

de lagartas de *B. mori* indicaram que a maior atividade de biossíntese, medida em termos de grãos de prata/área ($\text{gr}/\mu\text{m}^2$), foi realmente maior nos núcleos afetados pelo NPV do que nos núcleos saudios. Os testes F e de Tukey (Tabela 4) acusaram uma diferença altamente significativa.

Entre as densidades de grãos de prata da região citoplasmática das células do corpo gorduroso afetadas e saudias, não foi possível estabelecer diferenças significativas a nível de 5% de probabilidade (Tabela 4).

Esses resultados parecem indicar que quando as lagartas mostraram os primeiros sintomas, a incorporação da timidina tritiada devia estar se dando nas fases exponencial e estacionária, de acordo com o modelo de multiplicação do NPV proposto por RAGHOW e GRACE (1974). Essa afirmação se baseia no fato de ter sido encontrada uma atividade de incorporação da timidina marcada no DNA viral 6,2 vezes maior no núcleo doente do que no sadio.

No tratamento alcalino com solução de Na_2CO_3 0,005 M e NaCl 0,5 M foram encontradas, após 100 minutos partículas íntegras (Fig. 4A) e sem o nucleocapsídeo interno (Fig. 4B). Esse fato revela que o processo de liberação das partículas de vírus que se encontram nos poliedros merece especial atenção a fim de que o rendimento em termos de partículas íntegras seja alto. Aliás, as citações da literatura enfatizam a relativa estabilidade das mesmas em tratamentos com soluções alcalinas mostrando a necessidade de adatar os métodos de uma espécie de inseto para outra (BERGOLD, 1963) já que os poliedros nucleares podem variar tanto no tamanho como na forma (SMITH, 1967).

O exame ao microscópio eletrônico dos poliedros tratados com álcali mostrou que algumas partículas alteradas apresentaram protuberâncias (Fig. 4B) semelhantes às encontradas em partículas íntegras no processo de infecção da célula (BERGOLD, 1963).

As medidas das partículas de NPV liberadas pelo tratamento alcalino foram de 361 x 52 nm em coloração negativa com acetato de uranila e 400 x 85 nm pela técnica de metalização.

As medidas das partículas em acetato de uranila parecem estar de acordo com a literatura que prevê um tamanho menor para as partículas de NPV submetidas a tratamento alcalino (BERGOLD, 1963).

O tamanho das partículas de NPV submetidas à técnica de metalização (Fig. 4D) parecem coerentes desde que o processo se fundamenta na cobertura do espécime com metal.

É interessante lembrar também que a coloração negativa com acetato de uranila se mostrou mais eficiente que a realizada com ácido fosfotúngstico (PTA) (HARRAP, 1972a).

O exame da literatura sobre a poliedrose nuclear indica que, com exceção da transmissão transovariana, o processo de sistematização do vírus pela alimentação com folhas infectadas se inicia nas células colunares do intestino médio alcançando posteriormente, com ou sem multiplicação das mesmas, células do corpo gorduroso, células epiteliais da traquéia, hipoderme e hemócitos.

As fotomicrografias desta Dissertação mostram que o vírus estudado (NPV) se multiplica nas células colunares sendo possível que

entre esta etapa e as posteriores ocorra uma defasagem de tempo, constituindo-se em mais um fator de importância para programas de controle de vírus com virícidas.

7. CONCLUSÕES

1. O NPV estudado pertence ao grupo do vírus de poliedrose que se desenvolve em células colunares do intestino médio e outros tipos de células tais como epiteliais da traquéia, hipoderme, corpo gorduroso e hemócitos de lagartas de insetos.

2. A organização dos poliedros nos hemócitos apresenta algumas diferenças na sua estrutura em relação aos poliedros de células de outros tecidos.

3. O volume do núcleo das células do corpo gorduroso de lagartas de *B. mori* apresentando os primeiros sintomas da doença, é em média 12,4 vezes maior que das células sadias.

4. As partículas de NPV das células colunares do intestino médio de lagartas de *B. mori* são mais largas do que as de *A. gemmatalis* indicando a influência do microambiente celular.

5. As partículas de NPV incluídas nos poliedros das células colunares do intestino médio de *B. mori*, apresentam comprimento e lar-

gura menores que as das partículas livres no nucleoplasma sugerindo o efeito das moléculas protéicas do poliedro sobre as mesmas.

6. Em vista da maior incorporação da timidina tritiada no núcleo de células afetadas pelo NPV em relação ao núcleo sadio, acredita-se que ele é o local de biossíntese do DNA viral.

8. SUMMARY

This work takes in consideration the following: (i) some aspects of the pathologic process caused by nuclear polyhedrosis virus (NPV) affecting two species of Lepidoptera: *Bombyx mori* L., 1758 (Lep., Bombycidae) and *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lep., Noctuidae), (ii) size measurement of infectious particles; and (iii) incorporation of ^3H -thymidine in the DNA of the virus.

Ultrathin and thick photomicrographs sections of the fat body cells, the columnar cells of the midgut and the hemocytes of insects larvae infected with the virus showed that the studied NPV can develop in any of these cells. By use of the hemocyte photomicrographs the NPV development was observed in the larva.

The volume increase of nuclei of fat body cells of *B. mori* larvae was about 12,4 times more in larvae showing initial disease symptoms than in the uninfected ones.

The polyhedra arrangement in the hemocytes presented some characteristic differences in relation to the polyhedra of the other cell types.

Regarding the dimensions of NPV particles of the same inoculum affecting the columnar cells of the midgut of *B. mori* and *A. gemmatalis* larvae, dimensions of particles enclosed within the polyhedra and free ones in the nucleoplasm, were found to be statistically different. Width and length means of NPV particles in *B. mori* (50.4 nm and 106.7 nm respectively) were greater than those found in *A. gemmatalis* (46.1 nm and 90.2 nm). NPV particles of *B. mori* cells within the polyhedra with mean widths of 43.3 nm and length of 270.9 nm were smaller than those found in free state in the nucleoplasm whose mean widths and lengths were 47.3 and 300.2 nm respectively.

Mean dimension values of particles released from polyhedra by alkaline solution treatment and observed by uranyl acetate negative staining and platinum shadow casting techniques were 361 x 52 nm and 400 x 85 nm respectively.

Polyhedra treatment in alkaline solution during 100 minutes, gave rise to changes in particles that exhibited membranes without their internal nucleocapsid. Whole particles were also observed.

The take up of ^3H -thymidine after treatment of 6 hours and measured by silver grain density (grains of silver/ μm^2) showed that the nucleus of NPV affected cells took up an average of 1.51 g/ μm^2 that those of uninfected cells only 0.30 g/ μm^2 . The ^3H -thymidine take up by the cytoplasm of healthy and NPV affected larvae did not present significant differences.

These results show that the virus DNA synthesis takes place in the nucleus of NPV affected cells.

9. LITERATURA CITADA

- AIZAWA, K., 1963. The nature of infections caused by nuclear polyhedrosis viruses. *In: STEINHAUS, E.A., Ed. Insect Pathology* 2nd. ed. New York, Academic Press, vol. 1, p.381-412.
- BENZ, G., 1963. A nuclear polyhedrosis of *Malacosoma alpicola* (Staudinger) *J. Invert. Pathol.* New York, 5:215-241.
- BERGOLD, G., 1947. Isolation of the polyheder virus and the nature of polyheders. *In: HAHON, N., Ed. 1964. Selected Papers on Virology.* Englewood Cliffs, p. 208-217.
- BERGOLD, G.H., 1963. The nature of nuclear polyhedrosis viruses. *In: STEINHAUS, E.A., Ed. Insect Pathology* 2nd. ed. New York, Academic Press, vol. 1, p. 413-456.
- BIENZ, K.A., 1977. Techniques and applications of autoradiography in the light and electron microscope. *Microscopica Acta.* Stuttgart, 79(1): 1-22.
- BLUMEN, G.; J. MERZEL, 1976. *Radioautografia.* 2^a ed. Piracicaba. FOP/ UNICAMP. 96 p.

- BRADLEY, D.E., 1967. Replica and shadowing techniques. *In: KAY, D., Ed. Techniques for Electron Microscopy*. 2nd. Oxford. Blackwell Scientific Publications. p. 96-152.
- BRENNER, S.; R.W. HORNE, 1959. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *In: HAHON, N., Ed. 1964. Selected Papers on Virology*. Englewood Cliffs, p. 318-326.
- CARD, L.G. e R.P. VAN TUBERGEN, 1962. High resolution autoradiography. I. Methods. *J. Cell. Biol.* New York, 15:173-188.
- GATTI, I.M.; D.M. SILVA; J.C. MATYS; NEUSA L. NOGUEIRA; A.R. OLIVEIRA, 1976. Constatação ao microscópio eletrônico de poliedroses em bicho da seda (*Bombyx mori* L.). *In: V Colóquio Brasileiro de Microscopia Eletrônica*, Piracicaba, p. 88-89.
- GATTI, I.M.; D.M. SILVA; I.C. CORSO, 1977. Polyhedrosis occurrence in caterpillars of *Antioarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) in the south of Brazil. *IRCS Medical Science*. Lancaster, 5:163 p.
- HARRAP, K.A.; J.S. ROBERTSON, 1968. A possible infection pathway in the development of a nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* London, 5:221-225.
- HARRAP, K.A., 1970. Cell infection by a nuclear polyhedrosis virus. *Virology*. New York, 42:311-318.
- HARRAP, K.A., 1972a. The structure of nuclear polyhedrosis viruses. II - The virus particle. *Virology*. New York, 50(1):124-132.

- HARRAP, K.A., 1972b. The structure of nuclear polyhedrosis viruses. III-
Virus assembly. *Virology*. New York, 50(1):133-139.
- HASCHEMEYER, R.H., R.J. MYERS, 1972. Negative staining. In: HAYAT, M.A., Ed.
Principles and Techniques of Electron Microscopy. New York, vol. 2, p. 99-147.
- HENDERSON, W.J.; K. GRIFFITHS, 1972. Shadow casting and replication. In:
HAYAT, M.A., Ed. *Principles and Techniques of Electron Microscopy*.
New York, vol. 2, p. 149-193.
- HIMENO, M.; Y. KIMURA; K. HAYASHIYA, 1976. Nucleic acids synthesis of
nuclear polyhedrosis virus in cultured embryonic cells of silkworm.
Agr. Biol. Chem. J. Tokio, 40(8):1457-1462.
- KHOSAKA, T.; M. HIMENO; K. ONODERA, 1971. Separation and structure of
components of nuclear polyhedrosis virus of the silkworm. *J. Virol.*
Michigan, 7(2):267-273.
- KOZLOV, E.A.; I.P. ALEXEENKO, 1967. Electron microscope investigation of
the structure of the nuclear polyhedrosis virus of the silkworm, *Bombyx*
mori. *J. Invert. Pathol.* New York, 9:409-414.
- LUFT, H.H., 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods.
J. Biophys. Biochem. Cytol. New York, 9:409-414.
- LURIA, S.E.; J.E. DARNELL, 1978. *General Virology*. 2nd. ed. New York,
John Wiley, 558 p.
- MARTIGNONI, M.E.; R.J. SCALLION, 1961. Multiplication *in vitro* of a
nuclear polyhedrosis virus in insect amoebocytes. *Nature*. London,
190:1133-1134.

- MORGAN, C.; G.H. BERGOLD; D.H. MOORE; H.M. ROSE, 1955. The macromolecular paracrystalline lattice of insect viral polyhedral bodies demonstrated in ultrathin sections examined in the electron microscope. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* New York, 1(3):187-190.
- MORGAN, C.; G.H. BERGOLD; H.M. ROSE, 1956. Use of serial sections to delineate the structure of *Portheria dispar* virus in the electron microscope. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* New York, 2(1):23-27.
- MORRIS, O.N., 1968. Metabolic changes in diseased insects. II. Radioautographic studies on DNA and RNA synthesis in nuclear polyhedrosis and cytoplasmic polyhedrosis virus infections. *J. Invert. Pathol.* New York, 11:476-486.
- PROWAZEK, S. VON, 1907. Chlamydozoa. II. Jaundice of silkworms. In: HAHN, N., Ed. 1964. *Selected Papers on Virology*. Englewood Cliffs, p.87-92.
- RAGHOW, R.; T.D.C. GRACE, 1974. Studies on a nuclear polyhedrosis virus in *Bombyx mori* cells *in vitro*. 1 - Multiplication kinetics and ultrastructural studies. *J. Ultrastr. Research*. New York, 47:384-399.
- REYNOLDS, E.S., 1963. The use of the lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* New York, 17:208-212.
- SHIGEMATSU, H.; S. SUZUKI, 1971. Relationship of crystallization to the nature of polyhedron protein, with reference to a nuclear polyhedrosis virus of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Invert. Pathol.* New York, 17:375-382.

- SMITH, K.M.; N. XEROS, 1953a. Cross-inoculation studies with polyhedral viruses. *Symposium Interactions of Viruses and Cells*. Rome, p.81-96.
- SMITH, K.M.; N. XEROS, 1953b. Development of virus in the cell nucleus. *Nature*. London, 172:670-671.
- SMITH, K.M., 1967. *Insect Virology*. New York, Academic Press. 256 p.
- STEVENS, A.R., 1966. High resolution autoradiography. In:PRESCOTT,O.M., Ed. *Methods in Cell Physiology*. New York, Academic Press, vol. II, p. 255-310.
- TANADA, Y., 1959. Descriptions and characteristics of a nuclear polyhedrosis virus and a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (Lepidoptera, Noctuidae). *J. Insect Pathol.* New York, 1:197-214.
- TANADA, Y., ROBERTA T. HESS, 1975. Development of a nuclear polyhedrosis virus into the hemocoel of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *J. Invert. Pathol.* New York, 26:99-104.
- THOMAS, D.; J. GOURANTON, 1975. Development of viruslike particles in the crystal containing nuclei of the midgut cells of *Tenebrio molitor*. *J. Invert. Pathol.* New York, 25:159-169.
- VAUGHN, J.L., 1968. A review of the use of insect tissue culture for the study of insect associated viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* Berlin, 42:108-128.
- XEROS, N., 1955. Origin of the virus producing chromatic massa or net of the insect nuclear polyhedrosis. *Nature*, London, 175:588-590.

- XEROS, N., 1956. The virogenic stroma in nuclear and cytoplasmic polyhedrosis. *Nature*, London, 178:412-413.
- WATANABE, H., 1972. An electron microscope radioautography of DNA synthesis in the fat cell of silkworm, *Bombyx mori*, infected with a nuclear polyhedrosis virus. *J. Invert. Pathol.* New York, 20:223-225.
- WATSON, J.D., 1976. The replication of viruses. In: WATSON, J.D., Ed. *Molecular Biology of the Gene*. 3rd. ed. Menlo Park, W.A. Benjamin, cap. 15, p.411-450.
- WYATT, G.R., 1952. The nucleic acids of some insect viruses. *J. Gen. Physiol.* New York, 36:201-205.