**AUTORADIOGRAFIA QUANTITATIVA À NÍVEL DE MICROSCOPIA
ELETRÔNICA EM CÉLULAS DE FUMO (*Nicotiana tabacum* L.)
INFECTADAS COM VÍRUS DO ANEL DO PIMENTÃO**

GILBERTO LAGE

Orientador: Dr. Darcy Martins 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

Junho, 1980

DEDICÓ

Aos meus pais,

e a minha esposa

Lúcia Helena, pelo
incentivo e compreensão

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.
- Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), na pessoa do Diretor Prof. Dr. Admar Cervellini, onde o presente trabalho foi realizado.
- 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.
- 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 Projeto UNDP/IAEA/BRA/78/006 para o Desenvolvimento da Produção Agrícola através da Aplicação de Técnicas Nucleares, na pessoa do Dr. Peter B. Vose, que muito contribuiu para a realização deste trabalho.
- À Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP - UNICAMP), nas pessoas dos Profs. Drs. Guilherme Blumen e Cássio G. Munhóz, pelos ensinamentos das técnicas iniciais em autoradiografia e microscopia eletrônica.
- Ao Departamento de Ciências Exatas da Escola Superior de Agricultura de Lavras - MG, na pessoa do Prof. Oliveira J. Vieira, pelas facilidades concedidas durante a execução deste trabalho e pela colaboração nas análises estatísticas.

- À Dra. Neusa L. Nogueira pelas eletrofotomicrografias de células de fumo utilizadas neste trabalho.
- Ao Prof. José Vitor Silveira, vice-diretor do Centro de Processamento de Dados da Escola Superior de Agricultura de Lavras-MG, pela elaboração do programa de computador utilizado no cálculo do HD.
- À M.S. Maria das Graças Ongarelli pela valiosa colaboração durante a confecção deste trabalho.
- Ao José Elias Gomes, técnico do Setor de Microscopia Eletrônica do CENA pela prestimosa ajuda.
- Aos colegas do Setor de Microscopia, pelos bons momentos passados juntos e pela ajuda quando necessária.
- Aos Professores, funcionários, colegas e amigos do CENA, pela ajuda quando necessária.
- A Srta. Maria Izalina Ferreira Alves, pelos trabalhos de datilografia.
- A Sra. Carmen Sílvia Mennicucci de Aquino pela versão do resumo para o inglês.

Í N D I C E

	Pág.
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	7
3.1 - Considerações Gerais Sobre o Vírus do Anel do Pimentão (VAP)	7
3.2 - Métodos Utilizados para Investigações dos Locais de Síntese Intracelular dos Vírus e seus Componentes ..	8
3.2.1 - Microespectrofotométricos	9
3.2.2 - Citológicos	9
3.2.3 - Fracionamento celular	10
3.2.4 - Imunomicroscópicos	10
3.2.5 - Citoquímicos e autoradiográficos	10
3.3 - Uso do AMD no Estudo dos Processos de Replicação de Vírus de Planta	11
3.4 - Locais de Síntese do RNA de Vírus de Planta Obtidos com Métodos Autoradiográficos	13
3.5 - Características do Traçador	15
3.6 - Análise Quantitativa	18
3.6.1 - Método quantitativo de WILLIAMS (1969)	20
3.6.2 - Método quantitativo de NADLER (1971)	26
3.6.3 - Contribuições autoradiográficas para métodos quantitativos segundo SALPETER	30
3.6.4 - Outras contribuições	34
3.7 - Análise Quantitativa Aplicada a Vírus	36

	Pág.
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 - Hospedeira Utilizada	37
4.2 - Preparo do Espécime	38
4.3 - Tratamento para Microscopia Eletrônica	39
4.4 - Microtomia	40
4.5 - Autoradiografia	40
4.6 - Técnicas Fotográficas	41
4.7 - Eletrofotomicrografias	42
4.8 - Cálculo do HD (Half Distance)	42
4.8.1 - Fonte radioativa linear	42
4.8.2 - Microtomia	43
4.8.3 - Autoradiografia	44
4.8.4 - Técnicas fotográficas	45
4.8.5 - Eletrofotomicrografias	46
4.8.6 - Distribuição dos filamentos de prata em tor- no da fonte radioativa linear	47
4.9 - Determinação da Densidade de Grãos de Prata nas Orga- nelas Celulares	48
4.10 - Método Quantitativo de NADLER (1971) Aplicado ao Sis- tema VAP-Mitocôndrio	50
5. RESULTADOS OBTIDOS	56
5.1 - Medidas das Áreas e Contagem dos Círculos	56
5.2 - Contagem dos Grãos de Prata e Cálculo da Densidade..	63

	Pág.
5.3 - Cálculo do HD (Half-Distance)	67
5.4 - Determinação do Conteúdo Radioativo Relativo do Sistema VAP-Mitocôndrio	73
5.4.1 - Cálculo do conteúdo radioativo relativo no sistema VAP-mitocôndrio, submetido ao tratamento H_2O (16 h) e U - 5 - 3H (5 h)	73
5.4.2 - Cálculo do conteúdo radioativo relativo no sistema VAP-mitocôndrio, submetido ao tratamento de AMD (16 h) e U - 5 - 3H (5 h)	79
6. DISCUSSÃO	84
7. CONCLUSÕES	91
8. SUMMARY	93
9. LITERATURA CITADA	96
10. APÊNDICE	104

LISTA DAS TABELAS

Pág.

TABELA 1 - Áreas de nucléolo de células foliares de fumo, medidas pelo método de círculos e planímetro e resultado do teste F	58
TABELA 2 - Áreas de nucléolo de células foliares de fumo sadio e infectados com VAP, tratados com H ₂ O ou AMD (16 h), incubados em U - 5 - ³ H (5 h) e resultados estatísticos dos testes F e de Tukey	59
TABELA 3 - Áreas de núcleos de células foliares de fumo sadio e infectados com VAP, tratados com H ₂ O ou AMD (16 h) e incubados em U - 5 - ³ H (5 h), resultados estatísticos dos testes F e de Tukey	60
TABELA 4 - Áreas de citoplasma de células foliares de fumo sadio e infectados com VAP, tratados com H ₂ O ou AMD (16 h), incubados em U - 5 - ³ H (5 h) e resultados estatísticos dos testes F e de Tukey	61
TABELA 5 - Áreas médias e representativas de nucléolo, núcleo e citoplasma de células foliares de fumo sadio e infectados com VAP, tratados com H ₂ O ou AMD (16 h), incubados em U - 5 - ³ H (5 h)	62
TABELA 6 - Densidade de grãos de prata em nucléolo de células foliares de fumo, tratadas com H ₂ O ou AMD (16 h), incubadas em U - 5 - ³ H (5 h) e resultados estatísticos dos testes F e de Tukey	64

TABELA 7 - Densidade de grãos de prata de núcleos de células foliares de fumo, tratadas com H ₂ O ou AMD (16 h), incubadas em U - 5 - ³ H (5 h) e resultados estatísticos testes F e de Tukey	65
TABELA 8 - Densidade de grãos de prata de citoplasma de células foliares de fumo, tratadas com H ₂ O ou AMD (16 h), incubadas em U - 5 - ³ H (5 h) e resultados estatísticos dos testes F e de Tukey	66
TABELA 9 - Densidade média de nucléolo, núcleo e citoplasma de células foliares de fumo, tratadas com H ₂ O ou AMD (16 h), incubadas em U - 5 - ³ H (5 h)	67
TABELA 10 - Grãos de prata distribuídos em faixas de distância a partir de fonte radioativa linear	69
TABELA 11 - Estruturas com grãos de prata exclusivos e repartidos no sistema VAP-mitocôndrio, submetido ao tratamento H ₂ O (16 h) e U - 5 - ³ H (5 h)	75
TABELA 12 - Estruturas com grãos de prata exclusivos e repartidos, levando em consideração a exclusão de classes de estrutura com menos de 5% do total de grãos	76
TABELA 13 - Estruturas com grãos de prata exclusivos e repartidos, no sistema VAP-mitocôndrio, submetido ao tratamento AMD (16 h) e U - 5 - ³ H (5 h)	80

TABELA 14 - Estruturas com grãos de prata exclusivos e repartidos, levando-se em consideração a exclusão de estruturas com menos de 5% do total dos grãos .. 81

LISTA DAS FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1 - Regiões de junção	23
FIGURA 2 - Regiões compostas	25
FIGURA 3 - Grãos de prata (gp) obtidos de células de fumo sa- dio com H_2O (A) ou AMD (B), e doente com H_2O (C) e AMD (D), tratados durante 16 horas e incubadas em U - 5 - 3H por 5 horas	57
FIGURA 4 - Grãos de prata (gp) distribuídos ao longo de uma fonte radioativa linear (fl), constituída de OsO_4 e U - 5 - 3H na proporção 3:1	68
FIGURA 5 - Curva de distribuição de grãos de prata ao longo de uma fonte radioativa linear	70
FIGURA 6 - Curva universal mostrando a distribuição de densi- dades a partir de uma fonte radioativa linear ...	72
FIGURA 7 - Grãos de prata exclusivos (gpe) e grãos de prata repartidos (gpr) sobre o sistema VAP-mitocôndrio de células de fumo, tratadas com H_2O (A) e AMD (B) du- rante 16 horas e incubadas em U - 5 - 3H por 5 ho- ras	74

1. RESUMO

Na presente Dissertação foram abordados diversos problemas correlacionados com a replicação do RNA do vírus do anel do pimentão (VAP), sua translocação e sua associação com os mitocôndrios.

Antes dessa abordagem foram examinados alguns aspectos fundamentais para se atingir os objetivos propostos. Dentre eles destacam-se:

- a) o efeito da actinomicina D (AMD) sobre as áreas do nucléolo, núcleo e citoplasma das células de fumo sadias e infectadas pelo vírus do anel do pimentão.

Nesse estudo notou-se marcante a AMD, que reduziu as áreas do nucléolo e do núcleo das células sadias. Os testes estatísticos indicaram que na presença do VAP apenas o nucléolo sofria se-

melhante redução.

O AMD provocou também uma inibição indireta da sínte
se do RNA viral.

- b) O resultado prévio do estudo comparativo entre a determinação das áreas celulares pelo método dos círculos e planimetria permitiu a opção pelo primeiro método, que torna simples e rápida a obtenção das densidades de grãos de prata.
- c) A proporção das densidades de grãos de prata do nucléolo e núcleo contra a densidade dos mesmos no citoplasma das células tratadas com AMD guardaram a seguinte relação 14,5:3,5:1, respectivamente. Estas proporções corroboram a idéia de que a biossíntese do RNA das duas partículas da população do VAP (55 e 220nm) deve se dar no nucléolo.
- d) Obtenção do valor do HD (Half-distance) para as nossas condições, com um valor aproximado de 2000 Angstroms.

Com respeito à translocação e associação do VAP com os mitocôndrios das células hospedeiras, a aplicação do modelo matemático proposto por NADLER permitiu obter duas informações básicas: a primeira mostrou que no sistema VAP-mitocôndrio associados, os grãos de prata cobrindo os dois componentes eram predominantemente formados pelo RNA radioativo do VAP (78%) e a segunda diz respeito ao tempo necessário para síntese do RNA, maturação e translocação do vírus até os mitocôndrios. Esse tempo que coincidiu com o do tra

tamento U - 5 - ^3H e indicou que, embora o processo de síntese e translocação possa ser menor, essas várias etapas podem se completar dentro de 5 horas.

Os resultados obtidos com o método usado além de mostrar a viabilidade do mesmo para o sistema VAP - mitocôndrio parece bastante promissor na solução de problemas semelhantes com outros vírus ou até mesmo, solução para alguns aspectos biossintéticos e de translocação de compostos com hormônios e enzimas em células normais.

2. INTRODUÇÃO

Os estudos autoradiográficos aplicados a espécimes biológicos ao nível de microscopia eletrônica, tiveram início por volta de 1956.

Muitos problemas surgiram desde então, como por exemplo, processo fotográfico, fatores geométricos de fonte e detector, radioisótopo a ser utilizado, etc., resultando em fatores que influenciam diretamente na resolução autoradiográfica.

Os trabalhos iniciais foram de natureza qualitativa, relacionando-se de maneira simples, os grãos de prata com as estruturas abaixo destes. Mas, a relação grão de prata e fonte radioativa logo tornou-se um problema complexo, pois um grão de prata visto sobre uma estrutura específica numa célula, não é necessariamente derivado de um decaimento radioativo de uma fonte contida nessa estrutura.

tura.

Para melhor análise de uma autoradiografia, é necessário determinar a fonte radioativa mais provável, que tenha produzido o grão de prata.

O grau de incerteza na identificação da fonte de radiação exige uma análise estatística, pois os grãos de prata produzidos pelas radiações originadas de radioisótopos incorporados nas estruturas intracelulares, cobrem uma ou mais estruturas, dessa forma, a relação grão de prata-fonte radioativa, só pode ser determinada por um método quantitativo.

No presente trabalho, aplicou-se um método quantitativo para se obter as áreas (μm^2) e densidades (nº de grãos/ μm^2) no sistema nucléolo, núcleo e citoplasma de células foliares de *Nicotiana tabacum* L. var. Turkish NN sadias e infectadas com o vírus do anel do pimentão (VAP) incubados com água ou Actinomicina D(AMD), e a seguir tratados com uridina tritiada (U - 5 - ^3H) a fim de se verificar e confrontar os resultados obtidos.

Um método quantitativo mais rigoroso, foi aplicado no sistema VAP-mitocôndrio, a fim de se obter o conteúdo radioativo relativo dessas estruturas.

Para a aplicação deste método foi necessário de um índice quantitativo, denominado HD (half distance), índice este indispensável à aplicação do método.

Os objetivos da presente dissertação, podem ser resumidos nos seguintes itens:

1. Verificar a variação das áreas de organelas submetidas aos vários tratamentos.
2. Analisar as densidades entre as organelas submetidas aos vários tratamentos.
3. Cálculo do HD.
4. Determinação da fonte radioativa no sistema VAP-mitocôndrio de células foliares de fumo *Nicotiana tabacum* L., e cálculo do conteúdo radioativo relativo de cada componente do sistema.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 - Considerações Gerais Sobre o Vírus do Anel do Pimentão(VAP)

Características biológicas, determinações da morfologia e relações serológicas do VAP, estudadas por COSTA *et alii* (dados não publicados) mostraram ser este vírus, integrante do grupo do "rattle" do fumo.

Destacando-se aspectos bioquímicos, morfológicos e serológicos, o VAP foi purificado e estudado por SILVA (1965), KITAJIMA (1967) e OLIVEIRA (1967), respectivamente.

VAN DER WANT e ROSENDAAL (1948) descreveram as primeiras propriedades do vírus, distinguindo as partículas com forma de bastonete, em dois diferentes tamanhos, 130 e 300 nm de comprimento. ALLEN (1963), DE ZOETEN e SHALLA (1966) e KITAJIMA *et alii*

(1969), trabalhando provavelmente com estirpes do mesmo vírus, encontraram resultados idênticos quanto à forma e pequenas variações, quanto ao comprimento e diâmetro das partículas infecciosas.

HARRISON e ROBERTS (1968) observaram que o vírus do grupo "rattle" apresentava-se, geralmente, associado aos mitocôndrios das células hospedeiras.

Aspectos patológicos e dimensões das partículas curtas (55 nm) e longas (220 nm) foram determinados por COSTA (dados não publicados) e KITAJIMA (1967). A infectividade está associada às partículas longas, segundo SILVA (1965) e OLIVEIRA (1967).

Segundo SILVA (1965), análises químicas com preparações purificadas do VAP, revelaram que as partículas do VAP têm 95% de proteína e 5% de ácido ribonucleico, e que este, mesmo separado da parte protéica, ainda mantém a infectividade.

Exames de cortes ultrafinos feitos ao microscópio eletrônico por KITAJIMA (1967), revelaram a associação das partículas de VAP com os mitocôndrios de célula hospedeira.

3.2 - Métodos Utilizados Para Investigações dos Locais de Síntese Intracelular dos Vírus e Seus Constituintes

Existem diversos métodos para se estudar locais de síntese de RNA, proteína e de vírus em células de plantas.

3.2.1 - Microespectrofotométricos

Analisa o espectro de absorção de proteína e ácido nucleico, para acompanhar as mudanças na composição das áreas específicas das células, durante a multiplicação do vírus. As primeiras evidências dos locais de síntese de vírus, foi obtida por ZECH(1961) utilizando essa técnica.

3.2.2 - Citológicos

Utilizando-se microscópio óptico e eletrônico, realizaram estudos sobre anormalidades, inclusões e estruturas celulares.

BALD e SOLBERG (1961) e BALD (1964, 1966) fizeram estudos citológicos no microscópio óptico, colorindo especificamente RNA e proteínas de vírus. MC WHORTER (1965), utilizando-se de técnica semelhante, estudou a natureza das inclusões de vírus em plantas infectadas.

Com o auxílio da microscopia eletrônica, determinou-se o tamanho e a forma das partículas no interior das células. BLACK *et alii* (1950) realizaram o estudo sobre a ocorrência do vírus do mosaico do fumo em células infectadas, trabalho este que se tornou clássico.

3.2.3 - Fracionamento celular

Nesta técnica, os tecidos doentes são homogeneizados e diferentes organelas são separadas através de centrifugações diferenciais, ou em gradientes de densidade para localizar o sítio intracelular de replicação do vírus marcado. Através dessa técnica LA FLECHE *et alii* (1972) determinaram o local de síntese do vírus do mosaico amarelo do nabo.

3.2.4 - Imunomicroscópicos

Anticorpos conjugados com várias substâncias (enzimas, ferritina, isotiocianatos) são aplicados nos cortes contendo antígeno. O complexo resultante, anticorpo conjugado com antígeno, pode ser identificado ao microscópio através da fluorescência originada pelas radiações ultra-violeta. SINGER (1959) usou ferritina para marcar compostos e estudá-los através da microscopia eletrônica.

Associando técnicas imunomicroscópicas e autoradiográficas, LANGENBERG e SCHLEGEL (1967), puderam localizar o TMV com anticorpos marcados com iodo-125 (^{125}I).

3.2.5 - Citoquímicos e autoradiográficos

Quantidades muito pequenas de material radioativo, são detectados por meio de emulsões fotográficas. Nessas emulsões são formados os grãos de prata de reduzida, que são intimamente re-

lacionados com a fonte emissora localizada na estrutura intracelular.

A autoradiografia tem sido um método de estudo de síntese de vírus, a qual tem sido realizada através de precursores, inibidores metabólicos específicos, etc., marcados.

Os autoradiogramas obtidos a nível de microscopia óptica ou eletrônica, revelam a sede para onde convergem metabólitos radioativos e que normalmente são incorporados em macromoléculas de ácidos nucleicos. Inibidores específicos bloqueando apenas a síntese de ácidos nucleicos normais, revelam a síntese dos ácidos nucleicos dos vírus.

Há certas limitações na aplicação dos métodos autoradiográficos para estudo dos locais de síntese de vírus.

Estas limitações, atuam como fonte de erro, e podem comprometer a interpretação dos dados, razão pela qual, recomendam-se diversos tipos de controles, como a inclusão de tecido sadio tritiado com e sem inibidor, além do tecido doente tritiado sem o inibidor.

3.3 - Uso de AMD no Estudo dos Processos de Replicação de Vírus de Planta

SANGER e KNIGHT (1963) demonstraram pela primeira vez, que a AMD inibe a incorporação de uracil - 2 - ^{14}C no ácido ribonucleico normal de células de fumo, mas não interfere com a in-

incorporação no ácido ribonucleico do fumo infectado com vírus do mosaico. A partir daí, um grande campo se abriu para o estudo de síntese de RNA de vírus de planta.

Muitos autores utilizaram AMD em diversas concentrações, a fim de evitar a incorporação U - 5 - ^3H em ácido nucleico normal. FACCIOLO e RUBIES-AUTONEL (1975) utilizaram em *Chenopodium amaranticolor*, quantidades crescentes de AMD, ou seja, 50, 100, 250 e 500 $\mu\text{g/ml}$ de água, para inibição de síntese de RNA celular normal, verificando um decréscimo progressivo na incorporação de U - 5 - ^3H em ácido nucleico normal à medida que aumentava a concentração de AMD.

A AMD também pode funcionar como inibidor da multiplicação de vírus em certas combinações vírus-hospedeira, segundo LOCKHART e SEMANCIK (1968, 1969), inibindo a multiplicação de "cowpea mosaic virus" em tecidos de hipocótilo de caupi, e TMV e "cowpea chlorotic mottle virus" em tecidos estiolados de hipocótilo de caupi.

A AMD, dependendo do hospedeiro, pode estimular o aumento do tamanho das lesões locais além da multiplicação do vírus.

LOEBENSTEIN *et alii* (1969) verificaram que o tamanho das lesões locais causadas pelo TMV em folhas de *Phaseolus vulgaris* L. var. Pinto e a multiplicação do TMV nos cotilédones de *Cucumis sativus* L. aumentaram significativamente na presença de AMD.

O período de incubação dos tecidos foliares em AMD, tem variado de 12 a 24 horas. LAFLECHE e BOVÉ (1968) incubaram *Bras*

sica chinensis durante 16:30 horas, FACCIOLI e RUBIES-AUTONEL (1975) 12 horas para *Chenopodium amaranticolor*.

3.4 - Locais de Síntese do RNA de Vírus de Planta Obtidos com Métodos Autoradiográficos

Através de métodos autoradiográficos, pode-se detectar quantidades mínimas de material radioativo, localizando-se, por exemplo, síntese de macromoléculas marcadas a nível subcelular.

Muitos pesquisadores têm estudado com êxito o local de síntese de vírus através de histoautoradiografia a nível de microscopia eletrônica, após incorporação in vitro de U - 5 - ^3H no RNA de célula de tecidos infectados.

Os locais de síntese variam de acordo com a planta hospedeira e o vírus.

SMITH e SCHLEGEL (1964, 1965) foram os primeiros a verificar a incorporação de U - 5 - ^3H no núcleo e nucléolo de folha de fumo com mosaico comum (TMV) tratada com Actinomicina D, sendo que, a marcação seguiu do núcleo-núcleo para o citoplasma, onde parte desta apareceu como inclusão do vírus.

Relacionando forma de vírus e local de síntese, DE ZOETEN e SCHLEGEL (1967) realizaram estudos autoradiográficos de incorporação U - 5 - ^3H em plantas sadias e infectadas com vírus esféricos: "broad bean mottle virus", "tomato spotted wilt virus" e "tomato ringspot virus"; e vírus alongados: "tobacco mosaic virus",

"clover yellow mosaic virus" e "sugar cane mosaic virus".

Os sistemas vírus esféricos-hospedeira examinados, revelaram incorporação do traçador na região citoplasmática, pouca no núcleo, e praticamente nada no nucléolo, enquanto que no sistema vírus alongado-hospedeira observaram incorporação de U - 5 - ^3H no nucléolo.

LAFLECHE e BOVÉ (1968, 1971), LAFLECHE *et alii* (1972) verificaram que com couve chinesa o local de síntese RNA do vírus do mosaico amarelo do nabo, era a membrana do cloroplasto.

WOLANSKI e CHAMBERS (1971) verificaram que a síntese de RNA do "Lettuce necrotic yellow virus" (LNYV) em tecidos foliares de *Nicotiana glutinosa* L. está localizada no núcleo durante o início da infecção, sendo que os vírus completos estão presentes nos espaços perinucleares.

BASSI e FAVALI (1972) e FAVALI *et alii* (1974) verificaram em tumores de nervuras de folhas e tumores de raiz de milho, que a incorporação de U - 5 - ^3H em RNA de "maize rough dwarf virus" (MRDV) se dava nas regiões viroplasmáticas contendo vírus incompletos, nada ocorrendo de marcação, tanto em partículas de vírus completas vistas fora do viroplasma, como nos núcleos.

FACCIOLI e RUBIES-AUTONEL (1975) verificaram que o núcleo, nucléolo e o citoplasma estão envolvidos na síntese de RNA de "tabacco necrosis virus" em células de *Chenopodium amaranticolor*.

NOGUEIRA e SILVA (1976, 1976a) tiveram as primeiras evidências que a síntese de RNA de VAP ocorria na região núcleo-núcleolo de células de *Nicotiana tabacum* L.

NOGUEIRA *et alii* (1972) verificaram que a síntese do RNA do "virus do vira cabeça" do tomateiro em células de *Nicotiana tabacum* L., parece se dar na região citoplasmática.

3.5 - Características do Traçador

Em trabalhos autoradiográficos, a nível de microscopia eletrônica, convém o uso de radioisótopos, com características como:

- Meia vida física suficientemente longa para permitir a realização do trabalho, com desprezível queda de radioatividade durante a pesquisa.
- Atividade específica suficiente para sensibilizar os cristais de cloreto ou brometo de prata da emulsão fotográfica.
- Energia de emissão baixa, pois a energia da radiação está diretamente relacionada com resolução das autoradiografias.

Desta forma, o radioisótopo mais utilizado em autoradiografia é o trítio (^3H), isótopo do hidrogênio produzido artificialmente.

Algumas características físicas do trítio, segundo LEDERER *et alii* (1967):

- a) n° atômico 1;
- b) n° de massa 3;
- c) meia vida física 12,3 anos;
- d) emissor β puro (elétrons);
- e) energia máxima 0,0186 Mev e energia média 0,0056Mev.

PEASE (1964) mostrou o trítio como mais adequado à sensibilização dos cristais de halogenetos de prata, e segundo PELC (1963), cada partícula emitida pelo trítio, é capaz de afetar apenas um cristal de cloreto ou brometo de prata da emulsão fotográfica.

Além do trítio, outros radioisótopos são usados em autoradiografia a nível de microscopia eletrônica. Como o trítio possui a energia de emissão mais baixa, é evidente que o uso de radioisótopos com energia de emissão mais alta, causariam um decréscimo na alta resolução do método.

Muitos trabalhos têm sido realizados, a fim de se obter parâmetros e fatores limitantes da alta resolução para outros radioisótopos, e também para compará-los aos resultados obtidos com ^3H , comprovando-se dessa forma uma possível perda na resolução, o que é um fator dos mais importantes em trabalhos quantitativos.

CARO e SCHNOS (1965) utilizando como fonte radioativa bactérias *E. coli* marcadas com ^3H ou fósforo-32 (^{32}P), determinaram a sensibilidade e a resolução autoradiográfica comparativas entre esses dois radioisótopos, sendo estes os emissores β puro de me

nor e maior energia de emissão, respectivamente.

BACHMANN e SALPETER (1967) também mostraram a sensibilidade e a resolução autoradiográfica entre o ^3H e o enxofre-35 (^{35}S), testados sob condições idênticas em monocamadas de emulsão fotográfica.

SALPETER *et alii* (1969) determinaram as curvas de distribuição e densidades de grãos de prata ao longo de uma fonte radioativa linear tritiada, determinando o índice quantitativo HD (half-distance), que é a distância que contém 50% dos grãos produzidos pela fonte radioativa.

SALPETER e SALPETER (1971) também determinaram os fatores limitantes e resolução para o Carbono-14 (^{14}C).

PARRY e BLACKETT e BLACKETT e PARRY (1973), visando um posterior trabalho com células eritróide marcadas com Ferro-55 (^{55}Fe), determinaram o índice quantitativo HD, através de uma fonte linear para esse radioisótopo, comparando-o com os resultados do ^3H .

SALPETER *et alii* (1977), verificando a possibilidade do uso do radioisótopo Iodo-125 (^{125}I) para trabalhos autoradiográficos quantitativos, obteve seu HD e suas curvas de distribuição. Os autores consideraram o ^{125}I , como um radioisótopo de uso altamente favorável em autoradiografia à nível de microscopia eletrônica.

Tanto o ^{55}Fe como o ^{125}I não são emissores β puros, ambos decaem por captura de um elétron das camadas eletrônicas K, L, ..., seguida da emissão de raios γ nucleares.

A vaga deixada pelo elétron capturado, é ocupada por um elétron mais externo, liberando a diferença de energia entre os níveis energéticos na forma de raios-X.

Os elétrons que absorvem esses raios-X e escapam do átomo são chamados de elétrons Auger.

Para o ^{55}Fe , os elétrons Auger possuem energia de 5 a 6 KeV, e para o ^{125}I de 3 a 4 KeV.

3.6 - Análise Quantitativa

Para a realização de uma análise quantitativa em autoradiografia, muitos requisitos devem ser observados para a coleta dos dados.

O método deve levar em conta, além do emissor, os fatores que limitam a resolução autoradiográfica para microscopia eletrônica como processo fotográfico, fatores geométricos e tipo de radioisótopo usado.

O termo resolução tem várias definições e todas arbitrárias. O critério de Rayleigh, segundo CARO (1962), diz que o poder de resolução é aproximadamente duas vezes a distância, em que a densidade decresce de 50% do seu valor máximo. Esta definição está ligada a sistemas ópticos.

Para microscopia eletrônica, a resolução é definida em termos de probabilidade de ser formado um grão de prata. CARO

(1962) definiu a resolução, como a distância de uma fonte até o ponto onde a probabilidade de um grão ser formado cai de 50%.

BACHMANN e SALPETER (1965) introduziram uma defini-
ção de resolução como sendo a distância da fonte, dentro da qual se
localizam 50% do total de grãos por ela produzidos.

Visando uma aplicação biológica, deve-se considerar
as características ultra estruturais como fontes radioativas, como
por exemplo núcleos, nucléolos, mitocôndrios, etc.

O método deve ser delineado de forma que permita aná-
lises estatísticas dos resultados, como por exemplo, comparação da
distribuição dos grãos em relação ao acaso, e também com outras dis-
tribuições.

O método deve eliminar problemas, como grãos de pra-
ta que cobrem duas ou mais estruturas, o que, numa autoradiografia,
ocorre com 30 a 50% dos grãos de prata.

Entre as características quantitativas do sistema,
deve-se estudar a relação do número de grãos de prata com o volume
de cada estrutura na célula, ou com a área presumindo-se espessura
constante das secções dos cortes, para determinar a atividade espe-
cífica das organelas.

Para se tomar a medida das áreas, WILLIAMS (1969) mos
trou a possibilidade de se determiná-las por ponto ou linha, círcu-
los ou planimetria.

Visando evitar problemas de processamento radiográfico, recomenda-se o uso da mesma marca comercial do material, durante todo o trabalho, pois o tamanho e a forma dos grãos de prata podem variar, variando conseqüentemente a resolução do método adotado. Em poucas palavras, as condições de trabalho devem ser rigorosamente padronizadas.

3.6.1 - Método quantitativo de WILLIAMS (1969).

Seu método consiste em quatro operações básicas:

a) Coleta dos dados dos grãos de prata

Todo grão de prata resultante das técnicas de microscopia eletrônica, é de forma filamentosa, que para análise será reduzido a um ponto, escolhendo-se o ponto médio do eixo maior dos filamentos de prata. Este ponto será o centro do círculo que cobre o grão de prata.

O círculo é escolhido para ter o diâmetro equivalente à resolução do sistema autoradiográfico (BACHMANN e SALPETER, 1965), anotando-se as fontes potenciais nas estruturas compreendidas pelo círculo traçado.

É necessário decidir antes que a análise seja iniciada, quais os itens ultra estruturais de células a serem considerados como organela simples, organelas de união, e organelas compostas.

O número de grãos de prata necessários em qualquer análise depende de vários fatores. Se os grãos estão restritos a um ou poucos itens, serão necessários um menor número de grãos, do que o necessário para uma distribuição de grãos mais dispersa.

b) Análise das áreas efetivas pela aplicação de círculos

Os círculos foram desenhados em plástico transparente com 7,5 mm de diâmetro, que para um aumento de 30.000 vezes, equivale a 2.500 Å, ou seja, 50% de probabilidade.

Esses círculos podem ser arranjados em forma aleatória ou em forma regular. O tamanho do plástico transparente contendo os círculos, deve cobrir toda a eletrofotomicrografia.

O número de círculos necessários para se obter uma medida de área efetiva de uma estrutura celular, com um dado desvio padrão, vai depender da fração da área total ocupada por essa estrutura.

Uma tela com 400 círculos, mostrou-se adequada a esse tipo de experimento.

c) Medidas das áreas reais pela análise de ponto

As medidas das áreas reais em geral, são feitas pela análise de ponto. As análises de ponto podem ser feitas juntas ou separadamente da medida da área efetiva.

Colocando-se um ponto no centro do círculo, os dados podem ser coletados simultaneamente, surgindo os mesmos problemas que envolvem tanto a análise de pontos como a análise de círculos.

Pode-se na prática usar até 7 pontos dentro de cada círculo, desde que não escureça demais a eletrofotomicrografia. Esses pontos podem ser arranjados em posições padrões nos círculos, na forma de um hexágono regular, dando uma cobertura de 77 a 78% do círculo.

d) Confronto dos dados obtidos das três operações anteriores

Se os grãos de prata se distribuem ao acaso, a frequência da distribuição dos círculos sobre as várias estruturas celulares, é uma estimativa da frequência esperada dos grãos de prata sobre essas estruturas.

Desta forma, uma comparação apropriada entre as distribuições de frequência do círculo e as do grão revelará se a distribuição dos mesmos é ao acaso.

O número de grãos de prata por unidade de área (densidade) de uma estrutura, pode ser usado como uma medida de radioatividade por unidade de volume, admitindo-se espessura constante do corte, o que se torna difícil nas regiões de junção, onde os grãos de prata podem cobrir duas ou mais organelas.

As contribuições do número de grãos das áreas relativas A e B para uma região de junção AB, pode ser convenientemente de

terminada pela combinação das análises de ponto e círculo. Se durante uma análise de círculo, "n" círculos caem na junção entre AB, uma porção (a) terá seus centros em A, mas irá se sobrepor à B, e a porção (b) terá centros em B, mas se sobrepor a A (Fig. 1).

FIG. 1

Desta forma, teremos:

$$\frac{(a)}{n} = \text{proporção de A em AB} ,$$

$$\frac{(b)}{n} = \text{proporção de B em AB} .$$

Conhecendo-se as atividades específicas (densidade) de A e B, pode-se prever o número de grãos "esperados" destas duas fontes e comparar com o realmente achado:

$$G_{AB} = \frac{G_{AA}}{A_{AA}} \times A_{AB} + \frac{G_{BB}}{A_{BB}} \times A_{BA} ,$$

onde: G_{AB} = grãos em AB;

G_{AA} = grãos em A;

G_{BB} = grãos em B;

A_{AA} = área efetiva de A;

A_{BB} = área efetiva de B;

A_{AB} = círculos com centro em A, sobrepondo B;

A_{BA} = círculos com centro em B, sobrepondo A.

O mesmo tipo de cálculo pode ser feito para uma terceira organela, em caso de grãos que cubram três organelas.

As regiões compostas são regiões extensas que incluem pequenos componentes menores que os círculos. Pode-se determinar o efeito na contagem dos grãos de prata da região composta, devido aos pequenos componentes nela incluídos, com o método do círculo e ponto.

Seja por exemplo, uma região composta AC (Fig. 2), com a atividade específica de C conhecida. O efeito na contagem de grãos de C pode ser observado, desde que, se suponha que C em AC é semelhante a C isolado.

FIG. 2

Existe ainda o problema do "cross-fire". Grãos de prata produzidos pela fonte localizada em uma estrutura extensa, normalmente se sobrepõem à própria estrutura, o que não ocorre com estruturas menores. A atividade específica dessas estruturas se tornam imprecisas.

As organelas extensas e muito mais as pequenas, podem sofrer uma variação substancial no número de grãos de prata de-

vido ao efeito "cross-fire".

3.6.2 - Método quantitativo de NADLER (1971)

O objetivo do método é determinar a concentração da quantidade relativa de radioisótopo em cada estrutura. Para isso, deve-se associar o grão de prata com a estrutura na qual está a fonte radioativa emissora. Isto posto, surgem dois problemas.

O primeiro seria encontrar uma relação entre o grão de prata e a fonte radioativa, sendo que, muitos autores estudaram esse problema CARO (1962), BACHMANN e SALPETER (1965), SALPETER *et alii* (1969).

Para se relacionar os grãos de prata com as fontes radioativas nas estruturas celulares, traça-se um círculo de "resolução limite" centrado no grão de prata, relacionando-se assim, as estruturas sob o círculo com o grão de prata.

A probabilidade do círculo de resolução limite embora seja arbitrária, é comumente adotada a nível de 50%.

O grão de prata circunscrito com um círculo de resolução limite localizado sobre uma única estrutura, é chamado de grão de prata "exclusivo".

O segundo problema é o caso dos grãos de prata repartidos que se localizam sobre duas ou mais estruturas, tornando difícil a identificação da fonte que o produziu.

Segundo PELC (1963), para o ^3H , cada emissão radioativa resulta um grão de prata revelado. Desta forma, o grão de prata repartido deve pertencer a apenas uma estrutura.

NADLER (1971), em seu método sugere que se leve em consideração, quando possível, pelo menos 500 grãos de prata, pois o erro é proporcional à raiz quadrada do número de contagens.

Cada grão de prata deve ser circunscrito com círculos de resolução limite, círculos estes, que refletem uma probabilidade, para detectar a real fonte radioativa.

Uma primeira seleção das estruturas celulares, é feita levando-se em conta a frequência com que são encontradas sob os círculos de resolução limite.

Se não for possível selecionar estruturas contendo pelo menos um grão de prata exclusivo, não será possível determinar com certeza, se essa estrutura contém uma fonte radioativa.

Se o número de grãos de prata repartidos na estrutura, for inferior a 5% do número total de grãos de prata contados, deve-se excluir essa estrutura da análise pela sua baixa contribuição em relação às demais fontes.

Se o número de grãos de prata exclusivos numa estrutura é muito pequeno, inferior a 1% do número total dos grãos contados, deve-se excluir também essa estrutura.

Se o grão de prata observado, é repartido com uma estrutura excluída, então, esse grão de prata deve ser contado como

sendo da estrutura incluída.

Designando-se genericamente com $\underline{n}$ uma estrutura, pode-se relacionar os dados referentes a essa estrutura $\underline{n}$.

- a) A soma dos grãos exclusivos para essa classe é designada por $\underline{n}^E$;
- b) A soma dos grãos repartidos entre a estrutura $\underline{n}$, e outras $\underline{n}'$, $\underline{n}''$, etc., será designada por $\underline{n}^S_{\underline{n}', \underline{n}'', \dots}$.

O objetivo da análise é atribuir para cada estrutura o número real de grãos $\underline{n}^C$, sendo o número total de grãos $T_{EM} = \sum \underline{n}^C$.

A proporção de grãos repartidos que irão ser atribuídos às classes de estruturas depende de dois fatores. O primeiro fator é o número real de grãos de prata de cada estrutura $\underline{n}^C$, que deve ser comparado com as outras estruturas. A proporção de todos os grãos é resultado da radioatividade de uma determinada estrutura, esta proporção reflete também a probabilidade de um dado grão observado ser atribuído a esta estrutura.

Este fator, que é a proporção de todos os grãos repartidos entre as classes $\underline{n}$, $\underline{n}'$, $\underline{n}''$, etc., e que podem ser atribuídos à estrutura $\underline{n}$, é dado por:

$$\frac{\underline{n}^C}{\underline{n}^C + \underline{n}'^C + \underline{n}''^C + \dots}$$

O segundo fator, está relacionado com os círculos de resolução limite. Independentemente das fontes radioativas (marcação) contidas por unidade de volume, estruturas menores espalhadas pela célula são incluídas mais frequentemente nos círculos, o que não ocorre com as estruturas mais compactas. É necessário conhecer-se, então, o volume relativo da estrutura considerada.

Para a medida do volume relativo, emprega-se um molde contendo círculos de resolução com pontos centrais. Estes círculos (não menos de 500) podem se colocar no cruzamento das linhas horizontais com verticais desenhadas no molde.

A análise de ponto é feita observando-se quantas vezes a estrutura é coberta pelo ponto, e esse número é dado como uma porcentagem em relação ao número total de pontos empregados.

O volume relativo de cada estrutura tomado por pontos, é dado por $\frac{V_p}{n_p}$.

O mesmo ocorre com os círculos de resolução, assinalando-se as estruturas dentro de seus limites. O total dos círculos para cada estrutura é transformado em porcentagem, em relação ao total de círculos empregados.

O volume relativo de cada estrutura tomado por círculos, é dado por $\frac{V_o}{n_o}$.

Se a estrutura é muito difusa, é esperado um número maior de círculos do que de pontos cobrindo essa estrutura, sendo $\frac{V_o}{n_o} > \frac{V_p}{n_p}$, se a estrutura é mais compacta teremos $\frac{V_o}{n_o} < \frac{V_p}{n_p}$. O in-

O índice $\frac{\frac{V}{n_P}}{\frac{V}{n_O}} \leq 1$ será tanto maior quanto mais compacta, e tanto menor quanto mais difusa for a estrutura.

Este fator $\frac{\frac{V}{n_P}}{\frac{V}{n_O}}$, vem corrigir o efeito da dispersão das estruturas permitindo a redistribuição dos grãos repartidos sem levar em conta sua radioatividade.

3.6.3 - Contribuições autoradiográficas para métodos quantitativos segundo SALPETER

Este autor, M.M. SALPETER, tem trabalhado com outros pesquisadores, como BACHMANN (1965, 1967, 1969, 1972), E.E. SALPETER (1969, 1971, 1977, 1978), FERTUCK (1977), MC HENRY (1973, 1978), com o intuito de aprimorar as técnicas para a aplicação de métodos quantitativos em trabalhos autoradiográficos a nível de microscopia eletrônica.

BACHMANN e SALPETER (1965), baseados em estudos de CARO (1962) e PELC (1963), deram sequência aos estudos de autoradiografia quantitativa, com ênfase à resolução, sensitividades das emulsões fotográficas e a contribuição da quantidade de radioisótopos no espécime, trabalhando com ^3H .

Como a resolução autoradiográfica é muito mais pobre que a resolução do microscópio eletrônico (100 x), o autor concluiu, que isto se deve a diversos fatores, como processo fotográfico utilizado para a detecção da radiação, estendendo-se desde o decaimento do radioisótopo até a formação da imagem latente, incluindo aqui

Fatores geométricos entre fonte e detector, espalhamento da radiação no espécime e energia do emissor.

BACHMANN e SALPETER (1967) realizaram um estudo para determinar a sensibilidade de emulsões fotográficas autoradiográficas sob diversas condições, utilizando-se de ^3H e enxofre-35 (^{35}S).

Estes autores definem a sensibilidade de uma camada de emulsão como a probabilidade da radiação ser registrada na emulsão. A sensibilidade pode ser expressa como a razão entre o número de grãos de prata revelados e o número de decaimentos radioativos ocorridos.

Utilizando emulsão Ilford L4, revelador Microdol X, os autores obtiveram um valor de sensibilidade igual a 1/10 para o ^3H e 1/21 do ^{35}S . Com emulsão KODAK NTE, revelador Dektol, obtiveram os valores de 1/21 para o ^3H e 1/36 para o ^{35}S .

Segundo SALPETER *et alii* (1969), para a análise de autoradiogramas é necessário o conhecimento prévio da distribuição "esperada" dos grãos de prata ao longo de uma fonte radioativa.

Neste trabalho, os autores mostraram que a forma de distribuição "esperada" de grãos de prata, independia dos fatores que influenciam a resolução, como por exemplo, espessura da secção do corte e da emulsão, cristal de haleto de prata, tamanho do grão revelado, etc., afetando sim, a distância em que se encontravam 50% dos grãos revelados, distância esta chamada de HD-"half-distance".

Para o cálculo do HD, se utilizaram de uma fonte radioativa linear, que consistia de um sanduiche de Epon e metacrilato intercalado com um filme de poliestireno tritiado.

Cortes ultrafinos de 500 Å e semifinos de 1200 Å, foram cobertos com KODAK NTE e revelados com Dektol ou "gold latensification" - Elon ácido ascórbico. Os cortes cobertos com Ilford L4 foram revelados com Microdol X ou parafenilenediamina.

A observação dos cortes ao microscópio eletrônico, foi feita sem a utilização de coloração.

Contando aproximadamente 1000 grãos de prata, o autor conseguiu a curva da distribuição dos grãos ao longo da fonte radioativa, obtendo o HD, de 1650 Å para a emulsão Ilford L4 de espessura de 1200 Å e revelador Microdol X. Para a emulsão KODAK NTE com 1200 Å de espessura e revelador Dektol, o HD caiu para 1250 Å.

A distribuição dos grãos de prata, foi simétrica em relação a ambos os lados da fonte radioativa linear.

Determinado o HD, construiu-se em coordenadas as curvas universais, expressando a densidade e o número de grãos de prata de forma percentual, e a distância normalizada como múltiplo de HD.

A partir das informações obtidas da distribuição de grãos de prata ao longo de uma fonte linear, extrapolou a distribuição para outros tipos de fonte radioativa bem definidos, como por exemplo discos e bandas, formas essas semelhantes às estruturas encontradas nas células.

Os resultados das curvas de distribuição, foram comparados com os resultados obtidos por CARO (1962) e CARO e SCHNOS (1965), resultados estes considerados de alta qualidade, não ocorrendo discrepâncias.

Para simples cálculos de densidade de grãos de prata sobre organelas, SALPETER e MC HENRY (1973), atentam para o problema do tamanho do grão de prata revelado, pois a emulsão Ilford I4, produz grãos de até 3.000 Å de diâmetro.

Um número muito grande de grãos de prata revelados, prejudicam até a localização destes com relação a organela, sendo este um dos fatores que afetam a resolução do método.

SALPETER *et alii* (1977) determinaram os valores experimentais do HD e suas curvas de distribuição de grãos, para o ^{125}I . Segundo os autores, o valor do HD obtido para o ^{125}I difere do HD conseguido por outros pesquisadores. Neste trabalho verificaram ainda, o efeito de diversos fatores limitantes da resolução, comparando seus resultados com os resultados obtidos para o ^3H e ^{14}C .

Seus resultados permitem reavaliar os parâmetros críticos que afetam a resolução para isótopos de diferentes energias.

SALPETER *et alii* (1978), utilizando as curvas de distribuição de grãos de prata do ^{125}I , ^{14}C e ^3H , e das informações de BLACKETT e PARRY (1973) e PARRY e BLACKETT (1976) investigaram a distribuição de grãos de prata com relação a diferentes atividades e estruturas, comparando a distribuição hipotética com a distribui-

ção observada. Os casos mais complexos foram resolvidos através de um programa de computador.

3.6.4 - Outras contribuições

Todos os métodos quantitativos dependem do limite de resolução.

CARO e VAN TUBERGEN (1962) e CARO (1962) foram praticamente os primeiros pesquisadores preocupados com a resolução autoradiográfica a nível de microscopia eletrônica.

Quanto ao processo fotográfico, submeteram diferentes emulsões fotográficas nucleares, reveladores e fixadores a vários tipos de preparações, concluindo que a resolução é limitada por três fatores. O primeiro é a distância entre a fonte e os cristais de haleto de prata da emulsão, o segundo é a passagem da radiação pelo cristal e a posição da imagem latente formada, e o terceiro é a relação entre a imagem final observada — forma e tamanho da prata reduzida, e a imagem latente que o produziu.

De outra forma, os autores recomendam que para se obter alta resolução em autoradiografias, deve-se levar em consideração o tamanho e sensibilidade dos cristais de haleto de prata das emulsões fotográficas, cortes com secções ultrafinas, monocamadas de emulsão fotográfica, preparações armazenadas para exposição em ambiente seco e baixa temperatura.

Para KOPRIWA (1967), a relação fonte-grão de prata é o fator mais importante para se determinar a resolução, pois o poder de resolução de um método autoradiográfico, se refere à precisão com que é possível relacionar a fonte de radiação com a imagem autoradiográfica observada. Desta forma, o autor investigou em condições similares, o crescimento dos grãos de prata, fazendo combinações entre emulsões, reveladores e tempo de revelação.

GUPTA *et alii* (1973) usaram como fonte radioativa linear cutícula de *Schistocerca gregaria* composta de quitina e resili-na, as quais se tornaram radioativas pela incorporação de D-glucose-6- ^3H ou D-glucosamina-6- ^3H para quitina e Tirosina-3-S- ^3H para resili-na. Conseguiram o valor de 1300 a 1800 Å para o HD, quando a fonte estava situada na resili-na, e o valor de 850 a 1250 Å, quando a fonte estava situada na quitina.

Ambos os valores foram obtidos utilizando-se a emulsão Ilford L4 e como revelador para-fenilenediamina.

BLACKETT e PARRY (1973), através de informações de SALPETER *et alii* (1969) e WILLIAMS (1969), introduziram o método para análise de autoradiografia ao microscópio eletrônico, usando uma distribuição hipotética de grãos de prata.

Segundo os autores, o método leva em consideração a forma e o tamanho das estruturas observadas nas autoradiografias, evitando a construção de modelos teóricos de estruturas subcelulares. O método estima também a atividade de diferentes estruturas com a

distribuição autoradiográfica dos grãos.

O método foi aplicado no experimento de PARRY e BLACKETT (1973), no qual marcaram eritrócitos de medula de osso de rato com ^{55}Fe , PARRY e BLACKETT (1976) voltaram a aplicar o método em tecido de bulbo olfatório de rato marcados com prolina- ^3H , com atenção especial ao problema de "cross-fire".

3.7 - Análise Quantitativa Aplicada a Vírus

Pouco se encontra na literatura acerca de análise quantitativa aplicada a vírus, e menos ainda ao vírus de planta.

CARO (1962) utilizou bacteriófagos T-2 marcados com timidina ^3H como fonte radioativa aproximadamente pontual. Determinou experimentalmente a distribuição de grãos de prata, concluindo que a resolução autoradiográfica a nível de microscopia eletrônica foi da ordem de 1000 Å, utilizando a emulsão Ilford L4 e revelador Microdol X.

Estudos de locais de síntese de ácidos nucleicos de diversos vírus, foram feitos através de análises qualitativas, que graças a condições especiais permitiram obter conclusões razoáveis sobre o sítio de biossíntese dos mesmos, pela localização da estrutura celular que apresentou maior acúmulo de grãos de prata, segundo DE ZOETEN e SCHLEGEL (1967), LAFLECHE *et alii* (1972), FAVALI *et alii* (1972), NOGUEIRA (1978).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Na presente dissertação, foram medidas as áreas e calculadas as densidades de núcleo, nucléolo e citoplasma, além do conteúdo radioativo relativo do sistema VAP-mitocôndrio de células foliares de fumo *Nicotiana tabacum* L. var. Turkish NN, utilizando-se de eletrofotomicrograficas utilizadas no trabalho de NOGUEIRA (1978), cuja metodologia utilizada pelo autor, vem a seguir.

4.1 - Hospedeira Utilizada

Foram utilizadas plantas de fumo *Nicotiana tabacum* L. var. Turkish NN, mantidas em estufas de vidro, sendo inoculadas as plantas no mesmo estágio de desenvolvimento.

O inóculo consistiu de suco obtido pela trituração em almofariz de porcelana, de folhas doentes da mesma espécie, ante

riormente inoculadas com VAP, adicionando-se ao suco, solução tampão fosfato 0,2M pH 7,2 com sulfito de sódio 0,01M.

A inoculação se deu através de friccionamento mecânico do inóculo em folhas novas previamente polvilhadas com carborundum. As plantas-controle receberam o mesmo tratamento mecânico, sem o vírus.

4.2 - Preparo do Espécime

Após serem retirados pequenos fragmentos de folhas de fumo sadio e com VAP, estes foram colocados em solução aquosa de AMD (SADIO + AMD e VAP + AMD) em concentração de 75 µg/ml durante 16 horas. Por outro lado, nas mesmas condições, fragmentos foram tratados em água bidestilada (SADIO + H₂O e VAP + H₂O) por um mesmo período de tempo.

Em seguida, todas as peças foliares foram tratadas com 0,25 ml de uma solução de uridina tritiada (U - 5 - ³H) de atividade específica 29,2 Ci/mmol, durante os intervalos de tempo de 3,5 e 9 horas, sendo então, lavadas três vezes com tampão fosfato 0,15M pH 7,2 durante 1 hora, mantidas a 4 °C.

4.3 - Tratamento Para Microscopia Eletrônica

- a) Fixação: feita em glutaraldeído 3% em tampão fosfato 0,05M pH 7,2, durante 2 horas a 4 °C.
- b) Lavagens: as amostras foram quatro vezes lavadas com tampão fosfato 0,15M pH 7,2, durante 1 hora.
- c) Pós-fixação: realizada em solução de tetróxido de ôsmio a 1% em tampão fosfato 0,15M, por 1 hora.
- d) Lavagens: em seguida a pós-fixação, lavou-se as amostras três vezes em tampão fosfato 0,15M, pH 7,2, durante 30 minutos.
- e) Desidratação: foi realizada em gradientes de concentrações de acetona em água (30, 50, 70 e 90%) durante 10 minutos ca da etapa, e três banhos de vinte minutos cada, em acetona pura.
- f) Infiltração: as peças foram colocadas em gradientes de resi na em acetona em três etapas:
 - 1.^a etapa: 50% resina + 50% acetona - 2 horas
 - 2.^a etapa: 75% resina + 25% acetona - 2 horas
 - 3.^a etapa: resina pura - 24 horas a 4 °C.
- g) Inclusão: finalmente, as peças foliares foram colocadas em moldes de borracha apropriados, preenchidos com resina Epon

812, e levados às estufas de 37, 45 e 60 °C, durante 8, 16 e 24 horas respectivamente, a fim de se conseguir a polimerização.

4.4 - Microtomia

Obteve-se cortes semifinos (0,5 μ m) para microscopia óptica, e ultra finos (60-90nm) para microscopia eletrônica através de um ultramicrotomo Porter Blum modelo MT-1, utilizando-se navalhas de vidro de 6mm de espessura. Os cortes semifinos foram transferidos para lâminas previamente limpas com detergente e solução éter-álcool, e os cortes ultrafinos colocados em grades de cobre de 200 mesh cobertas com películas de colódio e carvão.

4.5 - Autoradiografia

As lâminas contendo os cortes semifinos para microscopia óptica, foram cobertas com emulsão fotográfica Ilford L4, diluída em água bidestilada na proporção 1:1 a 42 °C, espalhada rapidamente sobre os cortes, colocando-se as lâminas verticalmente em caixas pretas vedadas e mantidas a 4 °C para exposição de 7 dias. Estas foram utilizadas para se estimar o tempo de exposição necessário à microscopia eletrônica.

As grades contendo os cortes ultrafinos para microscopia eletrônica, foram colados em bastonetes de vidro com auxílio

de uma cola apropriada. Com o auxílio de alças de aço de 12mm de diâmetro, fez-se a cobertura das grades, mergulhando-as na emulsão fotográfica diluída em água bidestilada na proporção 1:1 a 33 °C. Uma vez a película solidificada na alça, produziu-se uma monocamada que é aplicada sobre as grades contendo os cortes ultrafinos. Essas grades, finalmente foram mantidas a 4 °C em atmosfera seca na ausência de luz, por aproximadamente 2 meses de exposição.

4.6 - Técnicas Fotográficas

As lâminas destinadas à microscopia óptica, foram reveladas com Dektol da Kodak a 22 °C por 4 minutos, sendo após esse tempo, fixadas em fixador comercial durante 5 minutos, também a 22 °C.

Em seguida, os cortes semifinos foram coloridos com azul de metileno, e secados à temperatura de 37 °C (BIENZ, 1977).

As grades com os cortes ultrafinos foram colocados em contato com revelador Microdol X da Kodak por 5 minutos a 22 °C. Após lavagem de alguns segundos em água bidestilada, os cortes foram colocados no fixador tiosulfato de sódio 3% em água a 22 °C, por 2 minutos e 45 segundos, sendo que, a seguir procedeu-se da seguinte forma:

- 3 lavagens de 10 minutos com água bidestilada;
- 1 lavagem em água bidestilada a 37 °C por 30 minutos;

- 1 lavagem com ácido acético 4% em água a 37 °C;
- e lavagens de 5 minutos com água bidestilada a temperatura ambiente.

Reveladas as grades, os cortes foram coloridos inicialmente com acetato de uranila 2,5% em água durante 6 minutos, lavados 60 vezes com água bidestilada, novamente coloridos, e desta vez com citrato de chumbo durante 4 minutos, finalmente lavados com água bidestilada.

4.7 - Eletrofotomicrografias

Os cortes foram observados com microscópio eletrônico Elmiskop IA da Siemens, operado a 80000 volts.

Através de chapas fotográficas tipo Projector Slide Plates da Kodak de 6,5 x 9,0cm, obteve-se os negativos das eletrofotomicrografias.

4.8 - Cálculo do HD (Half Distance)

4.8.1 - Fonte radioativa linear

A fim de se obter uma fonte radioativa linear, foi diluído tetróxido de ósmio com U-5-³H de atividade específica 29,2 Ci/ μ mol na proporção de 3:1, sendo depositado sobre um molde de borracha contendo meio bloco de resina Epon 812 polimerizada. Em seguida,

nova camada de resina é polimerizada, produzindo então, um bloco contendo material radioativo com distribuição linear.

O tetróxido de ósmio adicionado, devido sua eletrodensidade, facilitou a localização da fonte radioativa ao microscópio eletrônico.

A polimerização foi conseguida, através de estufas de 37, 45 e 60 °C, por 8, 16 e 24 horas respectivamente.

4.8.2 - Microtomia

Obteve-se cortes semifinos e ultrafinos, utilizando-se de um ultramicrotomo Porte-Blum modelo MT-1, do setor de Microscopia Eletrônica do CENA. Todos os cortes foram feitos com navalhas de vidro com 6mm de espessura.

Os cortes semifinos (0,5-1,0µm) foram montados em lâminas de vidro previamente limpas com detergente e solução éter-álcool. A posição dos cortes foi assinalada com um círculo do lado oposto da lâmina, e a preparação foi secada numa chapa quente (BIENZ, 1977).

Os cortes ultrafinos e de espessura variando entre 600-900 Å, foram colocados em grades de cobre de 200 mesh, previamente cobertas com colódio e carvão.

4.8.3 - Autoradiografia

a) Preparação para microscopia ótica (M.O.)

As lâminas com os cortes semifinos foram cobertas com emulsão Ilford L4, a qual foi fundida a 42 °C e diluída em água bidestilada na proporção de 1:1.

Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e emulsão diluída foi espalhada sobre a preparação, sendo em seguida colocadas verticalmente em caixas pretas vedadas com fita isolante preta, e mantidas a 4 °C.

A autoradiografia para M.O., foi utilizada para se estimar o período de exposição de autoradiografia para microscopia eletrônica (M.E.).

O tempo de exposição para M.O. deve ser multiplicado por um fator 10, a fim de se obter o tempo de exposição necessário a obtenção de um número adequado de grãos de prata para microscopia eletrônica (BIENZ, 1977).

b) Preparação para microscopia eletrônica (M.E.)

Para a cobertura dos cortes ultrafinos, foi utilizado o método da alça, sendo as grades fixadas no topo de bastonetes de vidro com uma cola apropriada. Todo o material utilizado na emulsão fotográfica foi previamente limpo com solução fervente de 15% de H_2O_2 , e lavado com água bidestilada.

Uma alça de aço de 12mm de diâmetro foi mergulhada na emulsão Ilford L4 diluído em água bidestilada na proporção 1:1 mantida a 33 °C.

Uma vez mergulhada, obteve-se uma película na alça através da tensão superficial, que ao se solidificar formava uma camada de cristais de haleto de prata. A seguir a alça era colocada sobre a grade.

As grades foram mantidas a 4 °C, numa atmosfera seca, em ausência de luz por tempo suficiente para a formação da imagem latente, que variou entre 45 e 70 dias.

4.8.4 - Técnicas fotográficas

a) Microscopia óptica

Lâminas contendo cortes semifinos foram colocadas em caixas de vidro apropriadas, e reveladas com Dektol da Kodak a 22 °C por 4 minutos. Em seguida foi usado o fixador comercial durante 5 minutos, a 22 °C.

Após a fixação, foram lavadas em água destilada a mesma temperatura, com posterior secagem a 37 °C.

Os cortes foram coloridos com azul de metileno, sendo que gotas do corante foram colocadas sobre os cortes da lâmina e aquecidas por 1 minuto, em seguida lavadas com água corrente e postas para secagem à temperatura de 37 °C.

b) Microscopia eletrônica

Na revelação, as grades contendo os cortes foram colocadas em contato com o revelador Microdol X da Kodak durante 5 minutos a 22 °C. Após lavagem em água bidestilada de poucos segundos, as grades foram colocadas em fixador Tiosulfato de sódio 3% em água bidestilada a 22 °C, por 2 minutos e 45 segundos.

Em seguida, procedeu-se da seguinte forma:

- 3 lavagens de 10 minutos em água bidestilada;
- 1 lavagem com água bidestilada durante 30 minutos a temperatura de 37 °C;
- 1 lavagem com ácido acético 4% em água a 37 °C;
- 3 lavagens de 5 minutos em água bidestilada a temperatura ambiente.

Não foi necessária a coloração por não se tratar de espécime biológico.

4.8.5 - Eletrofotomicrografias

As grades foram observadas com microscópio eletrônico Elmiskop IA da Siemens operando a 80 KV.

Obteve-se eletrofotomicrografias, utilizando-se chapas fotográficas tipo Projektor Slide Plates da Kodak de 6,5 x 9,0cm, todas ampliadas com o aumento de 29.100 X.

4.8.6 - Distribuição dos filamentos de prata em torno da fonte radioativa linear

Depois de um período de exposição, que variou entre 45 e 70 dias, os grãos de prata se distribuíram ao longo da fonte radioativa linear.

A fonte radioativa linear observada ao microscópio eletrônico, apresentou-se irregular, por esse motivo foram tomados pontos ao acaso sobre a fonte irregular, e traçada uma reta pela equação de regressão encontrada para cada autoradiograma.

Agora, para medir-se as distâncias dos grãos de prata à fonte, tomou-se o ponto central do eixo maior dos grãos de prata, medindo-se com régua e esquadro a distância deste à fonte.

Para a obtenção do índice quantitativo HD, as distâncias foram agrupadas em faixas, com larguras inicialmente de 1,0mm, em seguida 2,0mm e finalmente 10,0mm, conforme Tabela 10.

Obtido o número de grãos de prata por faixa de distância, traçou-se o gráfico da Fig. 5, cuja equação é da forma geral:

$$y = a + b e^{cx} \quad (\text{Apêndice}).$$

Do gráfico foi possível obter o valor do HD, distância esta que encerra 50% dos grãos de prata produzidos pela fonte. A partir deste dado, construiu-se o gráfico da Fig. 6, que mostra através de uma curva universal, a forma de distribuição de densidades de grãos de prata ao longo de uma fonte radioativa linear.

4.9 - Determinação da Densidade de Grãos de Prata das Organelas Celulares

Inicialmente, foi aplicado um método semi-quantitativo, cujo objetivo consistia em determinar a densidade de grãos de prata em organelas de células foliares de *Nicotiana tabacum* L., sã e infectadas com VAP, tratadas com H₂O ou AMD (16 horas) e incubadas em U - 5 - ³H (5 horas), conforme esquema abaixo:

- SADIO + H₂O (16 h) + U - 5 - ³H (5 h)
- SADIO + AMD (16 h) + U - 5 - ³H (5 h)
- DOENTE + H₂O (16 h) + U - 5 - ³H (5 h)
- DOENTE + AMD (16 h) + U - 5 - ³H (5 h)

a) Medida das áreas

Para medida das áreas, foi utilizado um molde transparente retangular, com 23,5 x 19,0cm, contendo 180 círculos de 10,0mm de diâmetro, com centros separados por 15mm, dispostos regularmente, representando cada círculo uma fração da área do molde.

Este molde continha diversos círculos cobrindo as várias estruturas celulares, e cada círculo passava a representar uma fração real da área da célula, na proporção do aumento aplicado às eletrofotomicrografias, medindo-se então, as áreas das estruturas nucléolo, núcleo e citoplasma, das células em μm^2 , através do núme-

4.10 - Método Quantitativo de NADLER (1971), Aplicado ao Sistema VAP - Mitocôndrio

No presente trabalho, utilizou-se o método quantitativo de NADLER (1971) com algumas modificações, uma vez que o nosso intuito foi determinar o conteúdo radioativo relativo do sistema VAP - mitocôndrio de células foliares de fumo *Nicotiana tabacum* L. infectadas com VAP, submetidas aos tratamentos H₂O ou AMD (16 h), e incubadas em U - 5 - ³H (5 h).

Para se determinar o conteúdo radioativo relativo, foi necessário discriminar a pertinência do grão de prata, sendo que, ao se analisar autorradiogramas, veem-se grãos de prata distribuídos sobre as estruturas celulares, dando à primeira vista, uma idéia de disposição casual, necessitando dessa forma, uma análise mais rigorosa.

Todos os grãos de prata do sistema VAP - mitocôndrio, foram circunscritos com um círculo de raio 1 HD (SALPETER, 1969). Os grãos de prata circunscritos cobrindo uma estrutura apenas foram denominados de exclusivos, e os que cobriam duas ou mais estruturas, repartidos.

Para a aplicação do método de NADLER (1971), considerou-se inicialmente, a seguinte equação:

$$n^C = n^E + n^S n', n'', \dots \quad (1)$$

4.10 - Método Quantitativo de NADLER (1971), Aplicado ao Sistema VAP - Mitocôndrio

No presente trabalho, utilizou-se o método quantitativo de NADLER (1971) com algumas modificações, uma vez que o nosso intuito foi determinar o conteúdo radioativo relativo do sistema VAP - mitocôndrio de células foliares de fumo *Nicotiana tabacum* L. infectadas com VAP, submetidas aos tratamentos H₂O ou AMD (16 h), e incubadas em U - 5 - ³H (5 h).

Para se determinar o conteúdo radioativo relativo, foi necessário discriminar a pertinência do grão de prata, sendo que, ao se analisar autorradiogramas, veem-se grãos de prata distribuídos sobre as estruturas celulares, dando à primeira vista, uma idéia de disposição casual, necessitando dessa forma, uma análise mais rigorosa.

Todos os grãos de prata do sistema VAP - mitocôndrio, foram circunscritos com um círculo de raio 1 HD (SALPETER, 1969). Os grãos de prata circunscritos cobrindo uma estrutura apenas foram denominados de exclusivos, e os que cobriam duas ou mais estruturas, repartidos.

Para a aplicação do método de NADLER (1971), considerou-se inicialmente, a seguinte equação:

$$n^C = n^E + n^S_{n'}, n'', \dots \quad (1)$$

sendo: ${}_nC$ = número real de grãos de prata na estrutura n;

${}_nE$ = número de grãos de prata exclusivos na estrutura n;

${}_nS_{n',n'',\dots}$ = número de grãos de prata, que eram comuns às estruturas n, n', n'', ..., e que deverão ser atribuídos à estrutura n.

Ao ser redistribuído o grão comum de duas ou mais estruturas, observaram-se dois fatores:

a) o número real de grãos de prata de uma dada estrutura, foi comparado com o número real de grão de prata de outras estruturas, pois comparando-se os números reais de grãos de prata de todas as estruturas (${}_nC, {}_{n'}C, \dots$), obtem-se dessa forma, a probabilidade de um dado grão de prata pertencer a uma ou outra estrutura. Esta proporção reflete ainda, o conteúdo radioativo das estruturas, sendo dada por:

$$\frac{{}_nC}{{}_nC + {}_{n'}C + \dots}, \quad (2)$$

para o mitocôndrio:

$$\frac{{}_M^C}{{}_M^C + {}_V^C},$$

para o VAP:

$$\frac{{}_V^C}{{}_V^C + {}_M^C}.$$

b) Com o auxílio de uma transparência contendo círculos compontos centrais, obteve-se o fator (3), o qual reflete a geometria da estrutura, relacionando o número de pontos com o número de círculos de cada estrutura, sendo dado por:

$$\frac{n_p^V}{n_o^V}, \quad (3)$$

sendo: n_p^V = número de pontos tomados sobre a estrutura n ;

n_o^V = número de círculos que ao menos toquem a estrutura n ;

$$\text{- para o mitocôndrio: } \frac{M_p^V}{M_o^V};$$

$$\text{- para o VAP: } \frac{v_p^V}{v_o^V}.$$

Para cada uma das estruturas, VAP e mitocôndrio, o fator $\frac{n_p^V}{n_o^V}$ assumiu o valor médio, representativo de todas as repetições realizadas.

Com a finalidade de redistribuir os grãos de prata comuns às várias estruturas, multiplicou-se o número de grãos de prata repartidos, com os fatores (2) e (3) associados às suas respectitivas estruturas:

$$n_{n'}^S, \dots = n_{n'}^S \times \frac{n^{C(n_p^V/n_o^V)}}{n^{C(n_p^V/n_o^V)} + n^{C(n_p^V/n_o^V)} + \dots} \quad (4)$$

sendo: $n^{S_{n'}, n''}, \dots$ = número de grãos de prata repartidos entre as estruturas $n, n', n'', \dots$

Para o mitocôndrio:

$$M_v^S = M_v^S \times \frac{M^C(M_p^V / M_o^V)}{M^C(M_p^V / M_o^V) + v^C(v_p^V / v_o^V)}$$

Para o VAP:

$$v_M^S = v_M^S \times \frac{v^C(v_p^V / v_o^V)}{v^C(v_p^V / v_o^V) + M^C(M_p^V / M_o^V)}$$

Na expressão (4) não se conhecem os termos $n^{S_{n'}, n''}$ e $n^C, n'^C \dots$. Para início do cálculo, exigiu-se uma primeira aproximação para o número real de grãos de prata n^C , ou seja:

$$\frac{n^E}{\Sigma E} = \frac{n^{C_1}}{T_{EM}},$$

sendo: n^E = número de grãos de prata exclusivo à estrutura n ;

ΣE = soma de todos os grãos de prata exclusivos de todas estruturas;

n^{C_1} = primeira aproximação do número real de grãos de prata da estrutura n ;

T_{EM} = número total de grãos de prata.

Substituindo a expressão (4) na expressão (1), tem-se:

$$n^{C_2} = n^E + n^{s_{n',n''}\dots} \times \frac{n^{C_1} (n^V_p / n^V_o)}{n^{C_1} (n^V_p / n^V_o) + n^{C_1} (n^V_p / n^V_o) + \dots} \quad (5)$$

Para o mitocôndrio:

$$M^{C_2} = M^E + M^{s_v} \times \frac{M^{C_1} (M^V_p / M^V_o)}{M^{C_1} (M^V_p / M^V_o) + v^{C_1} (v^V_p / v^V_o)}$$

Para o VAP:

$$v^{C_2} = v^E + v^{s_M} \times \frac{v^{C_1} (v^V_p / v^V_o)}{v^{C_1} (v^V_p / v^V_o) + M^{C_1} (M^V_p / M^V_o)}$$

Com a diferença entre as aproximações M^{C_1} e M^{C_2} , e v^{C_1} e v^{C_2} , não ultrapassando a 5%, os valores M^{C_2} e v^{C_2} foram aceitos como os números reais de grãos de prata dessas estruturas, caso contrário, deveriam ser feitas outras aproximações, até que as condições estatísticas estivessem satisfeitas para todas as estruturas.

O conteúdo radioativo relativo para cada estrutura foi calculado da seguinte forma:

$$\text{- Para o mitocôndrio: } \frac{M^C}{T_{EM}} \times 100\% \quad ;$$

- Para o VAP:

$$\frac{v^C}{T_{EM}} \times 100\%$$

5. RESULTADOS OBTIDOS

5.1 - Medidas das Áreas e Contagem dos Círculos

Foram medidas áreas de células de tecidos foliares de fumo submetidas aos tratamentos:

- célula sadia + H_2O (16 h) + U - 5 - 3H (5 h)
- célula sadia + AMD (16 h) + U - 5 - 3H (5 h)
- célula doente + H_2O (16 h) + U - 5 - 3H (5 h)
- célula doente + AMD (16 h) + U - 5 - 3H (5 h)

Os quatro tratamentos estão ilustrados na Fig. 3.

Para efeito comparativo, a Tabela 1 mostra dados de áreas medidas através de círculos e planímetro, estimando-se assim, uma possível fonte de erro devido a medida por círculos. Para isso foram escolhidas as medidas de nucléolos de fotos ao acaso dos qua-

FIGURA 3. Grãos de prata (gp) obtidos de células de fumo sadio com água (A) ou AMD (B) e doente com água (C) ou AMD (D), tratados durante 16 horas e incubadas em U - 5 - ^3H por 5 horas.

tro tratamentos, e comparadas estatisticamente pelo teste F, por ser esta a estrutura que mais sofreu variação em suas dimensões.

Tabela 1 - Comparação de áreas (μm^2) de nucléolo de células foliares de fumo, tratadas com H_2O ou AMD (16 h) e incubadas em U - 5 - ^3H (5 h), avaliadas através do método de círculos e planímetro.

TRATAMENTOS	Planímetro Área de Nucléolo (μm^2)	Círculos Área de Nucléolo (μm^2)
SADIO + H_2O	16,35	16,44
	7,29	7,62
	2,62	4,48
	3,05	2,90
	3,58	3,86
SADIO + AMD	3,14	3,23
	1,51	1,42
	3,39	3,66
	1,63	1,69
	1,58	1,58
VAP + H_2O	2,53	2,68
	7,97	8,03
	1,90	1,80
	0,70	0,68
	2,09	2,04
VAP + AMD	0,37	0,36
	4,44	4,59
	4,85	5,16
	3,98	4,13
	10,27	11,02

Análise de Variância

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	1	0,43	0,43	0,038 ^{ns}
Resíduo	38	436,95	11,50	
Total	39			

$$F_{1\%}(1,38) = 7,35$$

As áreas do nucléolo, núcleo e citoplasma submetidas aos tratamentos, foram comparadas estatisticamente através do teste F e Tukey, conforme dados dispostos nas Tabelas 2, 3 e 4.

Tabela 2 - Análise estatística do efeito dos tratamentos com H₂O ou AMD (16 h) sobre a área (μm^2) do nucléolo de células foliares de fumo sadio e infectados com VAP, incubadas em U - 5 - ³H (5 h).

SADIO + H ₂ O	SADIO + AMD	DOENTE + H ₂ O	DOENTE + AMD
3,86	1,69	5,90	4,13
15,39	1,12	6,28	6,52
16,44	0,51	3,34	2,90
8,58	1,58	2,68	0,72
2,90	3,66	8,03	2,04
2,48	2,20	7,36	11,02
11,16	2,92	2,04	4,60
15,39	1,46	0,68	4,08
7,62	3,23	1,98	0,36

Análise de Variância

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	3	259,2410	86,4137	6,92**
Resíduo	32	399,6561	12,4892	
Total	35	658,8971		

$$F_{1\%}(3,32) = 4,46$$

Tratamentos	Médias (μm^2)
SADIO + H ₂ O	9,31
SADIO + AMD	2,04
DOENTE + H ₂ O	4,25
DOENTE + AMD	4,04
D.M.S. (Tukey 1%)	5,63

Tabela 3 - Análise estatística do efeito dos tratamentos com H_2O ou AMD (16 h) sobre a área (μm^2) do núcleo de células foliares de fumo sadia e infectadas com VAP, incubadas com $U - 5 - ^3H$ (5 h).

SADIO + H_2O	SADIO + AMD	DOENTE + H_2O	DOENTE + AMD
33,46	20,23	38,38	70,18
73,53	32,60	31,40	68,11
63,82	31,68	53,18	83,60
33,46	45,38	76,26	50,68
68,66	24,89	46,73	56,47
48,98	36,60	37,46	45,61
47,74	29,65	70,91	59,16
69,25	37,04	48,84	69,43
17,95	20,16	65,80	44,37

Análise de Variância

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	3	4.317,1790	1.439,0596	6,63**
Resíduo	32	6.946,0810	217,0650	
Total	35	11.263,2600		

$$F_{1\%}(3,32) = 4,46$$

Tratamentos	Médias (μm^2)
SADIO + H_2O	50,76
SADIO + AMD	30,91
DOENTE + H_2O	52,11
DOENTE + AMD	60,85
D.M.S. (Tukey 1%)	23,47

Tabela 4 - Análise estatística do efeito dos tratamentos H_2O ou AMD (16 h) sobre a área (μm^2) do citoplasma de células foliares de fumo sadio e infectadas com VAP, incubadas em U - 5 - 3H (5 h).

SADIO + H_2O	SADIO + AMD	DOENTE + H_2O	DOENTE + AMD
9,87	16,30	15,07	36,12
48,74	16,86	8,16	72,24
68,66	52,02	34,87	49,23
4,72	15,44	21,41	29,68
9,67	10,98	25,42	21,00
41,72	29,28	19,40	33,30
10,60	15,37	17,32	4,60
40,18	56,36	9,70	49,60
16,32	2,06	14,62	31,62

Análise de Variância

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	3	1.540,4950	513,4983	1,59 ^{ns}
Resíduo	32	10.316,5710	322,3928	
Total	35	11.857,0660		

$$F_{1\%}(3,32) = 4,46$$

Tratamentos	Médias (μm^2)
SADIO + H_2O	27,81
SADIO + AMD	23,85
DOENTE + H_2O	18,44
DOENTE + AMD	36,38

Na Tabela 5, estão dispostas as áreas médias e representativas de nucléolo, núcleo e citoplasma de células foliares de fumo.

Tabela 5 - Áreas médias (μm^2) e representativas de células foliares de fumo sadio e doente tratados com H_2O ou AMD (16 h) e U - 5 - ^3H (5 h).

TRATAMENTOS	NUCLÉOLO	NÚCLEO	CITOPLASMA	ÁREA TOTAL
SADIO + H_2O	9,31	50,76	27,81	87,88
SADIO + AMD	4,25	52,11	18,44	74,80
DOENTE + H_2O	2,04	30,91	23,85	56,80
DOENTE + AMD	4,04	60,85	36,38	101,27

5.2 - Contagem dos Grãos de Prata e Cálculo da Densidade (Número de Grãos de Prata/ μm^2)

Para a contagem dos grãos de prata, estes foram circunscritos e sobre a eletrofotomicrografia foi colocado um molde com círculos dispostos regularmente. Contou-se apenas os grãos de prata, cujo círculo abrangia pelo menos metade do círculo do molde.

O método foi aplicado em eletrofotomicrografias de células foliares de fumo sadio e infectados com VAP, submetidos aos tratamentos de H_2O ou AMD durante 16 horas e incubados em uridina tritiada por 5 horas.

Uma vez conhecidas as áreas, e contados os grãos de prata sobre as estruturas das células submetidas aos tratamentos, os dados foram comparados estatisticamente através do teste F e Tukey, conforme as tabelas 6, 7 e 8.

Tabela 6 - Análise estatística do efeito dos tratamentos na densidade (número de grãos de prata/ μm^2) de nucléolos de células foliares de fumo tratadas com H_2O ou AMD (16 h) e incubadas com uridina tritiada (5 h).

SADIO + H_2O	SADIO + AMD	DOENTE + H_2O	DOENTE + AMD
1,55	0,00	1,52	0,97
0,78	0,00	0,16	1,53
0,97	0,00	1,20	0,35
1,75	0,00	2,53	1,38
1,03	0,00	1,49	2,45
1,61	0,00	0,50	0,27
1,34	0,00	1,50	0,00
0,97	0,00	1,96	0,49
0,66	0,704	2,96	0,00

Análise de Variância

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	3	19,4884	6,4961	47,17**
Resíduo	32	4,4064	0,1377	
Total	35	23,8948		

$$F_{1\%}(3,32) = 4,46$$

Tratamentos	Médias (nº de grãos de Ag/ μm^2)
SADIO + H_2O	1,18
SADIO + AMD	0,08
DOENTE + H_2O	1,54
DOENTE + AMD	0,83
D.M.S. (Tukey 1%)	0,59

Tabela 7 - Análise estatística do efeito dos tratamentos na densidade (número de grãos de prata/ μm^2) de núcleos de células foliares de fumo tratadas com H_2O ou AMD (16 h) e incubadas com uridina tritiada (5 h).

SADIO + H_2O	SADIO + AMD	DOENTE + H_2O	DOENTE + AMD
0,20	0,00	0,42	0,37
0,24	0,03	0,25	0,34
0,52	0,00	0,20	0,07
0,78	0,03	0,34	0,22
0,20	0,00	0,61	0,24
0,14	0,10	0,35	0,06
0,36	0,03	0,82	0,03
0,39	0,00	0,70	0,07
0,72	0,00	0,50	0,72

Análise de Variância

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	3	1,0487	0,3495	9,42**
Resíduo	32	1,1872	0,0371	
Total	35	2,2359		

$$F_{1\%}(3,32) = 4,46$$

Tratamentos	Médias (nº de grãos de Ag/ μm^2)
SADIO + H_2O	0,39
SADIO + AMD	0,02
DOENTE + H_2O	0,47
DOENTE + AMD	0,24
D.M.S. (Tukey 1%)	0,31

Tabela 8 - Análise estatística do efeito dos tratamentos na densidade (número de grãos de prata/ μm^2) de citoplasma de células foliares de fumo tratadas com H_2O ou AMD (16 h) e incubadas com U - 5 - ^3H (5 h).

SADIO + H_2O	SADIO + AMD	DOENTE + H_2O	DOENTE + AMD
0,20	0,06	0,00	0,19
0,12	0,06	0,12	0,18
0,13	0,02	0,09	0,05
0,00	0,01	0,51	0,12
0,00	0,00	0,28	0,00
0,14	0,00	0,39	0,00
0,28	0,00	0,36	0,00
0,12	0,00	0,52	0,07
0,55	0,00	0,27	0,00

Análise de Variância

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	3	0,3464	0,1155	6,83**
Resíduo	32	0,5405	0,0169	
Total	35	0,8869		

$$F_{1\%}(3,32) = 4,46$$

Tratamentos	Médias (nº de grãos de Ag/ μm^2)
SADIO + H_2O	0,17
SADIO + AMD	0,03
DOENTE + H_2O	0,28
DOENTE + AMD	0,07
D.M.S. (Tukey 1%)	0,21

A Tabela 9 reúne as densidades médias (número de grãos de prata/ μm^2) de nucléolo, núcleo e citoplasma de células foliares de fumo.

Tabela 9 - Densidades médias (número de grãos de prata/ μm^2) de nucléolo, núcleo e citoplasma de células foliares de fumo sadio e infectados com VAP, tratadas com H_2O ou AMD (16 h) e U - 5 - ^3H (5 h).

TRATAMENTO	NUCLÉOLO	NÚCLEO	CITOPLASMA
SADIO + H_2O	1,18	0,39	0,17
SADIO + AMD	0,08	0,02	0,03
DOENTE + H_2O	1,54	0,47	0,28
DOENTE + AMD	0,83	0,24	0,07

5.3 - Cálculo do HD ("half distance")

Uma vez preparada a fonte radioativa linear, conforme método descrito (Fig. 4), obteve-se as curvas de distribuição dos grãos de prata.

Tomadas as distâncias dos grãos de prata à fonte linear, agruparam-se os grãos em faixas de distância, conforme Tabela 10.

Como foi possível discriminar os lados da fonte linear, os grãos foram contados separadamente, não ocorrendo diferen-

FIGURA 4. Grãos de prata (gp) distribuídos ao longo de uma fonte radioativa linear (fl), constituída de OsO_4 e $\text{U} - 5 - ^3\text{H}$ na proporção 3:1.

ças significativas entre as distribuições em ambos os lados.

Tabela 10 - Grãos de prata distribuídos em faixas de distância, a partir da fonte linear constituída de OsO_4 e $\text{U} - 5 - {}^3\text{H}$, contados nas eletrofotomicrografias dos cortes ultrafinos de Epon - 812.

FAIXAS (mm)	Nº de grãos de prata	Σ do nº de grãos acumulados
0 - 1,0	41	-
1,1 - 2,0	36	77
2,1 - 4,0	64	141
4,1 - 6,0	45	186
6,1 - 8,0	45	231
8,1 - 10,0	46	277
10,1 - 12,0	35	312
12,1 - 14,0	24	336
14,1 - 16,0	11	347
16,1 - 18,0	17	364
18,1 - 20,0	14	378
20,1 - 30,0	14	392
30,1 - 40,0	15	407
40,1 - 50,0	4	411
50,1 - 60,0	8	419
60,1 - 100,0	7	426

A curva obtida com os dados da Tabela 10, foram colocados na Fig. 5.

Fig. 5 - Curva de distribuição dos grãos de prata, ao longo de uma fonte radioativa linear.

A curva que se ajusta aos dados experimentais segue o modelo geral da forma: $y = a + b e^{cx}$, cujos detalhes de cálculo se encontram no Apêndice.

Com o auxílio de uma programação, a equação de regressão da curva encontrada pelo método dos quadrados mínimos, foi a seguinte:

$$y = 416,06905 - 424,522030 \cdot e^{-0,2533x} \quad .$$

Substituindo-se o y pela metade dos grãos de prata contados, pode-se encontrar o valor de x, que no caso representa o valor do HD para nossas condições:

$$x = 2021,9 \text{ \AA} \quad .$$

A Fig. 6 mostra a distribuição de densidades através de uma curva universal, à medida que se afasta da fonte linear. Nas ordenadas, temos densidade relativa percentual, e nas abscissas a distância em números de HD (distância/HD).

Fig. 6 - Curva universal mostrando a distribuição de densidade a partir de uma fonte radioativa linear.

5.4 - Determinação do Conteúdo Radioativo Relativo do Sistema VAP - Mitocôndrio

Tendo como objetivo a determinação do conteúdo radioativo relativo no sistema VAP-mitocôndrio, aplicou-se o método de NADLER (1971), com algumas alterações.

As classes de estrutura foram escolhidas de acordo com a frequência com que surgiam nos autoradiogramas, sendo selecionadas as seguintes:

- (a) mitocôndrio + ribossomo;
- (b) mitocôndrio + VAP + ribossomo;
- (c) mitocôndrio + núcleo;
- (d) mitocôndrio + membrana plasmática + parede celular;
- (e) mitocôndrio + cloroplasto + VAP;
- (f) mitocôndrio + cloroplasto.

5.4.1 - Cálculo do conteúdo radioativo relativo no sistema VAP-mitocôndrio, submetido ao tratamento H_2O (16 h) e U - 5 - 3H (5 h)

A Tabela 11 mostra as classes de estruturas com grãos de prata exclusivos e repartidos (Fig. 7A), e os fatores geométricos de cada estrutura (V_p/V_o).

Nesta tabela, são colocadas todas as classes de estruturas, das quais serão excluídas aquelas que possuírem menos de 5% do total de grãos. A partir das classes selecionadas, montou-se a Tabela 12.

FIGURA 7. Grãos de prata exclusivos (gpe) e grãos de prata repartidos (gpr) sobre o sistema VAP - mitocondrio de células de fumo tratadas com água (A) e AMD (B) durante 16 horas e incubadas em U - 5 - ^3H por 5 horas.

Tabela 11 - Estruturas com grãos de prata exclusivos e repartidos no sistema VAP-mitocôndrio, submetido ao tratamento H₂O (16 h) e U - 5 - ³H (5 h).

ESTRUTURAS	Grãos Exclusivos	$\frac{n_p^V}{n_o^V}$
Mitocôndrio	24	0,5514
VAP	41	0,4275
Sub Total	65	
ESTRUTURAS	Grãos Repartidos	
Mitoc/VAP	129	
VAP/Núcleo	1	
VAP/citoplasma	4	
Mitoc/outros**	16	
VAP/outros**	6	
*Citossol	13	
Mitoc/citossol	9	
Sub Total	178	
TOTAL GERAL	243	

* A classe citossol foi excluída.

** Ribossomos.

Os grãos repartidos, cujos números correspondiam a menos de 5% do total, passaram a classe de estrutura mais importante, no caso a do mitocôndrio ou a do VAP.

Tabela 12 - Estruturas com grãos de prata exclusivos e repartidos, levando-se em consideração a exclusão de classes de estrutura com menos de 5% do total dos grãos.

ESTRUTURAS	Grãos Exclusivos	$\frac{V_p}{V_o}$
Mitocôndrio	49	0,5514
VAP	52	0,4275
Sub Total	101 (ΣE)	
ESTRUTURAS	Grãos Repartidos	
Mitoc/VAP	129	
Sub Total	129	
TOTAL GERAL	230 (T_{EM})	

Cálculo do conteúdo radioativo relativo:

. Equação geral (NADLER, 1971):

$$n^{C_2} = n^E + n^{S_{n',n''},...} \times \frac{n^{C_1} \left(\frac{V_p}{V_o} \right)}{n^{C_1} \left(\frac{V_p}{V_o} \right) + n'^{C_1} \left(\frac{V_p}{V_o} \right) + ...}$$

. Aproximação inicial para o número real de grãos de prata do mitocôndrio:

$$M^{C_1} = \frac{M^E}{\Sigma E} \times T_{EM}$$

$$M^{C_1} = \frac{49}{101} \times 230 = 111,58 \approx 112$$

- . Aproximação inicial para o número real de grãos de prata do VAP:

$$v_{C_1} = \frac{v^E}{\Sigma E} \times T_{EM}$$

$$v_{C_1} = \frac{52}{101} \cdot 230 = 118,41 \approx 119$$

- . Segunda aproximação do número real dos grãos de prata do mitocôndrio:

$$M_{C_2}^C = M^E + M^S_v \times \frac{M_{C_1}^C (M^V_p / M^V_o)}{M_{C_1}^C (M^V_p / M^V_o) + v_{C_1} (v_p / v_o)}$$

$$M_{C_2}^C = 49 + 129 \times \frac{112(0,5514)}{112(0,5514) + 119(0,4275)}$$

$$M_{C_2}^C = 49 + 70,73 = 119,73 \approx 120$$

$$M_{C_2}^C = 120 \text{ grãos de prata.}$$

Torna-se desnecessária uma terceira aproximação, pois a segunda aproximação não difere da primeira em mais de 5% (NADLER, 1971).

Segunda aproximação do número real dos grãos de prata do VAP:

$${}_vC_2 = {}_vE + {}_vS_M \times \frac{{}_vC_1({}_vV_p / {}_vV_o)}{{}_vC_1({}_vV_p / {}_vV_o) + {}_mC_1({}_mV_p / {}_mV_o)}$$

$${}_vC_2 = 52 + 129 \times \frac{119(0,4275)}{119(0,4275) + 112(0,5514)}$$

$${}_vC_2 = 52 + 58,27 = 110,27 \approx 111$$

$${}_vC_2 = 111 \text{ grãos de prata.}$$

Aqui também, é desnecessária a terceira aproximação, pois a segunda aproximação não difere da primeira em mais de 5% (NADLER, 1971), e o novo T_{EM} passa a ser 231.

Finalmente, o conteúdo radioativo relativo nas estruturas é de:

$$\text{Mitocôndrio: } \frac{120}{231} \times 100\% = 51,94 \approx 52\%$$

$$\text{VAP: } \frac{111}{231} \times 100\% = 48,05 \approx 48\%$$

5.4.2 - Cálculo do conteúdo radioativo relativo no sistema
VAP-mitocôndrio, submetido ao tratamento de AMD
(16 h) e U - 5 - ^3H (5 h)

Da mesma forma para este tratamento, foram obtidas as estruturas contendo grãos de prata exclusivos e repartidos (Fig.7B) , com seus respectivos fatores geométricos ($\frac{V_p}{V_o}$), conforme Tabela 13.

Nota-se na Tabela 13, o número reduzido de grãos de prata devido a ação do antibiótico AMD, o qual inibe a síntese de RNA normal.

Na Tabela 14 são colocadas as estruturas selecionadas pela exclusão daquelas que possuíam menos de 5% do total de grãos.

Tabela 13 - Estruturas com grãos de prata exclusivos e repartidos, no sistema VAP-mitocôndrio, submetidos ao tratamento AMD (16 h) e U - 5 - ^3H (5 h).

ESTRUTURAS	Grãos Exclusivos	$\frac{V_o}{n_o} / \frac{V_o}{n_o}$
Mitocôndrio	5	0,5322
VAP	25	0,3822
Sub Total	30	
ESTRUTURAS	Grãos Repartidos	
Mitoc/VAP	47	
Mitoc/VAP/cloroplasto	1	
VAP/cloroplasto	1	
Mitoc/cloroplasto	1	
Sub Total	50	
TOTAL GERAL	80	

Tabela 14 - Estruturas com grãos de prata, exclusivos e repartidos, levando-se em consideração a exclusão de estruturas com menos de 5% do total dos grãos.

ESTRUTURAS	Grãos Exclusivos	$\frac{V_p}{n_p} / \frac{V_o}{n_o}$
Mitocôndrio	6	0,5322
VAP	26	0,3822
Sub Total	32 (ΣE)	
ESTRUTURAS	Grãos Repartidos	
Mitoc/VAP	48	
Sub Total	48	
TOTAL GERAL	80 (T_{EM})	

Cálculo do conteúdo radioativo relativo, através da equação geral (NADLER, 1971).

, Primeira aproximação para o número real de grãos de prata do mitocôndrio:

$$M^C_1 = \frac{M^E}{\Sigma E} \times T_{EM}$$

$$M^C_1 = \frac{6}{32} \times 80 = 15$$

$$M^C_1 = 15 \text{ grãos de prata.}$$

. Primeira aproximação para o número real de grãos de prata do VAP:

$$v_{C_1} = \frac{E}{\Sigma E} \times T_{EM}$$

$$v_{C_1} = \frac{26}{32} \times 80 = 65$$

$$v_{C_1} = 65 \text{ grãos de prata.}$$

. Segunda aproximação do número real de grãos de prata do Mito_côndrio:

$$M_{C_2}^C = M^E + M^{S_V} \times \frac{M_{C_1}^C (V_p/V_o)}{M_{C_1}^C (V_p/V_o) + v_{C_1} (v_p/v_o)}$$

$$M_{C_2}^C = 6 + 48 \times \frac{15(0,5522)}{15(0,5522) + 65(0,3822)}$$

$$M_{C_2}^C = 6 + 11,67 = 17,67 \approx 18$$

$$M_{C_2}^C = 18 \text{ grãos de prata.}$$

. Segunda aproximação do número real de grãos de prata do VAP:

$$v_{C_2}^C = v^E + v^S \times \frac{v_{C_1}^C (v_p/v_o)}{v_{C_1}^C (v_p/v_o) + M_{C_1}^C (V_p/V_o)}$$

$$\frac{C}{v_2} = 26 + 48 \times \frac{65(0,3822)}{65(0,3822) + 15(0,5322)}$$

$$\frac{C}{v_2} = 26 + 36,33 = 62,33 \approx 63$$

$$\frac{C}{v_2} = 63 \text{ grãos de prata.}$$

Com a segunda aproximação, torna-se desnecessária a terceira aproximação, pois tanto o número de grãos de prata do mitocôndrio como do VAP, não diferem em mais de 5% de suas primeiras aproximações. Desta forma, o novo T_{EM} passa a ser 81.

Finalmente, o conteúdo radioativo relativo de ambas as estruturas, é de:

$$\text{Mitocôndrio: } \frac{\frac{C}{M_2}}{T_{EM}} \times 100\% = \frac{18}{81} \times 100\% = 22,22\%$$

$$\text{VAP: } \frac{\frac{C}{v_2}}{T_{EM}} \times 100\% = \frac{63}{81} \times 100\% = 77,77\%$$

6. DISCUSSÃO

Estudos recentes procuram evidenciar os locais de síntese intracelular de RNA viral, através de métodos autoradiográficos, que envolvem a utilização de radioisótopos de baixa energia como traçadores.

Os locais de síntese do RNA viral variam conforme a planta hospedeira e o vírus, tendo sido mencionados até o momento, cerca de cinco locais intracelulares de síntese de RNA de vírus de planta, segundo DE ZOETEN e SCHLEGEL (1967), LAFLÈCHE e BOVÉ (1971), WOLANSKI e CHAMBERS (1971), FAVALI *et alii* (1973), NOGUEIRA E SILVA (1976, 1976a) e NOGUEIRA (1978).

Um método semi quantitativo foi aplicado no trabalho de NOGUEIRA (1978), no qual células foliares de fumo *Nicotiana tabacum* L. sadias e infectadas com VAP foram incubadas com H_2O ou AMD

durante 16 horas, e a seguir tratadas com U - 5 - ^3H durante 5 horas.

A fim de se determinar a densidade de grãos de prata no nucléolo, núcleo e citoplasma, foram contados os grãos de prata e medidas as áreas dessas estruturas.

Antes da determinação das áreas pelo método dos círculos, comparou-se a eficiência do mesmo, com o método de determinação de áreas pelo planímetro.

As áreas de nucléolo de células de fumo sadio e doente, tratadas com H_2O ou AMD e U - 5 - ^3H , medidas pelos dois métodos e analisadas estatisticamente (Tabela 1), não apresentaram diferenças significativas, permitindo uma opção pelo método dos círculos, que é mais simples e rápido.

Os dados das Tabelas 2, 3 e 4, cujas médias estão na Tabela 5, foram também analisados estatisticamente, através dos testes F e de Tukey.

Esses testes revelaram que a AMD provocou redução nas áreas do nucléolo e núcleo de célula sadia, mas não alterou as mesmas áreas das células doentes.

A julgar pelos testes F e de Tukey, a presença do VAP afetou apenas a área do nucléolo.

Os resultados da presente Dissertação mostram, então, que tanto o tratamento com AMD, como a presença do VAP, provocam al

terações nas áreas celulares, fato este não constatado em trabalho anterior (NOGUEIRA, 1978).

O tratamento com AMD, além de causar diferenças nas áreas de núcleo e nucléolo, também provocou uma inibição indireta da síntese de RNA viral da ordem de 54%. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que, a síntese do RNA do VAP é afetada pela inibição direta dos ácidos nucleicos normais pelo AMD, com consequente redução de biossínteses de enzimas e proteínas em geral.

A observação dos dados da Tabela 9 revela que as densidades de grão de prata no nucléolo, núcleo e citoplasma de células doentes tratadas com AMD, guardam uma proporção aproximada de 14,5:3,5:1, respectivamente.

A proporção das densidades das três organelas de células doentes tratadas com AMD é bastante sugestiva, pois os dados do experimento controle com célula sadia e antibiótico, reduzindo eficientemente a incorporação de uridina marcada, sugerem que as densidades em questão devem ser devidas apenas ao RNA viral. O fato de que a maior densidade se encontra no nucléolo, parece indicá-lo como o sítio mais provável de síntese do RNA do VAP, confirmando assim os resultados obtidos por NOGUEIRA (1978).

O valor do HD determinado no laboratório do Setor de Microscopia Eletrônica do CENA, foi aproximadamente de 2000 Å, diferindo do valor encontrado por SALPETER (1969), que é da ordem de 1600 Å. Esse parâmetro, válido para as nossas condições de pesquisa,

é de suma importância para os trabalhos quantitativos, pois permite utilizá-lo para a localização da fonte radioativa contida na estrutura celular, pois o grão de prata circunscrito pelo círculo de raio 1 HD, está situado numa região em que se espera ocorrer 50% dos grãos de prata devidos à fonte intracelular a ser determinada.

O valor do HD encontrado em nosso laboratório, foi obtido pelo estudo da distribuição de 426 grãos de prata em torno da fonte linear, tendo sido considerado grãos até a distância de 20000 Å a partir da fonte. Posteriormente, observou-se que essa distância correspondia a 10 HD, e que portanto, satisfazia as recomendações de SALPETER (1969).

A determinação do HD para as condições de nosso laboratório apresenta uma diferença da ordem de 25%, variação essa similar ao que acontece em outros laboratórios, com igual ou diferentes traçadores.

Com os resultados de trabalhos anteriores sobre VAP, pode-se numa primeira aproximação, admitir que a síntese dos dois tipos de RNA da população do VAP (55 e 220nm) se dá no nucléolo, e posteriormente adquire sua capa protéica em áreas próximas aos mitocôndrios, razão pela qual foi levantada a hipótese de que a fonte de produção de grãos de prata sobre o sistema VAP-mitocôndrio devia ser o RNA do vírus.

A incorporação de U - 5 - ^3H no ácido nucléico do VAP, propicia a formação de grãos de prata sobre os componentes des

se sistema, contudo a incorporação da U - 5 - ^3H podia se dar tanto no ácido nucléico do VAP, como no do mitocôndrio, podendo até ocorrer uma contribuição simultânea de duas fontes radioativas para a formação dos grãos de prata encontrados no sistema.

Este fato dificulta a discriminação da fonte radioativa, e não poderia ser realizada pelos métodos qualitativos.

Para a resolução do problema, utilizamos o método quantitativo de NADLER (1971), com modificações baseadas nos estudos de SALPETER (1969) e WILLIAMS (1969). A distinção entre os RNAs marcados é, via de regra, difícil, pois nos espécimes tratados com H_2O (16 h) e U - 5 - ^3H (5 h), observou-se semelhante capacidade de síntese, isto é, 48% para a RNA viral e 52% para o RNA normal.

Analisando-se os resultados pelo método quantitativo mencionado e para o tratamento AMD (16 h) e U - 5 - ^3H (5 h), verificou-se que no sistema VAP-mitocôndrio, o mitocôndrio teve uma participação modesta e da ordem de 22%, enquanto o RNA do VAP contribuiu com 78% da síntese. Esses resultados estão de acordo com a primeira hipótese de trabalho, segundo a qual o RNA viral das partículas associadas ao mitocôndrio teria sido sintetizado no nucléolo e translocado para o mitocôndrio após 5 horas de incubação em U - 5 - ^3H .

Como se depreende do que foi discutido no tratamento AMD (16 h) e U - 5 - ^3H (5 h), não é possível negar a ocorrência de fonte radioativa no mitocôndrio, contudo a análise feita deixou cla

ro que as partículas de VAP ligadas ao mitocôndrio constituem a prin
cipal fonte de formação de grãos de prata do sistema.

Parece bastante interessante lembrar também, que os resultados quantitativos assim obtidos podem ser tomados como infor
mações adicionais de que a área de replicagem do RNA do VAP, não so
fre a drástica restrição que a atividade da polimerase dos RNA nor
mais sofre com a presença do antibiótico AMD, utilizado em um dos tratamentos.

Vale lembrar ainda, que o fato de se ter comprovado a presença de partículas de vírus marcado em associação com os mito
côndrios após 5 horas de tratamento com U - 5 - ^3H , não significa que
essas partículas marcadas não possam se formar e translocar do nu
cléolo para o mitocôndrio em menos tempo. Aliás, se a capacidade de
união dos nucleotídeos for da ordem de 30 a 40 nucleotídeos por se
gundo, como a da polimerase dos RNAs normais, e considerando que o
RNA do VAP tenha de 6000 a 10000 nucleotídeos, comparando-o com o ví
rus do mosaico comum do fumo (TMV), considerando também que a migra
ção de diversas macromoléculas de importância biológica se faz em
questão de poucos minutos, parece razoável esperar que a síntese e
translocação das partículas do VAP possa ocorrer em período menor
que 5 horas.

Adicionalmente, esses resultados mostraram que a via
bilidade do método de NADLER para o sistema em questão, permite es
perar solução de casos semelhantes com outros vírus e até viabili-

zar estudos de natureza bioquímica com diversos componentes químicos das células normais.

7. CONCLUSÕES

- 1 - A determinação das áreas celulares pelo método dos círculos não apresentou diferenças significativas com relação às mesmas áreas avaliadas pelo planímetro, permitindo assim optar pelo primeiro, que é mais rápido e simples.
- 2 - Os resultados dos testes F e de Tukey revelaram que as áreas do nucléolo e núcleo das células sadias sofreram uma redução na presença de AMD, razão pela qual as densidades não puderam ser determinadas em relação à área média geral das células do tecido foliar de fumo. Efeito semelhante ocorreu com a área do nucléolo, devido à presença do VAP.
- 3 - As densidades de grãos de prata mostraram que a AMD provocou alta inibição indireta da síntese do RNA viral.

- 4 - As relações das densidades de grãos de prata do nucléolo e do núcleo com a densidade dos mesmos no citoplasma indicaram que o nucléolo é o local de biossíntese do RNA do VAP.
- 5 - O valor do HD ("half distance"), para aplicação do método quantitativo de NADLER nas nossas condições, foi previamente determinado, revelando diferenças da ordem de 25% em relação a alguns valores da literatura.
- 6 - A aplicação do modelo matemático proposto por NADLER para distinguir a fonte radioativa no sistema VAP-mitocôndrio, mostrou-se altamente promissor na solução de problemas dessa natureza, e indicou que dentre os grãos de prata formados sobre o mesmo, 78% se deve ao RNA do vírus marcado no nucléolo durante as 5 horas de tratamento com uridina tritiada.

8. SUMMARY

Quantitative autoradiography at electronic microscopy level of tobacco cells (*Nicotiana tabacum* L.) infected by pepper ringspot virus

In this work several problems correlated with the RNA replication of the pepper ringspot virus, its translocation and its association with mitochondria were studied.

Some basic aspects were examined before the beginning of this work to give the means to reach the proposed objectives:

a) The actinomycin D (AMD) effects on parts of the nucleolus, nucleus and cytoplasm of healthy cells and cells infected with the pepper ringspot virus.

In this study were noted that the presence of AMD reduced in the healthy cells the area of the nucleus and nucleolus. Statistics tests showed that in the presence of virus only the nucleolus presented similar reduction in its area.

The AMD caused also an indirect inhibition of the RNA viral synthese.

b) The previous result of the comparative study between the circle method and the planimetry method to determine the cell areas, conducted to the choose of the first method because it makes easy to obtain the silver grains density with the same precision.

c) The silver grains density proportion between nucleolus, nucleus and cytoplasm of the cells treated with AMD, presented the following relation 14,5:3,5:1, respectively. This proportion confirm the idea that the biosynthese of the RNA of the two particles of the virus population (55 and 220nm) takes place in the nucleolus.

d) Determination of the HD (Half-Distance) for our conditions, with an approximated value of 2000 Angstrons.

With respect to the translocation and association of the virus with the mitochondria in the host cells the use of the mathematical model proposed by NADLER gave two basic informations.

First it showed that in the mitochondria associated system the silver grains covering the two components were predomi-

nantely constituted by the RNA of the virus radioactive (78%).

The second is concerning to the necessary time for the RNA synthese, the virus maturity and its translocation to the mitochondria. This time checked by U - 5 - ^3H treatment showed that the synthese process and the translocation could be shorter than 5 hours.

The results obtained with the used method, shows that it could be used for the virus-mitochondria system for other virus and it comes also to be the good solution for some biosynthetic aspects of compounds like hormones and enzymes in normal cells.

9. LITERATURA CITADA

ALLEN, T.C. Jr., 1973. Eletron Microscopy of Tobacco Rattle Type Viruses. Phytopathology. 53:11-37.

BACHMANN, L. e M.M. SALPETER, 1965. Autoradiography with the Eletron Microscope. A Quantitative Evaluation. Lab. Invest. 14: 1041-1053.

BACHMANN, L. e M.M. SALPETER, 1967. Absolute Sensitive of Eletron Microscope Autoradiography. J. Cell. Biol. 33:299-305.

BALD, J.G., 1964. Cytological Evidence for the Production of Plant Virus Ribonucleic Acid in the Nucleus. Virology. 22:377-387.

BALD, J.G., 1966. Cytology of Plant Virus Infections. Advan. Virus Res. 12:103-125.

- BALD, J.G. e R.A. SOLBERG, 1961. Apparent Release of Tobacco Mosaic Virus in Living Infected Cells. Nature. 190:651-652.
- BASSI, M. e M.A. FAVALI, 1972. Eletron Microscopy of Maize Rough Dwarf Virus Assembly Sites in Maize. Cytochemical and Autoradiographic Observations. J. Gen. Virology. 16:153-160.
- BIENZ, K., 1977. Techniques and Applications of Autoradiography in the Electron Microscope. Microscopica Acta. 79:1-22.
- BLACK, L.M.; C. MORGAN e R.W. WYCKOFF, 1950. Visualizations of Tobacco Mosaic Virus Whithin Infected Cells. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 73:119-122.
- BLACKETT, N.M. e D.M. PARRY, 1973. A New Method for Analyzing Electron Microscope Autoradiographs Using Hypothetical Grain Distributions. J. Cell. Biol. 57:9-15.
- CARO, L.G., 1962. High Resolution Autoradiography. II. The Problem of Resolution. J. Cell Biol. 15:189-199.
- CARO, L.G. e M. SCHNOS, 1965. Tritium and Phosphorus-32 in High - Resolution Autoradiography. Science. 149:60-62.
- CARO, L.G. e R.P. VAN TUBERGEN, 1962. High - Resolution Autoradiography. I. Methods. J. Cell Biol. 15:173-188.
- COSTA, A.S.; E.W. KITAJIMA e A.R. OLIVEIRA. Vírus do Anel do Pimentão, Um Integrante do Grupo de Vírus do "Rattle" do Fumo. (Dados não publicados).

- DE ZOETEN, G.A., 1966. California Tobacco Rattle Virus, Its Intracellular Appearance, and the Cytology of the Infected Cells. Phytopathology. 56:744-754.
- DE ZOETEN, G.A. e T.A. SHALLA, 1966. Purification and Characterization of California Tobacco Rattle Virus. Phytopathology. 56:738-743.
- DE ZOETEN, G.A. e D.E. SCHLEGEL, 1967. Nucleolar and Cytoplasmatic Uridine - ^3H Incorporation in Virus Infected Plants. Virology. 32:416-427.
- DONIACH, C.B. e S.R. PELC, 1950. Autoradiographic Technique. Brit. J. Radiol. 23:184-192.
- FACCIOLI, G. e C. RUBIES-AUTONEL, 1975. Incorporation of Uridine- ^3H into Healthy and Tobacco Necrosis Virus - Infected Mesophyll Cells of Chenopodium amaranticolor. Phytopathology. 82:169-174.
- FAVALI, M.A.; M. BASSI e A. APRIAND, 1974. Synthesis and Migration of Maize Rough Dwarf Virus in the Host Cells: an Autoradiographic Study. J. Gen. Virol. 24:263-265.
- GUPTA, B.L.; R.B. MORETON e N.C. COOPER, 1973. Reconsideration of Resolution in E.M. Autoradiography Using a Biological Line Source. J. Microsc. 99:1-25.
- HARRISON, B.D. e I.M. ROBERTS, 1968. Association of Tobacco Rattle Virus with Mitochondria. J. Gen. Virol. 3:121-124.

KITAJIMA, E.W., 1967. Morfologia das Partículas do Vírus do Anel do Pimentão e Ultra-estrutura dos Tecidos Infectados. Piracicaba, ESALQ/USP. 54 p. (Tese de Doutorado).

KITAJIMA, E.W.; A.R. OLIVEIRA e A.S. COSTA, 1969. Morfologia das Partículas de Vírus do Anel do Pimentão. Bragantia. 28:1-22.

KOPRIWA, B.M., 1967. The Influence of Development on the Number and Appearance of Silver Grains in Electron Microscopic Radioautography. J. Histochem. Cytochem. 15:501-515.

LAFLECHE, D.; C. BOVÉ; G. DUPONT; C. MOUCHES; T. ASTIER; M. GARNIER e J.M. BOVÉ, 1972. Site of Viral RNA Replication in the Cells of Higher Plants: TYMV-RNA Synthesis on the Chloroplast. Outer Membrana System. In: RNA Viruses. Structure and Function. FEBS Amsterdam Symp. 27:43-65.

LANGENBERG, W.G. e D.E. SCHLEGEL, 1967. Autoradiography with ¹²⁵I - Labeled Antibodies as a Means of Localizing TMV in Plant Cells. Virology. 32:167-171.

LEDERER, C.M.; J.M. HOLLANDER e I. PEARLMAN, 1967. Table of Isotopes. Sixth Edition. New York, John Wiley & Sons, Inc., 3 p. e 155 p.

LOCKHART, B.E. e J.S. SEMANCIK, 1968. Inhibition of the Multiplication of a Plant Virus by Actinomycin D. Virology. 36:504-506.

LOCKHART, B.E. e J.S. SEMANCIK, 1969. Differential Effect of Actinomycin D on Plant-Virus Multiplication. Virology. 39:362-365.

- LOEBESTEIN, G.; B. SELA e T. VAN PRAAGH, 1969. Increase of Tobacco Mosaic Local Lesion Size and Virus Multiplication in Hypersensitive Hosts in the Presence of Actinomycin D. Virology. 37:42-48.
- MC WHORTER, F.P., 1965. Plant Virus Inclusions. Ann. Rev. Phytopathology. 3:278-312.
- NADLER, N.J., 1971. Interpretation of Grains Count Electron Microscope Autoradiography. J. Cell Biol. 49:877-882.
- NOGUEIRA, N.L., 1978. Determinação do Sítio Intracelular de Síntese do RNA do Vírus do Anel do Pimentão Através de Autoradiografia a Nível de Microscopia Eletrônica. Piracicaba, ESALQ/USP. 74 p. (Tese de Doutorado).
- NOGUEIRA, N.L.; D.M. SILVA e J. MERZEL, 1972. Exame ao Microscópio Eletrônico de Citoradiografias de Folhas de Fumo Afetadas pelo Vírus Vira Cabeça do Tomateiro e do Anel do Pimentão. Revista da Agricultura. XLVII:197-198.
- NOGUEIRA, N.L. e D.M. SILVA, 1976. Incorporação Intracelular da Uridina do RNA do Vírus do Anel do Pimentão. In: Rev. do V Colóquio Bras. de Micr. Eletr. CENA/ESALQ/USP. p. 72-73.
- NOGUEIRA, N.L. e D.M. SILVA, 1976a. Incorporação de Uridina Tritiada no RNA do Vírus do Anel do Pimentão (VAP). In: Rev. de Micr. Electr. Santiago, Chile. 3:94-95.
- OLIVEIRA, A.R., 1967. Serologia Aplicada ao Vírus do Anel do Pimentão. Piracicaba, ESALQ/USP. 40 p. (Tese de Doutorado).

- PARRY, D.M. e N.M. BLACKETT, 1973. Electron Microscope Autoradiography of Erythroid Cells Using Radioactive Iron. J. Cell. Biol. 57:16-26.
- PARRY, D.M. e N.M. BLACKETT, 1976. Analysis of Electron Microscope Autoradiographs Using the Hypothetical Grain Analysis Method. Journal of Microscopy. 106:117-124.
- PEASE, D.C., 1964. Histological Techniques for Electron Microscopy. Academic Press Inc. London. 250-256.
- PELC, S.R., 1963. Theory of Electron Autoradiography. J. Roy. Micro. Soc. 81:131-139.
- SALPETER, M.M.; L. BACHMANN e E.E. SALPETER, 1969. Resolution in Electron Microscope Autoradiography. J. Cell Biol. 41:1-20.
- SALPETER, M.M. e E.E. SALPETER, 1971. Resolution in Electron Microscope Autoradiography. II. Carbon - 14. J. Cell Biol. 50:324-332.
- SALPETER, M.M. e F.A. MC HENRY, 1973. Electron Microscope Autoradiography. In: J.K. Koehler, Ed. Biological Electron Microscopy. Berlin, Springer, Verlag. p. 113-151.
- SALPETER, M.M.; F.A. MAC HENRY e E.E. SALPETER, 1978. Resolution in Electron Microscope Autoradiography. IV. Application to Analysis of Autoradiographs. J. Cell Biol. 76:127-145.
- SALPETER, M.M.; H.C. FERTUCK e E.E. SALPETER, 1977. Resolution in Electron Microscope Autoradiography. III. Iodine - 125, the Effect of Heavy Metal Staining, and a Reassessment of Critical Parameters. J. Cell Biol. 72:161-173.

- SALPETER, M.M. e L. BACHMANN, 1972. Autoradiography. In: M.A. HAYAT, Ed. Principles and Techniques of Electron Microscopy. New York. Van Nostrand Reinhold Company. Vol. 2. p. 221-279.
- SANGER, H.L. e C.A. KHIGHT, 1963. Action of Actinomycin D ou RNA Synthesis in the Healthy and Virus Infected Tobacco Leaves. Biochem. Biophys. Res. Commun. 13:455-465.
- SILVA, D.M., 1965. Estudos sobre Purificação. Composição e Algumas Propriedades do Vírus do Anel do Pimentão. Piracicaba, ESALQ/USP. 106 p. (Tese de Livre-Docência).
- SINGER, S.J., 1959. Preparation of an Electron-Dense Antibody Conjugate. Nature. 133:1523-1524.
- SMITH, S.H. e D.E. SCHLEGEL. 1964. Incorporation of Uridine-³H into Nuclei of Virus - Infected Tobacco. Science. 145:1058-1059.
- SMITH, S.H. e D.E. SCHLEGEL, 1965. The Incorporation of Ribonucleic Acid Precursors in Healthy and Virus Infected Plant Cells. Virology. 26:180-189.
- VAN DER WANT e A. ROSENDAAL, 1948. Eletronenmicroscopische Onderzoek van het Virus, dat de Ractelziekten van de Tabak en Het Stendelbot van de Aardapel Veroorzaakt. Tijdschr. Plziekten. 54:134-141.
- WILLIAMS, M.A., 1969. The Assessment of Electron Microscopic Autoradiographs. In: BARER, R. e V.E. COSSLETT, Ed. Advances in Optical and Electron Microscopy. New York, Academic Press, Vol. 3, 219-269 p.

WOLANSKI, B.S. e T.C. CHAMBERS, 1971. The Multiplication of Lettuce Necrotic Yellows Virus. Virology. 44:582-591.

ZECH, H., 1961. Cytochemische Untersuchungen Zur Reproduktion des Tabak Mosaik Virus. I UV. Spektrophotometrische Messungen an Isolierter Virussubstanz. Z. Naturforsch. 16:520-538.

APENDICE

O gráfico da Fig. 5 mostra a curva de distribuição de grãos de prata ao longo de uma fonte radioativa linear.

O valor do índice quantitativo HD é calculado a partir da equação dessa curva de distribuição, a qual segue a forma geral:

$$y = a + b e^{cx} .$$

Dessa forma, o problema consiste em conhecido um conjunto de pares (x_i, y_i) obter os valores de $\underline{a}$, $\underline{b}$ e $\underline{c}$, de forma que a soma dos quadrados dos desvios entre os valores observados y_i e os valores calculados

$$y_i = a + b e^{cx_i}$$

seja mínima.

Esta soma é

$$s = \sum_{i=1}^n \left[y_i - (a + b e^{cx_i}) \right]^2$$

e para que $\underline{s}$ tenha um mínimo, deve-se ter:

$$\frac{\partial s}{\partial a} = 0 \quad , \quad \frac{\partial s}{\partial b} = 0 \quad \text{e} \quad \frac{\partial s}{\partial c} = 0 \quad ,$$

ou seja:

$$\begin{aligned} \frac{\partial s}{\partial a} &= -2 \sum_{i=1}^n \left[y_i - a - b e^{cx_i} \right] = 0 \\ \frac{\partial s}{\partial b} &= -2 \sum_{i=1}^n \left[y_i - a - b e^{cx_i} \right] e^{cx_i} = 0 \end{aligned} \quad (1)$$

$$\frac{\partial s}{\partial c} = -2 \sum_{i=1}^n \left[y_i - a - b e^{cx_i} \right] b x_i e^{cx_i} = 0$$

Estas três equações conduzem ao sistema de equações não lineares:

$$\begin{aligned} \sum_{i=1}^n y_i - na - b \sum_{i=1}^n e^{cx_i} &= 0 \\ \sum_{i=1}^n y_i e^{cx_i} - a \sum_{i=1}^n e^{cx_i} - b^2 \sum_{i=1}^n e^{2cx_i} &= 0 \quad (2) \\ b \sum_{i=1}^n x_i y_i e^{cx_i} - ab \sum_{i=1}^n x_i e^{cx_i} - b^2 \sum_{i=1}^n x_i e^{2cx_i} &= 0, \end{aligned}$$

que pode ser resolvido pelo método iterativo de Newton:

$$X_{j+1} = X_j - W^{-1}(X_j) \cdot F(X_j),$$

onde, $X_0 = \begin{bmatrix} a_0 \\ b_0 \\ c_0 \end{bmatrix}$, é o vetor contendo uma solução inicial para o sistema;

$F(X_j)$, é o vetor funcional cujas componentes são respectivamente as linhas de (2);

e $W^{-1}(X_j)$, é o Jacobiano.

$$W(a,b,c) = \begin{bmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial a}(a,b,c) & \frac{\partial f_1}{\partial b}(a,b,c) & \frac{\partial f_1}{\partial c}(a,b,c) \\ \frac{\partial f_2}{\partial a}(a,b,c) & \frac{\partial f_2}{\partial b}(a,b,c) & \frac{\partial f_2}{\partial c}(a,b,c) \\ \frac{\partial f_3}{\partial a}(a,b,c) & \frac{\partial f_3}{\partial b}(a,b,c) & \frac{\partial f_3}{\partial c}(a,b,c) \end{bmatrix}$$

O processo de solução foi programado num computador e, partindo da solução inicial

$$X_0 = \begin{bmatrix} a_0 \\ b_0 \\ c_0 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 100 \\ -400 \\ 0,12 \end{bmatrix}$$

chegou-se à solução:

$$X = \begin{bmatrix} a \\ b \\ c \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 416,06905 \\ -424,52230 \\ -0,12533 \end{bmatrix}$$

após 200 iterações.

Esta solução é correta até a quinta casa decimal.

Logo, a equação encontrada pelo método dos quadrados mínimos foi:

$$y = 416,06905 - 424,52230 \cdot e^{-0,12533X}$$

Interpolando-se para

$y = 213$ (metade dos grãos de prata contados),

temos:

$$x = HD = 5,88\text{mm}$$

ou,

$$x = HD = 2021,9 \text{ \AA}$$