**EFEITOS DO VÍRUS F EM *Bombyx mori* L., 1758 (LEP.,
BOMBYCIDAE) E DETERMINAÇÃO DO LOCAL DE SÍNTESE
DO RNA VIRAL ATRAVÉS DE AUTO-RADIOGRAFIA**

IRENE MARIA GATTI DE ALMEIDA

Orientador: DARCY MARTINS DA SILVA

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

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho, 1980

A meus pais

MARIO e NEYDES

que nunca mediram esforços
para que meus objetivos
fossem alcançados

e ao meu esposo

PEDRO JOSÉ

pela compreensão e apoio

D E D I C O

AGRADECIMENTOS

Colaboraram para a realização deste trabalho:

- Prof. Dr. Darcy Martins da Silva, cuja segura orientação e valiosos conhecimentos ministrados contribuíram para minha formação científica.
- Prof. Dr. Epaminondas S.B. Ferraz, com sua amizade e incentivo, encaminhando-nos na pesquisa científica.
- Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), na pessoa do seu diretor Dr. Admar Cervellini, onde o presente trabalho foi realizado.
- Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), com as facilidades oferecidas durante a realização do Curso de Pós-Graduação e concessão da bolsa de estudo.
- Plano de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PLANFAP) do Ministério das Minas e Energia, concedendo bolsa de estudo.
- Projeto UNDP/IAEA/BRA/78/006 para o Desenvolvimento da Produção Agrícola através da Aplicação de Técnicas Nucleares, na pessoa do Dr. Peter Vose, cujas doações muito contribuíram para a realização deste trabalho.

- *Indústrias de Seda Rivaben S.A.*, na pessoa do Engenheiro Agrônomo *Ettore Rivaben Jr.*, que gentilmente nos forneceram o material básico para o estudo realizado.
- *Prof. Dr. Zilkar Cavalcanti Maranhão*, com a leitura do manuscrito e sugestões apresentadas.
- *Drs. Kurt e Denise Bienz* com a orientação na parte de auto-radiografia.
- *Profs. Drs. Cássio G. Munhoz, Lourenço Bozzo, Guilherme Blumen e Antonio F. Correa*, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP) com a atenção e auxílio dispensados quando da utilização do fotomicroscópio.
- *Sra. Diva Athiê*, com a versão do resumo para o inglês.
- *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq)* com o auxílio financeiro na execução do trabalho.
- *José Elias Gomes*, técnico do Setor de Microscopia Eletrônica do CENA, com o valioso auxílio prestado nas revelações das fotomicrografias.
- *Acadêmico Kazumitsu Matsumoto*, com as traduções dos trabalhos em japonês.
- *Colegas do Setor de Microscopia Eletrônica do CENA*, com amizade e cooperação.

A todos, nosso profundo reconhecimento.

Í N D I C E

	<u>Página</u>
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.	5
3.1. O ciclo de vida do bicho-da-seda,	5
3.2. Morfologia e histologia do aparelho digesti vo de lagartas de bicho-da-seda	7
3.3. Considerações gerais sobre a flacidez in- fecciosa em bicho-da-seda	9
3.4. O vírus da flacidez infecciosa - vírus F.	9
3.5. Purificação do vírus F.	15
3.6. Estudos auto-radiográficos sobre o ácido nucléico viral.	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS.	21
4.1. Bicho-da-seda	21
4.2. Purificação do vírus da flacidez infecciosa	21
4.3. Inoculação das lagartas	23
4.4. Técnicas empregadas no preparo dos espê- cimes	23
4.4.1. Para estudos ao microscópio eletrô- nico	23
4.4.2. Para estudos ao microscópio óptico.. . . .	25
4.5. Preparo do material para a técnica de auto- radiografia a nível de microscopia óptica.	26
4.5.1. Inclusão e microtomia.	26
4.5.2. Cobertura com emulsão fotográfica.	27
4.5.3. Revelação, fixação e coloração das auto-radiografias.	28
4.6. Exame dos espécimes.	28
4.7. Determinação da densidade dos grãos de pra- ta	29

	<u>Página</u>
5. RESULTADOS	30
5.1. Caracterização do vírus F	30
5.1.1. Purificação das partículas e inocu lação das lagartas	30
5.1.2. O vírus F em células do intestino mē dio de bicho-da-seda	33
5.2. Estudos auto-radiográficos.	38
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÕES	57
8. SUMMARY	59
9. LITERATURA CITADA	61

LISTA DAS FIGURAS

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
1	- O ciclo de vida do bicho-da-seda (Adaptado de TAKEUCHI, 1967).	6
2	- Curva de sobrevivência de lagartas de bicho-da-seda em relação ao número de dias após inoculação com vírus F.	32
3	- Eletrofotomicrografias de suspensões de vírus F coloridas com ácido fosfotungstico (PTA) 2%, pH 7,0.	34
4	- Eletrofotomicrografia de parte de um corpo de inclusão	37
5	- Fotomicrografias de células do epitélio intestinal de lagartas de bicho-da-seda com o tratamento auto-radiográfico.	42
6	- Representação esquemática de célula com o núcleo e os valores médios das densidades de grãos de prata ($gp/\mu m^2$) para os quatro tratamentos	44

LISTA DAS TABELAS

<u>Tabela</u>		<u>Página</u>
1	- Porcentagem de sobrevivência de lagartas de bicho-da-seda inoculadas com vírus F...	31
2	- Áreas dos núcleos de células epiteliais do intestino médio de lagartas doentes e sadias e o resultado do teste F	36
3	- Número de partículas cheias e vazias do vírus F nas áreas com e sem arranjo cristalino de células do intestino médio de lagartas de bicho-da-seda	39
4	- Teste F para partículas cheias e vazias do vírus F, localizadas em áreas com e sem arranjo cristalino, em células do intestino médio de lagartas de bicho-da-seda doentes.	40
5	- Densidades dos grãos de prata em regiões nucleares e citoplasmáticas de células do epitélio intestinal de lagartas de <i>B. mori</i> sadias e infectadas com o vírus F, tratadas com AMD ou H ₂ O e U-5- ³ H.	41
6	- Testes F e de Tukey para os dados de densidades (gp/μm ²) das regiões nucleares e citoplasmáticas das células epiteliais do intestino médio das lagartas de bicho-da-seda sadias ou infectadas com vírus F. . . .	45

1. RESUMO

A presente Dissertação trata de alguns aspectos do processo patológico causado pelo vírus da flacidez infecciosa (vírus F) em células epiteliais do intestino médio de lagartas de bicho-da-seda (*Bombyx mori* L., 1758 (Lep., Bombycidae)) e estudos auto-radiográficos sobre a síntese do RNA viral.

Os cortes semifinos de células do mesêntero de lagartas apresentando sintomas de flacidez mostraram a presença de corpúsculos semelhantes aos corpos de inclusão (corpos basofílicos), indicando que a flacidez poderia ser causada pelo vírus F.

A ultra-estrutura das células evidenciou, no núcleo, grande quantidade de cromatina, que se encontrava em aglomerados. O citoplasma apresentou-se com vacúolos e organelas desnaturadas e com os corpos de inclusão, indicando tratar-se de flacidez causada por vírus. Esses corpos de inclusão eram delimitados por uma membrana externa e continham no seu interior as partículas de vírus, esféricas com cerca de 27 nm de diâmetro, bem como grande número de vacúolos e mitocôndrios desnaturados. As partículas de vírus foram também encontradas próximas à luz intestinal, muito provavelmente devido a desnaturação das células num

estágio mais avançado da doença.

O núcleo das células mostrou-se hipertrofiado, com um aumento aproximado de 1,5 vezes no seu diâmetro quando comparado com o de lagartas sadias.

As partículas do vírus F se apresentaram ora numa distribuição irregular, ora em arranjos cristalinos, observando-se muitas delas densas aos elétrons do lado de outras totalmente vazias. Entretanto não foram observadas diferenças significativas no número de partículas cheias e vazias nestas duas áreas.

Para o estudo do local de replicação do RNA do vírus, utilizou-se a associação das técnicas de auto-radiografia e de microscopia óptica. A contagem dos grãos de prata reduzida, devido a incorporação de uridina tritiada no RNA, permitiu realizar uma análise quantitativa, baseada nas suas densidades (grãos de prata/ μm^2), que serviu para identificar o local de replicação do RNA viral. A actinomicina D (AMD) se mostrou realmente um inibidor seletivo, proporcionando uma inibição da ordem de 60% da síntese do RNA normal das células sadias, sem inibir a síntese do RNA viral. Os dados obtidos indicaram que a síntese do RNA viral nas células do epitélio do intestino médio das lagartas de bicho-da-seda ocorre nos seus núcleos.

2. INTRODUÇÃO

Dentre as doenças que atacam o bicho-da-seda (*Bombyx mori* L., 1758 (Lep., Bombycidae)), aquelas que causam flacidez vem merecendo atenção especial nos últimos anos, principalmente no Japão.

Levantamentos estatísticos feitos no Japão revelaram que dentre as perdas causadas por doenças, a flacidez é responsável por 70%, seguida de poliedrose nuclear e muscardina (aproximadamente 10% cada).

No Estado de São Paulo, não se tem muitos dados a respeito, mas sabe-se que a partir de 1973, quando uma grave epizotia se verificou na região de Gália, vem ocorrendo perdas totais nas criações de bicho-da-seda devido às doenças.

Pesquisas feitas no sentido de se identificar os agentes causais dessas doenças revelaram a ocorrência de viroses, principalmente a poliedrose nuclear, poliedrose citoplasmática e o vírus da flacidez infecciosa (vírus F).

Esse último vírus vem ocorrendo com frequên-

cia nos ranchos de criação em diversas regiões, provocando abandono da atividade sericícola por alguns criadores e até deslocamento das zonas de criação para o sul de Mato Grosso ou Norte do Paraná, regiões novas nessa atividade.

Procurando pois oferecer uma contribuição ao estudo do vírus F, foi elaborada a presente pesquisa, tendo como principais objetivos:

1. Estudar o processo de transmissão do vírus F.
2. Observar o efeito do vírus na sobrevivência das lagartas em relação ao número de dias pós-inoculação.
3. Conhecer alguns aspectos do seu processo patológico em células epiteliais do intestino médio das lagartas doentes.
4. Estabelecer o provável local de replicação do RNA do vírus, através da técnica de auto-radiografia a nível de microscopia óptica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. O ciclo de vida do bicho-da-seda

O ciclo de vida do bicho-da-seda tem sido descrito por vários autores (TAKEUCHI, 1967; AMARAL e ALVES, 1979) como um ciclo típico de quatro estádios: ovo - lagarta - pupa - borboleta (Figura 1).

A lagarta eclode após 11 a 14 dias de incubação do ovo a 25°C e geralmente ela sofre quatro ecdises. A parte da vida da lagarta entre as ecdises são chamadas de ínstar. O estágio de lagarta dura aproximadamente 25 dias, assim divididos:

1º ínstar - 3 a 4 dias

2º ínstar - 2 a 3 dias

3º ínstar - 3 a 4 dias

4º ínstar - 5 a 6 dias

5º ínstar - 7 a 8 dias

As lagartas se alimentam de folhas de amoreira. No final de cada um dos quatro primeiros ínstars, a lagarta se prende a uma folha de amoreira com fio de seda, per

manecendo imóvel até a ecdise.

Figura 1 - O ciclo de vida do bicho-da-seda.
(Adaptado de TAKEUCHI, 1967).

No final do 5º instar, a lagarta está 10.000 vezes mais pesada que aquela que eclodiu do ovo e procura um lugar para tecer o casulo.

Três dias depois o casulo está pronto; então a lagarta sofre uma ecdise e se transforma em pupa dentro do próprio casulo.

Após dez a doze dias, a pupa se transforma em borboleta que dissolve os fios de seda através de um líquido que é expelido pelo seu aparato bucal, permitindo sua saída do casulo. As borboletas então copulam e as fêmeas

põem ovos.

3.2. Morfologia e histologia do aparelho digestivo de la gartas de bicho-da-seda

Fundamentalmente o aparelho digestivo dos insetos é constituído por um canal alimentar, glândulas acessórias e órgãos excretores. O canal alimentar é também chamado tubo digestivo e as glândulas acessórias e os órgãos excretores, de órgãos anexos do tubo digestivo (MARANHÃO, 1979; GALLO *et alii*, 1970; LARA, 1977).

O tubo digestivo se estende da boca ao ânus, tendo normalmente a forma tubular, como o existente nas larvas dos lepdópteros.

Em lagartas de bicho-da-seda, o aparelho digestivo divide-se em três partes: estomodeu, mesêntero e proctodeu, também chamadas respectivamente de intestino anterior ou pré-intestino, intestino médio ou medi-intestino e intestino posterior ou pós-intestino.

O estomodeu se encontra dividido em três regiões: faringe, esôfago e inglúvio. Separando o estomodeu do mesêntero se encontra a válvula cardíaca.

O mesêntero é um tubo alongado, de diâmetro quase uniforme. Apresenta na parte anterior os cecos gástricos, órgãos anexos do aparelho digestivo e na porção posterior os tubos de Malpighi, que marcam aproximadamente o início do proctodeu.

O proctodeu compreende o íleo, cólon e o reto. A passagem do mesêntero para o proctodeu apresenta uma

pequena constrição e a abertura está provida com uma válvula reguladora, a válvula pilórica.

Fundamentalmente três camadas de tecidos entram na composição histológica das paredes do tubo digestivo, sendo duas musculares e uma epitelial.

Um corte do estomodeu mostra, de fora para dentro, uma camada de fibras musculares circulares, uma camada de fibras musculares longitudinais, uma membrana basal, uma camada epitelial e a íntima, camada mais interna, de estrutura quitinosa.

O mesêntero mostra também de fora para dentro e pela ordem: uma camada de fibras musculares longitudinais, uma camada de fibras musculares circulares, membrana basal, uma camada epitelial e a membrana peritrôfica. As células epiteliais são colunares e formam a maior parte da parede epitelial. Juntamente com elas existem outras células menores agrupadas entre as bases das células maiores. As células maiores são as células digestivas, compreendendo as células colunares propriamente ditas e as caliciformes, e tomam parte ativa nos processos de secreção ou absorção; as células pequenas e basais são as células regenerativas, cuja função é a de multiplicar as células digestivas quando estas são depauperadas pela atividade secretora ou trocadas por ocasião das ecdises.

Histologicamente o proctodeu é semelhante ao estomodeu.

3.3. Considerações gerais sobre a flacidez infecciosa em bicho-da-seda

Em sentido amplo, costuma-se cognominar flacidez à doença que ocorre em lagartas de bicho-da-seda e que apresenta um complexo de sintomas externos tais como amolecimento do corpo e rápido escurecimento após a morte, antecedidas de perda de apetite, vômitos, diarréias.

Essa doença pode ser causada por bactérias que se situam nos órgãos digestivos ou no sangue; por vírus, compreendendo as poliedroses nuclear, citoplasmática e um outro vírus de partículas livres (vírus F), podendo ser também devida a distúrbios fisiológicos, tais como má nutrição e desequilíbrio na secreção hormonal (AYUZAWA *et alii*, 1972).

A flacidez mais importante é causada pelo vírus F e é especialmente denominada flacidez infecciosa.

O agente causal desta doença é um vírus esférico, de aproximadamente 27 nm de diâmetro, que se situa nas células do epitélio do intestino médio das lagartas.

A infecção ocorre principalmente via oral mas também pode ocorrer pela pele. As vítimas eliminam os vírus juntamente com as fezes, constituindo-se em fonte de inóculo para outras lagartas. O período de incubação é de 7 a 12 dias. Os sintomas externos são os mesmos citados acima (AOKI, 1967; AYUZAWA *et alii*, 1972).

3.4. O vírus da flacidez infecciosa - vírus F

Somente por volta de 1949 é que se aventurou

a hipótese de que um vírus poderia ser o agente causal da flacidez em lagartas de bicho-da-seda (*STEINHAUS, 1949*).

YAMAZAKI e colaboradores (1960) estudando a flacidez infecciosa notaram que o sedimento de ultra-centrifugação das diversas partes do corpo das lagartas doentes produziam infectividade. Concluíram então que a doença infectava não somente os órgãos do aparelho digestivo mas também todos os outros tecidos e órgãos do corpo. Essa infectividade entretanto desaparecia pela ebulição dos homogenados durante cinco minutos ou pelo tratamento dos mesmos com formaldeído.

Pelas observações ao microscópio eletrônico, os autores consideraram ser o agente causal da doença um vírus de conformação esférica, com 25 - 30 nm de diâmetro.

Essa primeira descoberta foi confirmada por *AIZAWA e KURATA em 1964*, quando isolaram esse mesmo agente causal em condições assépticas, utilizando o sobrenadante de um homogenado de lagartas doentes centrifugado a 10.000 rpm. Esse trabalho também permitiu evidenciar que o agente causal era uma partícula de vírus livre e de pequenas dimensões pois foram encontradas principalmente no sobrenadante das centrifugações.

Os primeiros estudos histológicos foram feitos por *IWASHITA (1965)*. Este autor estudou as alterações celulares que ocorriam em células do epitélio do intestino médio de lagartas infectadas pelo vírus F. *IWASHITA* notou que a infecção ocorria primeiro na parte anterior, caminhando depois para as porções média e posterior do mesêntero. As células que apresentavam sintomas de infecção eram primeiramente as caliciformes e depois as colunares.

De uma maneira geral, esse autor descreveu

as alterações dos dois tipos de células como hipertrofia do nucléolo, hipertrofia do núcleo com aumento de seu material cromático, seguida de hipertrofia do citoplasma. Nos estágios finais, o citoplasma se tornava vacuolado, os mitocôndrios diminuiam em número. Não raro as células se degeneravam e eram liberadas no lume do intestino, aderindo à membrana peritrófica, tornando-a mais espessa.

O autor também observou na região perinuclear das células colunares a formação de corpos de inclusão, também denominados corpos basofílicos, contendo RNA. Estes corpos foram observados nas células das regiões anterior e média do intestino médio.

IWASHITA e KANKE (1969), utilizando colorações histológicas, descreveram um método que permite determinar, pela microscopia óptica, a presença do vírus no intestino das lagartas com sintomas da doença. A coloração das células do epitélio do intestino médio com verde-metil pironina, pela técnica do "smear", evidenciou os corpos de inclusão (corpos basofílicos) anteriormente descritos por *IWASHITA (1965)*, constituindo-se em diagnóstico da doença.

Exames ao microscópio eletrônico de cortes ultrafinos de células do intestino médio infectadas com o vírus F evidenciaram, no citoplasma das células, os corpos basofílicos limitados por uma membrana e contendo no seu interior mitocôndrios desnaturados, pequenos vacúolos e as partículas de vírus (*IWASHITA e KANKE, 1969*).

Em 1972, *INOUE e AYUZAWA* estudaram a distribuição do vírus F nos diversos tecidos da lagarta doente, através da técnica da imunofluorescência. Concluíram que esse vírus se localizava somente no intestino médio e não nos outros órgãos, como havia sido descrito anteriormente por

YAMAZAKI e colaboradores (1960). Sua multiplicação ocorria da parte anterior para a posterior do intestino médio, diferindo da poliedrose citoplasmática, uma outra virose que também infecta o intestino médio e que se multiplica primeiramente na sua parte posterior.

Os autores notaram também que a fluorescência ocorria no citoplasma e não no núcleo das células e encontraram, nos estágios mais avançados da doença, pequenos corpos luminosos de 3 a 10 μ m de diâmetro, localizados nas células colunares, semelhantes aos corpos basofílicos descritos por *IWASHITA (1965)*.

Um estudo sobre a multiplicação do vírus nas células do epitélio do mesêntero feita por *INOUE (1972)* neste mesmo ano, revelou que o vírus se multiplicava primeiramente nas células caliciformes, as quais se degeneravam logo após a infecção. Só depois é que as partículas passavam para as células colunares de maneira direta, ou através da hemolinfa e do lume intestinal.

Em 1973, *MATSUI* estudou a infecção das células caliciformes do intestino pelo vírus da flacidez infecciosa a nível de microscopia eletrônica e observou no início da infecção as partículas virais ao lado de vesículas induzidas pela infecção e de corpos eletrodensos, sugerindo que estas estruturas contivessem material necessário para a formação do virion. Num estágio mais avançado, notou no citoplasma um grande número de partículas de vírus e de vesículas específicas do vírus, ao lado de uma matriz contendo a capa protéica viral. No núcleo foi observado um acúmulo de cromatina. No final da infecção, as organelas normais da célula desapareceram, encontrando-se o citoplasma apenas com estruturas membranosas e a célula caliciforme se tornou arredondada. Nas células colunares o autor encontrou

os corpos de inclusão com estrutura semelhante ao das células caliciformes degeneradas e sugeriu que estes corpos de inclusão se originaram de células caliciformes que foram englobadas pelas células colunares adjacentes.

AYUZAWA (1972) purificou o vírus e o descreveu como partículas esféricas de 26 ± 2 nm de diâmetro, coeficiente de sedimentação de 183 S e "effective buoyant density" de 1,375.

Em 1974 HIMENO, ONODERA e TANAMI mostraram que o uracil tritiado era incorporado nas partículas virais, sugerindo que o vírus F era um vírus tipo RNA.

Neste mesmo ano, KAWASE e outros, estudando algumas das propriedades químicas do vírus, demonstraram que o seu ácido nucléico era RNA de fita simples, pois não foi encontrado nenhum pareamento de bases. Esses autores mostraram também que a proteína do vírus F apresentava em geral semelhança com a dos demais vírus de inseto, revelando maior concentração de ácido aspártico, ácido glutâmico, leucina e fenilalanina e menor teor de metionina, histidina e cistina.

HIMENO, AOKI e KOMANO (1976), através de experimentos feitos com incorporação de ^{32}P -ortofosfato em lagartas doentes seguido de purificação das partículas do vírus por centrifugação em gradiente de densidade de sacarose e posterior análise cromatográfica do hidrolizado, confirmaram que o ácido nucléico do vírus F era RNA.

INOUE e TANADA (1977) desenvolveram um método efetivo para controlar a flacidez infecciosa baseado na terapia pelo calor (terapia térmica). Os autores notaram que lagartas de bicho-da-seda inoculadas com vírus F e mantidas a 27°C durante cinco dias, quando transferidas para

37°C por 1 - 3 dias conseguiram produzir casulos normais. Concluíram que a base para a terapia térmica parecia ser: 1) a descarga no lume do intestino das células caliciformes infectadas e sua eliminação pelas fezes e 2) o escape das novas células à infecção e multiplicação do vírus.

Num outro trabalho realizado por *INOUE* (1977) utilizando a terapia térmica em três tipos de vírus que infectam bicho-da-seda, o autor confirmou que a terapia térmica (37°C por 24 horas) foi mais efetiva durante o período de repouso que antecede a ecdise ou até 12 horas após a ecdise e que o tratamento térmico poderia ser diminuído até 6 horas se fosse realizado logo após a ecdise.

A influência da temperatura no controle do vírus da flacidez infecciosa já havia sido observada por *ARUGA e TANAKA* (1968). Estes autores mantiveram um lote de lagartas a 32°C e outro a 25°C logo após inoculação do vírus F e observaram que quando as lagartas foram mantidas a 32°C por poucos dias após inoculação, elas conseguiram resistir à infecção.

Um ano mais tarde *INOUE e MIYAGAWA* (1978), estudando a regeneração das células epiteliais do intestino médio das lagartas de bicho-da-seda, notaram que a regeneração celular parecia ser estimulada durante o período de repouso que antecede a ecdise, o maior número de células regeneradas aparecendo logo após uma ecdise. Tal fato ocorria tanto nas lagartas doentes como nas sadias (controle), porém com algumas diferenças. Nas lagartas sadias apenas algumas células regenerativas apareciam ao longo da membrana basal enquanto que nas lagartas doentes havia uma intensa regeneração das células epiteliais, com as células doentes sendo substituídas por outras sadias. Entretanto os autores verificaram que essas células novas eram rapidamente in

fectadas. Concluíram então que um tratamento terapêutico aplicado logo após a ecdise, visando impedir uma reinfecção poderia se constituir numa medida de controle da doença. Os autores indicaram a terapia térmica como bastante eficiente para o controle de tais viroses.

O vírus da flacidez infecciosa foi identificado pela primeira vez no Brasil por *GATTI et alii* (1977) em células do intestino médio de lagartas que apresentavam sintomas típicos de flacidez. O exame de amostras de campo indicaram que o mesmo apresenta alta porcentagem de ocorrência, constituindo num dos mais sérios problemas dos sericultores do Estado de São Paulo.

3.5. Purificação do vírus F

Os processos para purificação do vírus F foram descritos primeiramente por *AIZAWA e outros* (1964).

Posteriormente em 1972, *INOUE e AYUZAWA* descreveram um outro método de purificação, utilizando solução saturada de cloreto de cézio para separação das partículas em gradiente de densidade.

HIMENO, ONODERA e TANAMI (1974) propuseram uma nova técnica de purificação, reunindo as técnicas anteriores, com algumas modificações.

3.6. Estudos auto-radiográficos sobre o ácido nucléico viral

A auto-radiografia tem se constituído num ôti

mo método para se estudar os locais da síntese de ácidos nucleicos e proteínas dos vírus dentro da célula. Um precursor marcado radioativamente é incorporado no tecido e sua posição dentro da célula é determinada pela cobertura do material a ser estudado com emulsão fotográfica. Durante um tempo de exposição conveniente, a radiação produz uma imagem latente na emulsão que é tornada visível por meio de processos fotográficos comuns. As estruturas que incorporaram o precursor radioativo serão focos de emissão de radiação, produzindo grãos de prata pela redução do AgBr da emulsão utilizada na cobertura dos espécimes.

O radioisótopo mais usado para este tipo de estudo é o trítio (^3H), emissor beta negativo. Ele emite radiação beta pura de baixa energia (energia máxima 0,018 Mev e energia média 0,0056 Mev) permitindo alta resolução, pois o seu R_β máx. (camada necessária para absorção completa da radiação β do ^3H) é de 0,5 mg/cm² ou seja uma trajetória de 5 μm em água. Apresenta uma meia-vida de 12,6 anos, suficientemente longa para permitir a realização das pesquisas comumente programadas.

A escolha do composto marcado radioativamente é de grande importância. Deve-se levar em conta principalmente a posição em que se encontra a marcação na molécula, bem como sua estabilidade. Assim é que nos estudos de síntese do RNA, devido a facilidade da uridina transformar-se em timidina pela metilação do carbono 5, é comum encontrar-se a utilização de um excesso de timidina não radioativa juntamente com a uridina tritiada a fim de reduzir a incorporação dessa uridina no DNA.

Entretanto, a uridina marcada no carbono 5 quando utilizada metabolicamente na síntese do DNA, o trítio que está na posição 5 será deslocado para dar entrada a um grupamento metil e o DNA assim formado não será marcado.

Essa mesma uridina, quando usada na síntese de RNA, irá torná-lo marcado radioativamente.

Os primeiros estudos auto-radiográficos sobre a síntese dos ácidos nucleicos em células epiteliais do intestino médio de lagartas de bicho-da-seda com flacidez infecciosa foram feitos por *WATANABE (1967a)*.

Esse autor notou nas auto-radioagrafias com timidina tritiada de células sadias que somente algumas células incorporaram o material marcado no núcleo. Em lagartas doentes, entretanto, a timidina tritiada foi incorporada no núcleo de células colunares enquanto que nenhuma radiação foi detectada nas células caliciformes. Por outro lado, quando injetou uridina tritiada nas células sadias, houve incorporação no RNA citoplasmático e parcialmente no RNA nuclear, enquanto que em lagartas doentes, ambas as células, colunares e caliciformes, incorporaram grande quantidade de uridina nos seus núcleos e pouco em seus citoplasmas.

Embora já esteja determinado que o ácido nucleico viral seja RNA, nenhum estudo foi feito visando determinar o local da síntese do RNA do vírus F, utilizando um inibidor específico de síntese do RNA celular.

Diversos trabalhos para se determinar o local de replicação do RNA do vírus em animais vem sendo feitos com a utilização da actinomicina D (AMD) como inibidor seletivo da síntese do RNA normal da célula (*BIENZ et alii, 1972; McCORMICK et alii, 1967; KUDO e GRAHAM, 1965*).

Em geral é aceito que a AMD bloqueia a síntese do RNA normal da célula hospedeira combinando-se com o DNA da célula, impossibilitando a utilização deste DNA como matriz para a síntese do RNA normal mas não do RNA viral, que é independente do DNA da célula hospedeira.

Entretanto, o mecanismo do bloqueio causado pela actinomicina D ainda não está bem esclarecido. O que mais se aceita hoje em dia é o bloqueio devido à complexação do inibidor com certos setores de DNA onde ocorre a deoxiguanidina, segundo modelo proposto por JAIN e SOBELL (1972). Esta complexação se efetuará através de ligações de hidrogênio e outras ligações secundárias. O complexo formado bloquearia a ação da polimerase ou transcriptase. Esse mecanismo se assemelha até certo ponto ao proposto para o bloqueio do operador genético pelas moléculas repressoras.

BARTH e outros (1964) estudaram o mecanismo de ação da AMD em tecidos de insetos e concluíram que ela inibe a síntese do RNA normal, como no caso de mamíferos.

Este antibiótico está sendo utilizado no estudo do vírus da poliedrose citoplasmática, tanto em bicho-da-seda como em outros insetos.

HAYASHI e KAWARABATA (1970), estudando os efeitos da actinomicina D sobre síntese do RNA do hospedeiro e replicação da poliedrose citoplasmática em lagartas de *Malacosoma disstria* (pesando 200 - 300 mg), concluíram que concentrações de 1 ou 2 µg/lagarta deste antibiótico inibia a síntese do RNA em células sadias em mais de 90% após 1 hora da injeção. Esta inibição se mantinha nas 9 horas seguintes. Por outro lado, nas células doentes, a síntese do RNA viral foi bastante inibida quando os autores utilizaram 5 µg do antibiótico/lagarta enquanto que em concentrações de 1 ou 2 µg/lagarta a sua síntese ocorreu normalmente.

Essa inibição seletiva da AMD tornou possível um estudo posterior feito por HAYASHI e RETNAKARAN (1970) visando determinar o local de síntese do RNA do vírus da poliedrose citoplasmática em *M. disstria*. Esses autores, uti

lizando a técnica de auto-radiografia a nível de microscopia óptica, concluíram que a síntese do RNA viral ocorria primariamente no núcleo mas com uma pequena parte também ocorrendo no citoplasma das células.

A conclusão de que a síntese ocorria no núcleo estava de acordo com a encontrada por *WATANABE (1967b)* para lagartas de *B. mori* infectadas por poliedrose citoplasmática. Este último autor determinou o local de síntese do RNA do vírus da poliedrose citoplasmática em células do epitélio do mesêntero pela técnica de auto-radiografia a nível de microscopia óptica sem utilizar inibidores, apenas fazendo comparações entre células sadias e doentes de uma série de auto-radiogramas.

Entretanto *MORRIS (1968)* um ano depois, fazendo estudos sobre a síntese de ácidos nucleicos em células epiteliais do intestino de lagartas de *Malacosoma disstria* com poliedrose citoplasmática sem utilizar inibidores, observou que esse vírus produzia pouco ou nenhum efeito na síntese do DNA. O autor notou entretanto que durante o progresso da doença, a síntese do RNA nuclear permaneceu relativamente constante enquanto que a do RNA citoplasmático decresceu acentuadamente. Concluiu então que a replicação do RNA do vírus é quase independente das sínteses do DNA e RNA nucleares e que o citoplasma é o local da síntese do RNA viral.

O resultado alcançado por este autor está em desacordo com o observado por *HAYASHI e RETNAKARAN (1970)* para o mesmo tipo de lagarta (*M. disstria*) mas utilizando a actinomicina D como inibidor da síntese do RNA celular. Conforme já relatado anteriormente, esses autores concluíram que o local primário da síntese do RNA viral era o núcleo mas alguma síntese ocorria no citoplasma.

KAWASE e FURUSAWA (1971) estudaram o efeito da actinomicina D sobre a síntese do RNA em células epiteliais do intestino de lagartas de bicho-da-seda sadias e com o vírus da poliedrose citoplasmática. Esses autores procuraram elucidar a interação entre as sínteses dos RNAs celular e do vírus pelo uso da actinomicina D, seguido da incorporação de ^{32}P e posterior análise cromatográfica. Os resultados demonstraram que a actinomicina D, na concentração de 10 μg /lagarta, inibiu em aproximadamente 65% a síntese do RNA em lagartas sadias e em lagartas afetadas por essa poliedrose não se observou ação do antibiótico sobre a síntese do RNA viral.

Em um estudo posterior *FURUSAWA e KAWASE (1971)* relataram que injeções de actinomicina D (10 μg / lagarta) em lagartas de bicho-da-seda sadias inibiram a síntese do RNA normal em células do epitélio intestinal 2-6 horas após suas injeções, mas em lagartas doentes, houve aumento marcante na incorporação do ^{32}P 4 horas após a administração da AMD, indicando que o RNA do vírus era resistente a este antibiótico.

Com respeito à duração do tratamento com uridina tritiada, precursor radioativo utilizado nos estudos de síntese de RNA, a literatura parece unânime em admitir um período de 5 horas após a injeção como o tempo ideal para este tipo de estudo (*WATANABE, 1967a; HAYASHI e KAWARABATA, 1970; HAYASHI e RETNAKARAN, 1970*).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Bicho-da-Seda

Foram utilizadas lagartas híbridas de bicho-da-seda (*Bombyx mori* L., 1758 (Lep., Bombycidae)), provenientes dos ranchos de criação do município de Charqueada, SP., e gentilmente cedidas pela firma Indústrias de Seda Rivaben S.A.

Estas lagartas foram mantidas no laboratório, em bandejas, com alimentação de folhas frescas de amoreira.

4.2. Purificação do vírus da flacidez infecciosa

O método de purificação utilizado foi o proposto por HIMENO, ONODERA e TANAMI (1974), com algumas modificações.

Sessenta gramas (60 g) de lagartas com vírus F foram homogenizadas com 240 ml de tampão fosfato 0,05M pH 7,2. O material homogenizado, após filtração em gaze coberta com algodão, foi centrifugado a 5.000 rpm (2.000 g)

durante 10 minutos e o sobrenadante resultante foi submetido a dois ciclos de centrifugação a 8.000 rpm (5.500 g), 15 minutos cada, aproveitando-se sempre o sobrenadante. Sulfato de amônia foi acrescentado com agitação, para dar uma solução final a 40% da saturação e a solução foi deixada descansando 16 horas em banho de gelo. O precipitado foi sedimentado a 12.000 rpm (12.000 g) durante 20 minutos e ressuspenso no mesmo tampão, em metade do volume original. A suspensão foi centrifugada a 12.000 rpm (12.000 g), por 20 minutos. O vírus foi sedimentado por centrifugação a 37.000 rpm (95.000 g) durante 2 horas e o precipitado foi ressuspenso no mesmo tampão, a suspensão representando 0,01 do volume original.

60 g de lagartas doentes	
	homogenizado com 240 ml de tampão fosfato
	0,05 M pH 7,2
2.000 g, 10 min.	
	sobrenadante
5.500 g, 15 min.	
	sobrenadante
5.500 g, 15 min.	
	sobrenadante + sulfato de amônia (40% saturação)
	16 h em banho de gelo
12.000 g, 20 min.	
	sedimento + 120 ml de tampão fosfato
	0,05 M pH 7,2
12.000 g, 20 min.	
	sobrenadante
95.000 g, 120 min.	
	"pellet" + 2 ml de tampão fosfato
	0,05 M pH 7,2
Suspensão do vírus	

4.3. Inoculação das lagartas

As lagartas foram inoculadas via oral, colocando-as sobre folhas de amoreira previamente pinceladas com as preparações purificadas.

A inoculação se fez em lagartas do terceiro ínstar, no primeiro dia após a ecdise, porque logo após as ecdises há uma aceleração no metabolismo das lagartas.

Anotou-se o número de lagartas mortas tanto no lote inoculado quanto no controle, dia a dia após inoculação.

Foram utilizados dois lotes de 50 lagartas cada, um ficando como controle e o outro sofrendo inoculação.

4.4. Técnicas empregadas no preparo dos espécimes

4.4.1. Para estudos ao microscópio eletrônico

a) Coloração negativa

Para as observações ao microscópio eletrônico das suspensões de preparações purificadas, de macerados de lagartas, macerados de ovos, vômitos de lagartas e de "expurgo" de borboletas foram feitas colorações negativas com solução aquosa de ácido fosfotungstíco (PTA) 2% pH 7,0 (BRENNER e HORNE, 1959; HORNE, 1967).

Uma gota do material a ser examinado foi colocado sobre uma grade de cobre de 400 mesh (previamente coberta com película de parlódio e carvão) com o auxílio de

uma pipeta de Pasteur. Após a eliminação do excesso de líquido por meio de papel de filtro, colocou-se uma gota do corante, sendo seu excesso também retirado.

As grades assim preparadas foram levadas ao microscópio eletrônico para serem examinadas.

b) Inclusão para cortes ultrafinos

O material a ser incluído constituiu-se do intestino médio retirado de lagartas doentes e sadias (controle), previamente dissecadas.

Segmentos do mesêntero, com aproximadamente 5 mm de comprimento, foram submetidos a:

Fixação - com glutaraldeído 6,5% em tampão cacodilato 0,125M pH 7,2 durante 1 hora e meia, a 4°C. Decorrido este tempo, foram feitas duas lavagens com tampão cacodilato 0,125 M pH 7,2, 5 minutos cada.

Pós-fixação - Em seguida os espécimes foram fixados com ácido ôsmico 2% também em tampão cacodilato 0,125 M pH 7,2 durante uma hora, a 4°C.

Pré-coloração - Após fixação, o material foi pré-colorido com uma solução de acetato de uranila 2% dissolvido em acetona 75%, durante 16 horas, a 4°C.

Desidratação - A desidratação foi feita em acetona 90%, duas trocas de dez minutos cada, seguida de três trocas em acetona pura de vinte minutos cada e duas trocas em óxido de propileno, quinze minutos cada.

Infiltração - A infiltração dos espécimes com resina Epon 812 (LUFT, 1961) foi feita em três etapas que re presentam gradientes crescentes da resina em ôxido de pro pileno, como segue:

50% Epon + 50% ôxido de propileno - 2 horas - 37°C.

75% Epon + 25% ôxido de propileno - 2 horas - 37°C.

Epon puro - 16 horas - 4°C.

Inclusão - As porções do mesêntero foram en tão colocadas em moldes de borracha apropriados e os moldes foram preenchidos com a resina pura. A polimerização da resi na foi feita tendo-se colocado os moldes nas estufas de 37°C, 45°C e 60°C durante 8 horas, 16 horas e 24 horas, res pectivamente.

Os cortes ultrafinos foram obtidos num ultramicrotomo de avanço mecânico manual, modelo MT1 da Sorvall, utilizando-se navalhas de vidro-cristal, de 6 mm de espessura.

Esses cortes, com espessura entre 60 e 90 nm (cor de interferência prata a dourada), foram colhidos em grades de cobre de 200 mesh, previamente cobertas com película de parlódio e carvão.

A coloração foi feita com solução aquosa de acetato de uranila 2,5% durante 6 minutos e com citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) durante 4 minutos.

4.4.2. Para estudos ao microscópio óptico

O material incluído para microscopia eletrô-

nica foi também utilizado para estudos ao microscópio óptico.

A inclusão em resina Epon apresenta as vantagens de poder ser utilizada para estudos aos microscópios óptico e eletrônico e principalmente de possibilitar melhor preservação estrutural e permitir a obtenção de cortes histológicos com espessura de 0,5 μ m ou menos, podendo ser examinados com alta resolução.

As secções semifinas, de 0,5 μ m de espessura, cortadas no mesmo ultramicrotomo, foram transferidas para lâminas de vidro, previamente limpas com detergente e solução de álcool-éter. A posição dos cortes foi marcada no verso da lâmina, tendo sido ela então seca numa chapa quente, visando diminuir enrugamentos dos cortes (BIENZ, 1977).

A coloração das lâminas de vidro foi feita com azul de toluidina. Algumas gotas do corante foram coloçadas sobre os cortes e depois de aquecido por 1 minuto o excesso do corante foi retirado com água destilada corrente. As lâminas foram secas a 37°C.

4.5. Preparo do material para a técnica de auto-radiografia a nível de microscopia óptica

4.5.1. Inclusão e microtomia

Para estudos auto-radiográficos, as lagartas do quinto ínstar doentes e sadias foram injetadas com 20 μ l de uma solução aquosa contendo 10 μ g de actinomicina D(AMD). Paralelamente também injetaram-se lagartas sadias e doentes apenas com água bidestilada, para controle. Após uma hora, as lagartas foram injetadas com 5 μ Ci/lagarta de uri-

dina-5-tritiada ($U-5-^3H$) (atividade específica 27,8 Ci/mM; marcada no carbono 5; New England Nuclear, Boston, Mass., USA).

Cinco horas depois procedeu-se a dissecação das mesmas e as porções do intestino médio foram fixadas com glutaraldeído 6,5% em tampão cacodilato 0,125M pH 7,2 por uma hora e meia. Após este tempo foram feitas 10 lavagens com tampão cacodilato 0,125M pH 7,2 durante 24 horas para remover a uridina radioativa não incorporada. A partir desta etapa o preparo do material seguiu o processo usual de inclusão já citado anteriormente (pós-fixação, pré-coloração, desidratação, infiltração e inclusão).

Os cortes semifinos (0,5 μ m de espessura) foram postos em lâminas de vidro previamente limpas com detergente e solução de álcool-éter, para se prevenir "back-ground" da emulsão fotográfica (BIENZ, 1977).

4.5.2. Cobertura com emulsão fotográfica

A cobertura dos cortes semifinos com a emulsão fotográfica foi feita pelo Método do "Streaking" (BIENZ, 1977): 2 a 3 gotas de emulsão fotográfica Ilford L4 (Ciba-Geigy Company, England) aquecida e liquefeita, diluída em água bidestilada na proporção 1:1, foram colocadas com uma pipeta de Pasteur sobre as lâminas ao lado dos cortes e então espalhadas rapidamente sobre os mesmos, com o auxílio da mesma pipeta. As lâminas foram então colocadas verticalmente em caixas pretas vedadas com fita isolante preta e mantidas a 4°C em atmosfera seca.

Toda vidraria usada na manipulação da emul-

são fotográfica foi previamente limpa com solução fervente de água oxigenada 15% por aproximadamente 20 minutos e depois lavadas muito bem com água bidestilada, para prevenir "back-ground" da emulsão fotográfica.

4.5.3. Revelação, fixação e coloração das auto-ra- diografias

Após o tempo de exposição, as lâminas foram reveladas com o revelador Dektol da Kodak durante 4 minutos e fixadas com fixador F-5 também da Kodak durante 5 minutos, ambos a 22°C de temperatura. A seguir as lâminas foram lavadas em água corrente e postas para secar a 37°C.

Os cortes foram coloridos com azul de tolui
dina, conforme descrito em 4.4.2.

4.6. Exame dos espécimes

Os espécimes preparados pelas técnicas de co
loração negativa e cortes ultrafinos foram examinados num microscópio eletrônico de transmissão Elmiskop IA da Siemens, operando a 80.000 volts.

Para obtenção das eletrofotomicrografias uti
lizaram-se no microscópio eletrônico chapas fotográficas de vidro, tipo Projector Slide Plates da Kodak, de 6,5 x 9 cm.

As lâminas de vidro, contendo os cortes se-
mifinos, foram examinadas num microscópio óptico Fotomicros-
cópio II da Zeiss, equipado com câmara fotográfica, obten-

do-se fotografias dos espécimes utilizando-se um filme rígido do Panatomic X da Kodak, ASA 32.

4.7. Determinação da densidade dos grãos de prata

As fotomicrografias das auto-radiografias obtidas ao microscópio óptico foram utilizadas para determinação da densidade dos grãos de prata.

Utilizando-se as fotografias das células dos tecidos sadios e doentes tratados com H_2O ou solução de AMD e $U-5-^3H$, foram feitas contagens do número de grãos de prata reduzidos nas regiões citoplasmática e nuclear.

Através de um planímetro, determinou-se as respectivas áreas para cada região.

De posse desses dois tipos de dados foram calculadas as densidades de grãos de prata (grãos/unidade de área), e os resultados foram analisados quantitativamente.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização do vírus F

5.1.1. Purificação das partículas e inoculação das lagartas

As observações ao microscópio eletrônico das preparações purificadas, coloridas negativamente com PTA 2%, evidenciaram a presença do vírus F, apresentando-se como esferóides com cerca de 27 nm de diâmetro (Figura 3A).

As lagartas do terceiro ínstar quando inoculadas com estas preparações purificadas, começavam a apresentar sintomas típicos de flacidez tais como crescimento irregular, perda de apetite, vômitos e diarréia, dez dias após inoculação. Esses sintomas se tornavam mais acentuados a partir do décimo quarto dia, quando ocorria a maior mortalidade.

Os dados sobre a porcentagem de sobrevivência podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1 - Porcentagem de sobrevivência de lagartas de bicho-da-seda inoculadas com vírus F.

Dias após inoculação	% Sobrevivência
0	100,0
10º	95,8
12º	87,2
14º	82,9
15º	62,9
17º	57,2
19º	47,2
20º	30,0
21º	24,3
22º	17,2

A relação entre esses dados mostrou ser de natureza quadrática. A equação encontrada para a curva foi $y = 100,19 + 2,32x - 0,28x^2$, onde y representa porcentagem de sobrevivência e x dias após inoculação. O coeficiente de correlação foi de 97,7% e o histograma obtido pode ser visto na Figura 2.

As colorações negativas de vômitos das lagartas doentes, quando observadas ao microscópio eletrônico, evidenciaram a presença das partículas do vírus (Figura 3B).

As lagartas inoculadas raramente chegaram a encasular e quando isto aconteceu os casulos eram pequenos, com alta frequência de pupas mortas em seu interior.

As borboletas que conseguiram sobreviver copularam e puseram ovos.

Figura 2 - Curva de sobrevivência de lagartas de bicho-da-seda em relação ao número de dias após inoculação com vírus F.

Esses ovos foram tratados para eclosão. A porcentagem de eclosão das lagartas foi baixa e as lagartas nascidas morreram sem atingir o terceiro ínstar.

O material que a borboleta solta quando nasce, examinado em coloração negativa ao microscópio eletrônico, mostrou partículas de F em concentração razoável (Figura 3C). Esse material foi inoculado em lagartas sadias

e após quatorze dias as lagartas mostraram sintomas da doença.

As lagartas sadias, que serviram de controle em todos os experimentos, apresentaram uma mortalidade extremamente baixa. Essas lagartas completaram seu ciclo de vida normalmente: as lagartas produziram casulos grandes e bem formados e dos casulos surgiram as borboletas. O líquido que essas borboletas eliminaram logo ao nascer foi examinado ao microscópio eletrônico, não se encontrando as partículas de vírus.

Paralelamente a esses estudos foram feitas observações de várias amostras de ovos que seriam usados como sementes nos ranchos de criação. A microscopia eletrônica de suspensões dos macerados de ovos de algumas dessas amostras coloridas negativamente mostrou também a presença do vírus (Figura 3D).

5.1.2. O vírus F em células do intestino médio de bicho-da-seda

A dissecação das lagartas mostrou alterações no intestino. Nas lagartas doentes, o intestino se mostrava turvo, de coloração marrom clara e em tamanho menor que o de uma lagarta sadia-controle.

A porção anterior do intestino era cheia de um líquido de cor marrom e na parte posterior não raro apresentava pedaços solidificados de folha ingerida.

Nas lagartas sadias, o intestino mostrou-se transparente, com pedaços de folha na sua parte anterior e fezes normais na porção posterior.

Figura 3 - Eletrofotomicrografias de suspensões de vírus F coloridas com ácido fosfotungstico (PTA) 2%, pH 7,0.

A - Preparação purificada do vírus; B - Partículas de vírus encontradas em vômitos de lagartas; C - Material de borboleta proveniente de lagarta que foi inoculada com o vírus F; D - Macerado de ovos com partículas de vírus.

v - Partícula de vírus F.

As observações ao microscópio óptico de cortes semifinos das células do epitélio do intestino médio de lagartas doentes mostraram a presença de corpúsculos semelhantes aos corpos basofílicos (corpos de inclusão).

Esses corpúsculos eram mais freqüentes nas células colunares do intestino médio que nas caliciformes.

Notou-se também uma hipertrofia do núcleo das células infectadas quando comparadas com células sadias.

Os valores encontrados para as áreas dos núcleos doentes e sadios e o resultado do teste F são encontrados na Tabela 2. De acordo com esta tabela vemos que o núcleo das células doentes é significativamente maior que o das células sadias e considerando-se sua área como um círculo, teremos uma relação de 1,447:1 entre os seus diâmetros.

A ultra-estrutura das células do epitélio do mesêntero das lagartas doentes mostrou em seu citoplasma os corpos de inclusão delimitados por membrana externa e contendo no seu interior as partículas de vírus bem como grande número de vacúolos e mitocôndrios desnaturados (Figura 4). As partículas de vírus foram também encontradas próximas à luz intestinal, muito provavelmente devido à desnaturação das células. Os núcleos hipertrofiados apresentavam grande quantidade de cromatina, que se encontrava em aglomerados e no citoplasma das células notaram-se vacúolos e organelas desnaturadas.

Essas alterações celulares não foram encontradas em células epiteliais do intestino de lagartas sadias.

As partículas de vírus F se apresentavam ora numa distribuição irregular ora em arranjos cristali-

Tabela 2 - Áreas dos núcleos de células epiteliais do intestino médio de lagartas doentes e sadias e o resultado do teste F.

Áreas dos núcleos de la- gatas doentes (μm^2)		Áreas dos núcleos de la- gatas sadias (μm^2)	
8,155	11,080	6,382	7,091
10,105	23,161	4,787	8,509
21,806	31,025	10,637	7,801
16,665	28,809	6,205	14,183
10,637	17,729	5,673	10,460
7,446	17,729	7,801	13,828
11,169	22,161	4,964	6,382
12,188	25,530	6,205	10,992
18,837	11,701	4,787	6,739
14,404	17,729	8,864	8,332
19,944	11,080	6,648	2,837
13,296	15,512	11,080	7,623
19,944	22,161	13,296	3,723
12,188		10,105	
$\bar{X} = 16,748$		$\bar{X} = 7,998$	
$\bar{X} = \text{média}$			

Causa da variação	G.L.	SQ	QM	F
Tratamentos	1	1033,655	1033,655	43,48**
Resíduo	52	1236,243	23,774	
Total	53	2269,898		

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Figura 4 - Eletrofotomicrografia de parte de um corpo de inclusão mostrando as partículas de vírus F e muitas vesículas. As partículas se apresentam em arranjo cristalino (c) ou em áreas sem nenhum arranjo (sa).

v - vírus F; ve - vesícula; m - membrana.

nos, observando-se muitas delas densas aos elétrons ao lado de outras totalmente vazias (Figura 4).

Contagens do número de partículas cheias e vazias em áreas arranjadas ou não indicaram não haver diferenças significativas nas suas proporções em ambas as áreas. A Tabela 3 mostra os dados obtidos nas contagens e a Tabela 4, esses dados transformados para serem analisados estatisticamente bem como o teste F, que não foi significativo a 5% de probabilidade.

Essas áreas arranjadas foram encontradas com maior frequência na parte anterior do intestino médio.

5.2. Estudos auto-radiográficos

Os dados das densidades dos grãos de prata ($\text{gp}/\mu\text{m}^2$), obtidos através de contagens do número de grãos de prata reduzidos em regiões citoplasmática e nuclear das células do epitélio intestinal das lagartas de bicho-da-seda tanto sadias como com o vírus F, tratadas com água e com AMD, podem ser observados na Tabela 5.

A comparação das médias das densidades tanto das regiões nucleares como citoplasmáticas das células sadias tratadas com água ($\text{S} + \text{H}_2\text{O}$) com as respectivas médias das densidades das células tratadas com actinomicina D ($\text{S} + \text{AMD}$) revelou uma capacidade inibitória do antibiótico da ordem de 60% sobre a síntese do RNA normal.

A Figura 5 ilustra as fotomicrografias representativas das densidades de grãos de prata em células epiteliais do intestino médio de lagartas de bicho-da-seda sadias (S) e doentes (F) tratadas com água ($\text{S} + \text{H}_2\text{O}$ ou $\text{F} + \text{H}_2\text{O}$)

Tabela 3 - Número de partículas cheias e vazias do vírus F nas áreas com e sem arranjo cristalino de células do intestino médio de lagartas de bicho-da-seda.

Áreas em arranjo cristalino			Áreas não arranjadas		
Partículas cheias	Partículas vazias	Total	Partículas cheias	Partículas vazias	Total
8	14	22	32	61	93
4	25	29	33	53	86
4	26	30	29	42	71
10	13	23	31	31	62
6	20	26	12	14	26
11	18	29	6	19	25
8	18	26	13	18	31
10	18	28	7	22	29
8	19	27	2	18	20
8	26	34	11	11	22
14	16	30	12	7	19
14	22	36	6	19	25
105	235	340	194	315	509

Tabela 4 - Teste F para partículas cheias e vazias do vírus F, localizadas em áreas com e sem arranjo cristalino, em células do intestino médio de lagartas de bicho-da-seda doentes.

Partículas cheias				Partículas vazias			
Áreas em arranjo cristalino		Áreas não arranjadas		Áreas em arranjo cristalino		Áreas não arranjadas	
%	$\frac{\text{arc sen}}{\sqrt{\%/100}}$	%	$\frac{\text{arc sen}}{\sqrt{\%/100}}$	%	$\frac{\text{arc sen}}{\sqrt{\%/100}}$	%	$\frac{\text{arc sen}}{\sqrt{\%/100}}$
36,36	37,08	34,41	35,92	63,64	52,92	65,59	54,08
13,79	21,80	38,37	38,27	86,21	68,20	61,63	51,73
13,33	21,41	40,85	39,73	86,67	68,59	59,15	50,27
43,48	41,25	50,00	45,00	56,52	48,75	50,00	45,00
23,08	28,71	46,15	42,79	76,92	61,29	53,85	47,21
37,93	38,02	24,00	29,33	62,07	51,98	76,00	60,67
30,77	33,69	41,94	40,36	69,23	56,31	58,06	49,64
35,71	36,70	24,14	29,43	64,29	53,30	75,86	60,57
29,63	32,98	10,00	18,43	70,37	57,02	90,00	71,57
23,53	29,02	50,00	45,00	76,47	60,98	50,00	45,00
46,67	43,09	63,16	52,63	53,33	46,91	36,84	37,37
38,89	38,58	24,00	29,33	61,11	51,42	76,00	60,67
402,33		446,22		677,67		633,78	

Causa da variação	G.L.	SQ	QM	F
Tratamentos	1	80,263	80,263	1,18 n.s.
Resíduo	22	1494,245	67,93	
Total	23	1574,688		

n.s. = não significativo.

Tabela 5 - Densidades dos grãos de prata em regiões nucleares e citoplasmáticas de células do epitélio intestinal de lagartas de *B. mori* sadias e infectadas com o vírus F, tratadas com AMD ou H₂O e U-5-³H.

Densidades de grãos de prata (gp/μm ²)							
Células com F (F)				Células sadias (S)			
Com AMD (F + AMD)		Com H ₂ O (F + H ₂ O)		Com AMD (S + AMD)		Com H ₂ O (S + H ₂ O)	
Núcleo	Cito- plasma	Núcleo	Cito- plasma	Núcleo	Cito- plasma	Núcleo	Cito- plasma
2,2310	0,9706	1,4458	1,6431	2,1770	1,0917	1,6324	2,2958
0,4930	1,0848	1,0653	1,7545	0,6310	0,8787	2,4165	2,0241
1,5657	1,0237	0,6344	1,5682	0,3510	0,7177	1,8203	2,1092
0,5109	1,1502	2,2442	1,4467	2,1065	0,8274	2,0457	2,2144
0,4662	1,5495	1,2489	1,5668	0,4514	0,5856	2,0725	1,8063
2,4226	1,6154	0,8817	1,3838	0,8153	0,5656	1,5618	2,1186
1,9056	1,4635	1,2829	1,6922	2,0725	0,5891	1,7757	1,8160
4,4728	1,1739	1,9700	1,1345	0,9444	0,5521	1,0909	1,7404
2,5805	0,9865	1,0028	1,5864	0,4885	0,6649	1,3372	1,7065
0,7024	1,0020	0,8387	1,6006	0,0274	0,7176	0,9444	1,8279
0,5432	1,1002	0,8638	1,6676	0,4235	0,4754	1,6452	1,7376
4,4437	0,8491	2,0138	1,8091	0,0270	0,5709	1,9942	1,8332
0,8591	0,5803	0,6624	1,7099	0,0580	1,0003	1,1324	1,7836
0,6407	1,0564	0,8827	1,6861	0,2208	1,0599	1,7541	1,9339
1,3192	0,8041	0,9135	1,2008	0,3695	1,0416	0,7366	1,8012
3,2977	0,4481	0,8148	1,2548	0,0941	0,9711	1,0470	2,0905
1,8914	0,8153	1,2642	1,4086	0,0277	0,7735	0,5794	2,2067
2,3137	0,8754	0,7366	1,5584	0,0420	0,7390	2,7066	2,3264
0,8718	0,8811	1,6327	1,6551	0,4397	0,9514	1,6066	2,1307
0,4861	0,8163	1,6272	1,5914	1,7200	0,9025	1,6364	2,3062
0,5218	0,8058	2,2606	1,6590	0,0580	0,8636	2,7896	2,0921
0,6768	1,0525	0,9615	1,1545	0,1769	0,8297	1,0308	2,1760
2,5830	1,2889	1,0594	1,0965	0,3039	0,8916	3,3291	1,7902
x = 1,6434	1,0171	1,2308	1,5143	0,6098	0,7939	1,6819	1,9942

$\bar{x}$ = média.

Figura 5 - Fotomicrografias de células do epitélio intestinal de lagartas de bicho-da-seda com o tratamento auto-radiográfico.

A - Célula sadia tratada com AMD e uridina tritiada; B - Célula sadia tratada com água e uridina tritiada; C - Célula com F tratada com AMD e uridina tritiada; D - Célula com F tratada com água e uridina tritiada.

gp - grão de prata; n - núcleo; c - citoplasma.

ou actinomicina D (S + AMD ou F + AMD) e uridina tritiada (U-5-³H).

Na Figura 6 encontram-se esquemas de células, onde estão anotados as médias das densidades de grãos de prata das regiões nuclear e citoplasmática para os quatro tratamentos.

As análises estatísticas realizadas com os dados das densidades dos grãos de prata se encontram na Tabela 6. Os resultados para as regiões nucleares revelaram diferenças significativas entre as médias dos tratamentos F + AMD e F + H₂O e entre S + AMD e S + H₂O, não se encontrando diferenças significativas entre as outras comparações de médias. Os resultados para as regiões citoplasmáticas revelaram diferenças significativas entre as médias de todos os quatro tratamentos.

Figura 6 - Representação esquemática de célula com o núcleo e os valores médios das densidades de grãos de prata ($\text{gp}/\mu\text{m}^2$) para os quatro tratamentos.

F + AMD - Célula com F tratada com AMD e U-5- ^3H .

F + H₂O - Célula com F tratada com H₂O e U-5- ^3H .

S + AMD - Célula sadia tratada com AMD e U-5- ^3H .

S + H₂O - Célula sadia tratada com H₂O e U-5- ^3H .

C = citoplasma; N = núcleo.

Tabela 6 - Testes F e de Tukey para os dados de densidades ($\text{gp}/\mu\text{m}^2$) das regiões nucleares e citoplasmáticas das células epiteliais do intestino médio das lagartas de bicho-da-seda sadias ou infectadas com vírus F.

Regiões nucleares:

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	3	17,1322	5,7107333	8,28**
Resíduo	88	60,66423	0,6893662	
T o t a l	91	77,79643		

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tratamentos	Médias das densidades ($\text{gp}/\mu\text{m}^2$)
F + AMD	1,6434
F + H ₂ O	1,2308
S + AMD	0,6098
S + H ₂ O	1,6819
DMS (Tukey 1%) = 0,7860	

Regiões citoplasmáticas:

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	3	19,79001	6,59667	131,57**
Resíduo	88	4,41227	0,0501394	
T o t a l	91	24,20228		

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tratamentos	Médias das densidades ($\text{gp}/\mu\text{m}^2$)
F + AMD	1,0171
F + H ₂ O	1,5143
S + AMD	0,7939
S + H ₂ O	1,9942
DMS (Tukey 1%) = 0,2120	

6. DISCUSSÃO

Embora já bastante desenvolvida a patologia de insetos em outros países, no Brasil pouco se conhece a respeito.

Mesmo em se tratando de um inseto de importância econômica como o bicho-da-seda pouco foi feito na área de patologia até o ano de 1973, quando uma grave epizootia surgiu na região de Gália, Estado de São Paulo, dizimando os ranchos de criação e obrigando os sericicultores a uma mudança de atividade de exploração ou a procura de novas regiões.

Até então, as referências bibliográficas brasileiras se baseavam quase que exclusivamente em sintomas, critério pouco satisfatório, e mesmo a classificação das doenças com base na sintomatologia se apresentava conflitante e confusa.

Em se tratando da doença cujos sintomas apresentavam características de flacidez a complicação era maior ainda, não raro confundindo-se sintoma com o agente causal da doença, ou então havendo duas denominações para doença causada por um mesmo patógeno.

Porém, mesmo a literatura estrangeira também apresenta seus aspectos conflitantes. Assim é que AOKI (1967) classifica a doença flacidez em cinco categorias de acordo com o agente causal e sintomas, mas não inclui o vírus da poliedrose nuclear como seu agente causal enquanto que AYUZAWA *et alii* (1972) já inclui o vírus da poliedrose nuclear como seu agente causal.

No Brasil, CARUSO em 1947 já classificava a flacidez como a principal doença, devido ao seu caráter cosmopolita e ao fato de não existir controle, conhecendo-se somente medidas preventivas como higiene, alimentação, arejamento e outras. Nesta época, de acordo com o autor, o agente causal da doença não era conhecido mas já se aventurava a hipótese dela ser causada por bactérias.

A partir de 1973 iniciaram-se então estudos visando conhecer melhor as doenças que estavam afetando este inseto, ponto de partida para medidas de controle. As amostras de campo revelaram a ocorrência de viroses, as poliedroses citoplasmática e nuclear (GATTI *et alii*, 1976).

Em 1976, no I Encontro de Sericicultura do Estado do Paraná, a flacidez foi classificada em flacidez bacteriana, causada por bactérias e a flacidez virulenta, também denominada poliedrose nuclear e poliedrose citoplasmática.

Até essa época não se fazia referência a um outro vírus que também causava a flacidez: o vírus F. Isto porque este vírus só foi identificado no Brasil em 1977 por GATTI *et alii*.

Uma vez identificado o vírus causador da flacidez infecciosa e sendo esta a principal moléstia hoje em dia no Estado de São Paulo, seguiram-se estudos no sentido

de se conhecer algumas propriedades deste vírus, objetivo desta Dissertação.

Colorações negativas de macerados de ovos que seriam usados como sementes mostraram a presença do vírus F (Figura 3D). Embora não se consiga saber se esse vírus se localizava dentro ou na superfície dos ovos, é possível que esse vírus seja transmitido via ovo, fato este que vem esclarecer como às vezes pode-se iniciar uma epizotia.

Esta hipótese encontra fundamentos no trabalho de AIZAWA e KURATA (1964) onde os autores notaram que o homogenado de lagartas controle, crescendo em condições assépticas, em alguns casos mostraram infectividade. Como essas lagartas provieram de ovos cuja superfície foi esterilizada com cloreto de mercúrio e que foram postos em meio artificial estéril, pode-se concluir que as partículas de vírus estavam presentes no interior desses ovos.

Mesmo CARUSO em 1947 descreveu a hipótese da existência de "algo" na célula-ovo de mariposa atacada por flacidez e que passou para a sua descendência, o que não se verificou na descendência da mariposa sadia, razão pela qual recomendava o aproveitamento de mariposas perfeitas na produção de ovos como um dos meios para se evitar a doença.

Também o material que borboleta proveniente de lagartas doentes solta quando ela sai do casulo se apresentou com grande concentração de partículas do vírus (Figura 3C) servindo ainda mais para reforçar esta hipótese. Além disso, dos ovos provenientes de borboletas cujas lagartas haviam sido inoculadas com o vírus F, eclodiram lagartas que não conseguiram completar o ciclo, morrendo todas até o segundo ínstar, tempo este que coincide com o período de incubação do vírus.

Todos esses resultados reforçam a evidência de uma transmissão do vírus pelos ovos e o tratamento para eclosão com ácido clorídrico parece reduzir a chance de uma transmissão pela adsorção do vírus às paredes do ovo.

Suspensões contendo o vírus F foram inoculadas em lagartas de bicho-da-seda no início do terceiro ínstar, logo após a segunda ecdise.

Foi escolhido o terceiro ínstar porque nos estágios iniciais as lagartas são menos resistentes às doenças e variações climáticas, exigindo também cuidados especiais na alimentação. A inoculação não foi feita nos dois estágios finais porque essa doença apresenta um período de incubação de 14 dias, podendo ocorrer a transformação em pupa sem ter havido a manifestação dos sintomas.

Essas lagartas, bem como as outras sadias que serviram de controle, foram criadas em laboratório. O comportamento dessas lagartas foi observado, anotando-se alguns dados tais como dias em que ocorreram as ecdises, dia em que encasularam, dia em que nasceram as borboletas. No lote das lagartas que foram inoculadas anotou-se também o dia em que elas começaram a manifestar os sintomas da doença bem como o número de mortes diárias.

Estes últimos dados, quando ajustados numa curva ideal (Figura 2), seguiram uma função quadrática $y = 100,19 + 2,32 x - 0,28 x^2$ (coeficiente de correlação igual a 0,97), onde y é igual a porcentagem de sobrevivência e x representa o número de dias após inoculação das lagartas com o vírus F. Essa correlação é de relativa importância, mostrando que a taxa de sobrevivência não é constante, ocorrendo considerável decréscimo na taxa de sobrevivência no período pós-inoculação. O fato de não seguir uma correlação linear sugere a necessidade de um controle maior

no início da doença.

Os cortes semifinos de células do epitélio intestinal de lagartas com sintomas de flacidez revelaram a presença de corpúsculos semelhantes aos corpos de inclusão (corpos basofílicos).

A ultra-estrutura dos corpos basofílicos mostrou a presença das partículas de vírus F no seu interior, bem como grande número de vacúolos e mitocôndrios desnatura dos (Figura 4), estando de acordo com as observações de *IWASHITA e KANKE (1969) e MATSUI (1973)*.

Essas partículas de vírus, esferóides com cerca de 27 nm de diâmetro, se apresentaram ora em arranjos cristalinos, ora sem nenhum indício de arranjo (Figura 4), sendo que em ambos os casos, havia muitas delas densas aos elétrons ao lado de outras totalmente vazias. Procurou-se então encontrar uma explicação para a ocorrência ou participação desses dois tipos de partículas tanto em áreas cristalinas como nas regiões desorganizadas. Esperava-se um maior número de partículas cheias em áreas arranja das, talvez por analogia com a poliedrose nuclear, em que somente partículas de vírus, envolvidas por duas membranas são incluídas nos poliedros (*HARRAP, 1972*). Tal fato entre tanto não se verificou. O que ocorreu foi um maior número de partículas vazias em ambas as regiões e as análises esta tísticas indicaram não haver diferenças significativas nas proporções de partículas cheias e vazias nas duas áreas (Ta bela 4).

Algumas vezes as partículas de vírus F foram encontradas próximas à luz intestinal, indicando uma possível ruptura da célula, com liberação do seu conteúdo no lúme do intestino.

Segundo *INOUE e MIYAGAWA (1978)*, a eliminação das células doentes ocorre em maior quantidade logo após a ecdise, quando as células doentes são substituídas por células regenerativas que começam a se desenvolver durante o período de repouso que antecede ecdise. As células novas também se tornam infectadas. Os autores concluíram que uma medida terapêutica deveria ser tentada logo após a ecdise, enquanto as células regeneradas não haviam ainda sido infectadas, procurando inibir a replicação do vírus nestas novas células.

Em 1977, *INOUE e TANADA* já haviam tentado uma terapia baseada no tratamento pelo calor das lagartas com o vírus da flacidez infecciosa. Os autores conseguiram um controle satisfatório da doença quando as lagartas foram postas a 37°C por 1 a 3 dias, obtendo casulos normais.

Este método termo-terapêutico é de grande importância prática principalmente para as nossas condições em que as viroses de uma maneira geral, e em particular o vírus F, são responsáveis pela maior parte das perdas na produção de casulos.

Notou-se também uma hipertrofia do núcleo das células, sintoma já observado por *IWASHITA (1965)*. Nesta Dissertação, contudo procurou-se estimar a relação entre os diâmetros dos núcleos doentes e sadios. Para tanto, foram medidas as suas áreas e a análise estatística confirmou diferença significativa a nível de 1% de probabilidade (Tabela 2), observando-se uma relação de 1,447:1 entre seus diâmetros.

As pesquisas no sentido de se conhecer o local de replicação do ácido nucléico dos vírus utilizando precursor marcado radioativamente são relativamente recentes.

Na presente Dissertação foi investigado o local de multiplicação do RNA do vírus F através da associação de técnicas auto-radiográficas e microscopia óptica. Este conhecimento é de grande importância para estudos de natureza bioquímica relacionados com o sistema de enzimas envolvido no processo de síntese viral, proporcionando elementos para uma maneira mais racional de controle desses agentes patogênicos.

Com respeito aos resultados, o princípio adotado foi o de correlação entre o número de grãos de prata e a região celular onde ocorreu incorporação de uridina tritiada nas moléculas dos RNAs das células estudadas. A quantificação foi feita através do método direto das contagens dos grãos de prata por unidade de área de regiões nucleares e citoplasmáticas das células do epitélio do intestino médio das lagartas de bicho-da-seda sadias ou doentes, tratadas ou não com AMD e posteriormente com uridina tritiada.

Os resultados obtidos para as densidades de grãos de prata nas regiões nucleares e citoplasmáticas das células do epitélio do intestino médio de lagartas de bicho-da-seda tanto sadias como com o vírus F, tratadas ou não com AMD (Tabela 5) sugerem que os RNAs do vírus encontram no núcleo das células o seu provável local de biossíntese.

É interessante lembrar que o RNA do vírus da poliedrose citoplasmática, uma outra virose que infecta o intestino do bicho-da-seda, também se multiplica no núcleo das células, mais especificamente no nucléolo, como descreveu WATANABE (1967b).

Além disso, o vírus F com conformação esférica, embora afetando inseto, é um vírus que foge à regra proposta por SMITH e SCHLEGEL (1965): vírus de conformação esférica sintetiza seu RNA na região citoplasmática.

De acordo com *BARTH e outros (1964)*, a AMD em tecidos de insetos tem seu modo de ação como em células de mamíferos, ou seja, inibe a síntese do RNA dependente do DNA.

A actinomicina D é um antibiótico que pela sua configuração espacial e distribuição de cargas se ajusta com os segmentos do DNA que contém desoxiguanina. Os anéis de fenoxasona da AMD parecem se dispor paralelamente aos anéis planares do mencionado desoxinucleotídeo e as forças complementares que mantêm fixo a AMD no DNA são principalmente as pontes de hidrogênio. Nestas condições, a polimerase dependente do DNA não pode exercer sua atividade de produzir ácidos nucléicos pela polimerização de nucleotídeos (*TAMAOKI e MUELLER, 1962; MERITS, 1963*).

O princípio seletivo da AMD se deve ao fato de que enquanto ela age pelo bloqueio das polimerases da célula hospedeira, não afeta diretamente a replicase do ácido nucléico viral por não encontrar as mesmas condições de ajuste molecular como no DNA.

Entretanto já foi relatado na literatura que a AMD pode também funcionar como inibidor na multiplicação de certos vírus animais, por exemplo para o vírus da poliomielite em células HEp 2 (*GRADO et alii, 1965*), o vírus da gripe (*PONS, 1967*), o "*rous sarcoma virus*" (*VIGIER e GOLDE, 1964*). Os autores admitem como prováveis hipóteses para explicar esse fenômeno: 1) a alteração da permeabilidade da membrana celular de diferentes hospedeiros à AMD; 2) a indução de toxicidade à célula pela penetração de maiores quantidades de AMD, resultando numa diminuição da infectividade do vírus, e 3) diferentes processos de multiplicação utilizado pelo vírus, dependendo do hospedeiro.

Concentrações altas deste antibiótico também

podem inibir a replicação do RNA do virion, como no caso estudado por HAYASHI e KAWARABATA (1970) em que os autores notaram que em lagartas de *M. disséria*, concentrações de 5 µg/lagarta inibiam a incorporação de uridina tritiada em células infectadas com poliedrose citoplasmática, enquanto que concentrações de 1 ou 2 µg/lagarta não inibiam a replicação do virion e proporcionavam uma inibição de 90% durante 10 horas da síntese de RNAs das lagartas sadias.

Por outro lado, um efeito estimulatório da AMD na multiplicação do RNA do vírus foi observado para certas viroses animais (WHITE e CHEYNE, 1965; HELLER, 1963).

Os dados obtidos na Tabela 5 indicaram que houve uma inibição da síntese do RNA normal produzida pela actinomicina D (na concentração de 10 µg/lagarta usada nos experimentos) da ordem de 60%. Através desses dados pôde-se também concluir que a ação da actinomicina D foi seletiva no sentido de inibir a polimerase dependente do DNA e não a replicase do RNA viral.

A capacidade inibitória da AMD de 60% é semelhante à encontrada por KAWASE e FURUSAWA (1971) para outro vírus. Estes autores utilizaram a concentração de 10 µg/lagarta no estudo sobre o efeito da actinomicina D na síntese do RNA em intestino de lagartas de bicho-da-seda sadias e com poliedrose citoplasmática para poder posteriormente determinar o local de síntese do RNA viral. Verificaram que houve uma inibição de aproximadamente 65% no RNA normal da célula sem afetar a síntese do RNA viral.

Embora o RNA do vírus F seja de fita simples (KAWASE e outros, 1974), diferindo desta maneira do RNA da poliedrose citoplasmática que é de fita dupla, a concentração da solução de AMD utilizada nos experimentos não afetou a síntese do RNA viral.

Os resultados dos testes estatísticos realizados (Tabela 6) para as áreas nucleares mostraram haver diferenças significativas entre as médias das densidades de grãos de prata para os tratamentos F + AMD e S + AMD, corroborando com a hipótese de que a síntese do RNA viral ocorre no núcleo das células. Entretanto diferença significativa foi encontrada para as médias das densidades das áreas citoplasmáticas desses mesmos tratamentos, indicando que existe RNA viral no citoplasma das células.

Os testes também revelaram diferenças significativas entre as médias dos tratamentos S + AMD e S + H₂O tanto para as regiões nucleares como para as citoplasmáticas, mostrando que o tratamento com AMD foi realmente efetivo.

Entretanto, as médias das densidades de grãos de prata de ambas as regiões, citoplasmáticas e nucleares, são menores para o tratamento F + H₂O que para S + H₂O. Como para esses tratamentos não houve inibição com o antibiótico, seria de se esperar um aumento nas médias para o tratamento F + H₂O porque além do RNA normal da célula existe também o RNA do vírus. O resultado acima indica que houve uma certa inibição da síntese do RNA normal pelo vírus F. Resultados semelhantes já foram constatados na literatura para certas viroses animais (McCORMICK e PENMAN, 1967; ZIMMERMAN *et alii*, 1963; FENWICK, 1963).

Quando se comparam as médias dos tratamentos F + AMD com F + H₂O, nota-se que essas médias são significativamente diferentes para as áreas citoplasmáticas, indicando que houve ação da actinomicina D sobre a síntese do RNA celular. A não existência de uma diferença significativa para as médias das regiões nucleares desses mesmos tratamentos vem confirmar que a síntese do RNA viral realmente

ocorre no núcleo das células infectadas.

A análise da Figura 6 mostra que para o tratamento F + AMD a densidade média de grãos de prata para a região nuclear foi maior que a da região citoplasmática enquanto que nos demais tratamentos ocorreu o inverso, apresentando as regiões citoplasmáticas valores maiores que as regiões nucleares. Este fato vem provar que essa maior densidade encontrada no núcleo para o tratamento F + AMD se deve a síntese do RNA do vírus, já que a AMD inibiu a síntese do RNA celular.

Embora não haja dados conclusivos a respeito, existem algumas indicações de que a AMD possa estar estimulando a síntese do RNA viral, já que o valor médio da densidade da região nuclear para o tratamento F + AMD foi maior que o valor encontrado para F + H₂O.

A diferença significativa encontrada para as médias de densidades dos tratamentos F + AMD e S + AMD nos citoplasmas das células parece indicar que houve translocação do RNA viral do núcleo para o citoplasma, durante ~~as~~ 5 horas de tratamento com uridina tritiada, à semelhança do que foi encontrado por *NOGUEIRA (1978)* e confirmado por *LAGE (1980)* para o vírus do anel do pimentão em células de tecidos foliares de fumo.

7. CONCLUSÕES

1. A presença de partículas do vírus em macerados de ovos, em material proveniente da borboleta doente e a manifestação da doença em lagartas provenientes de ovos de borboletas doentes, contribuíram para reforçar a hipótese de uma transmissão do vírus F pelos ovos.

2. A correlação entre porcentagem de lagartas inoculadas sobreviventes e dias após inoculação seguiu uma função quadrática.

3. O volume do núcleo das células epiteliais do intestino médio das lagartas doentes se mostrou em média 3,0 vezes maior que o das células sadias.

4. O vírus F, encontrado no citoplasma das células epiteliais do intestino médio das lagartas de bicho-da-seda, apresentou a capacidade de induzir a formação de corpos de inclusão.

5. O tratamento das lagartas sadias e doentes com actinomicina D revelou que a ação do antibiótico foi seletiva no sentido de inibir a polimerase dependente do DNA e não a replicase do RNA viral.

6. A comparação entre as médias das densidades de grãos de prata das regiões nucleares e citoplasmáticas das células epiteliais do intestino médio das lagartas de bicho-da-seda sadias e com vírus F permitiu concluir que a síntese do RNA viral ocorre no núcleo das células.

7. As auto-radiografias indicaram que durante o período de 5 horas de tratamento com uridina tritiada já houve migração do RNA viral marcado para o citoplasma das células.

8. Os resultados obtidos permitiram também concluir que o vírus F inibe a síntese do RNA normal da célula.

8. SUMMARY

Some aspects of the pathological process of the infectious flacherie virus in the midgut epithelial cells of the silkworm (*Bombyx mori* L., 1758 (Lep., Bombycidae)) as well as the site of the viral RNA synthesis were investigated.

Semithick sections of midgut from diseased silkworm, when examined at light microscope showed inclusion bodies in the columnar cells.

Electron microscope observation of these inclusion bodies showed that they were surrounded by a single membrane and containing many vesicles and virus particles.

The nucleus of the cells infected with the virus exhibited higher electron dense masses than the healthy ones. The diameter of the nucleus of the infected cells was 1.5 times the healthy cells.

Besides the inclusion bodies, many vesicles, virus particles and cell structures in several stages of denaturation were also observed in the cytoplasm of the infected cells.

The virus, with a diameter of 25.8 ± 2 nm,

were observed in the cytoplasm either irregularly distributed or grouped in crystalline arrangement.

Virus particles were also seen close to the midgut lumen, probably due to the rupture of the cells in the late stage of the infection.

The site of the viral RNA synthesis was investigated using both autoradiograph and light microscope techniques. Countings of reduced silver grains due to incorporation of tritiated uridine in the RNA, when related to the respective cell structure area, were used to calculate the silver grain densities (silver grains/ μm^2) and to identify the site of the viral RNA synthesis.

Actinomycin D, at the used concentration, selectively blocked the cell RNA synthesis without affecting the virus RNA synthesis. The inhibition found was about 60%.

The data obtained indicated that the viral RNA synthesis occurs in the nucleus of the midgut epithelial cells of the silkworm larvae.

9. LITERATURA CITADA

- AIZAWA, K., Y. FURUTA, K. KURATA e F. SATO, 1964. On the etiologic agent of the infectious flacherie of the silkworm, *Bombyx mori* (Linnaeus). *Bulletin of Sericultural Experiment Station*. Tokyo, 19:223-240.
- AIZAWA, K. e K. KURATA, 1964. Infection under aseptic conditions with the virus of infectious flacherie in the silkworm, *Bombyx mori* (Linnaeus). *Journal of Insect Pathology*. New York, 6:130-132.
- AMARAL, E. e S.B. ALVES, 1979. *Insetos úteis*. Piracicaba, Livroceres. p.87-117.
- AOKI, K., 1967. Diseases of silkworm. In: THE JAPAN SILK ASSOCIATION, INC. *Introduction to Silkworm Rearing*. Tokyo. p.105-129.
- ARUGA, H. e S. TANAKA, 1968. Effect of high temperature on the resistance of silkworm, *Bombyx mori* L., to flacherie-virus disease. *Journal of Sericultural Science of Japan*. Tokyo, 37:441-444.
- AYUZAWA, C., 1972. Studies on the infectious flacherie of the silkworm, *Bombyx mori* L.. I. Purification of the virus and its some properties. *Journal of Sericultural Science of Japan*. Tokyo, 41:338-344.

- AYUZAWA, C.; I. SEKIDO; K. YAMAKAWA; U. SAKURAI; W. KURATA;
Y. YAGINUMA e Y. TOKORO, 1972. *Handbook of silkworm
rearing*. Tokyo, Fuji Publishing Co.. p.105-225.
- BARTH, R.H.; P.P. BUNYARD e T.H. HAMILTON, 1964. RNA
metabolism in pupae of the oak silkworm, *Antheraea
pernyi*: The effects of diapause, development and injury.
*Proceedings of the National Academy of Science of the
United States of America*. Washington D.C., 52:1572-1590.
- BIENZ, K.; D. EGGER, G. BIENZ-ISLER e H. LOEFFLER, 1972.
Light and electron microscopic autoradiography of
coxsackievirus A₁ infected muscles: viral RNA synthesis
and inhibition of host cell RNA synthesis. *Archiv für
die gesamte Virusforschung*. Vienna, 39:35-47.
- BIENZ, K.A., 1977. Techniques and applications of
autoradiography in the light and electron microscope.
Microscopica Acta. Stuttgart, 79:1-22.
- BRENNER, S. e R.W. HORNE, 1959. A negative staining method
for high resolution electron microscopy of viruses.
Biochimica et Biophysica Acta. Amsterdam, 34:103-111.
- CARUSO, V., 1947. *Manual Prático do Sericicultor*. São
Paulo, Edições Melhoramentos. 144p. (Biblioteca Criação
e Lavoura, 10).
- ENCONTRO DE SERICICULTURA DO ESTADO DO PARANÁ, 1º, Londrina,
1976. Londrina, IAPAR/ACARPA. 125p.
- FENWICK, M.L., 1963. The influence of poliovirus infection
on RNA synthesis in mammalian cells. *Virology*. New
York, 19:241-249.

- FURUSAWA, T. e S. KAWASE, 1971. Synthesis of ribonucleic acid resistant to actinomycin D in silkworm midguts infected with the cytoplasmic-polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology*. New York, 18:156-158.
- GALLO, D.; O. NAKANO; F.M. WIENDL; S. SILVEIRA NETO; R.P.L. CARVALHO, 1970. *Manual de Entomologia*. São Paulo, Editora Agronômica Ceres. p.123-127.
- GATTI, I.M.; D.M. SILVA; J.C. MATYIS; N.L. NOGUEIRA; A.R. OLIVEIRA, 1976. Constatação ao microscópio eletrônico de poliedroses em bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.). In: Colóquio Brasileiro de Microscopia Eletrônica, 59, Piracicaba. Piracicaba, CENA, 1976. p.88-89.
- GATTI, I.M.; D.M. SILVA e P.R. MALLOZZI, 1977. Ocorrência de partículas tipo vírus no intestino de lagartas de bicho-da-seda, *Bombyx mori* L. *Revista de Agricultura*. Piracicaba, 52:12.
- GRADO, C.; S. FISCHER e G. CONTRERAS, 1965. The inhibition by actinomycin D of poliovirus multiplication in HEp 2 cells. *Virology*. New York, 27:623-625.
- HARRAP, K.A., 1972. The structure of nuclear polyhedrosis viruses. III. Virus assembly. *Virology*. New York, 50:133-139.
- HAYASHI, Y. e T. KAWARABATA, 1970. Effect of actinomycin on synthesis of cell RNA and replication of insect cytoplasmic-polyhedrosis viruses *in vivo*. *Journal of Invertebrate Pathology*. New York, 15:461-462.

- HAYASHI, Y. e A. RETNAKARAN, 1970. The site of RNA synthesis of a cytoplasmic-polyhedrosis virus (CPV) in *Malacosoma disstria*. *Journal of Invertebrate Pathology*. New York, 16:150-151.
- HELLER, E., 1963. Enhancement of chikungunya virus replication and inhibition of interferon production by actinomycin D. *Virology*. New York, 21:652-656.
- HIMENO, M.; K. ONODERA e Y. TANAMI, 1974. Properties of flacherie virus of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Invertebrate Pathology*. New York, 23:164-171.
- HIMENO, M.; K. AOKI e T. KOMANO, 1976. Nucleic acid of flacherie viruses of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Invertebrate Pathology*. New York, 28:223-228.
- HORNE, R.W., 1967. Negative Staining Methods. In: KAY, DESMOND, ed. *Techniques for Electron Microscopy*. 2a. ed. Oxford, Blackwell. p.328-355.
- INOUE, H., 1972. Studies on the multiplication of infectious flacherie virus in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Sericultural Science of Japan*. Tokyo, 41:437-444.
- INOUE, H., 1977. Thermal therapy of virus diseases of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Sericultural Science of Japan*. Tokyo, 46:306-312.
- INOUE, H. e C. AYUZAWA, 1972. Fluorescent antibody study of an infectious flacherie of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Invertebrate Pathology*. New York, 19:227-230.

- INOUE, H. e M. MIYAGAWA, 1978. Regeneration of midgut epithelial cell in the silkworm, *Bombyx mori*, infected with viruses. *Journal of Invertebrate Pathology*. New York, 32:373-380.
- INOUE, H. e Y. TANADA, 1977. Thermal therapy of the flacherie virus disease in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Invertebrate Pathology*. New York, 29:63-68.
- IWASHITA, Y., 1965. Histo-and cyto-pathological studies on the midgut epithelium of the silkworm larvae infected with infectious flacherie. *Journal of Sericultural Science of Japan*. Tokyo, 34:263-273.
- IWASHITA, Y. e E. KANKE, 1969. Histopathological diagnosis of diseased larva infected with flacherie virus of the silkworm, *Bombyx mori* Linnaeus. *Journal of Sericultural Science of Japan*. Tokyo, 38:64-70.
- JAIN, S.C. e H.M. SOBELL, 1972. Steriochemistry of actinomycin binding to DNA. I. Refinement and further structural details of the actinomycin deoxyguanosine crystalline complex. *Journal of Molecular Biology*. New York, 68:1-20.
- KAWASE, S. e T. FURUSAWA, 1971. Effect of actinomycin D on RNA synthesis in the midguts of healthy and CPV-infected silkworms. *Journal of Invertebrate Pathology*. New York, 18:33-39.
- KAWASE, S.; C. SUTO; C. AYUZAWA e H. INOUE, 1974. Chemical properties of infectious flacherie virus of the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). *Applied Entomology and Zoology*. Tokyo, 9:100-101.

- KUDO, H. e A.F. GRAHAM, 1965. Synthesis of reovirus ribonucleic acid in L cells. *Journal of Bacteriology*. Baltimore, 90:936-945.
- LAGE, G., 1980. Autoradiografia quantitativa à nível de microscopia eletrônica em células de fumo (*Nicotiana tabacum* L. var. Turkish N.N.) infectadas com o vírus do anel do pimentão. Piracicaba, ESALQ/USP, 108p. (Tese de Mestrado).
- LARA, F.M., 1977. *Princípios de Entomologia*. Jaboticabal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP. p.43-49.
- LUFT, J.H., 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*. New York, 9:409-414.
- MARANHÃO, Z.C., 1978. *Morfologia geral dos insetos*. São Paulo, Livraria Nobel S.A.. 396p.
- MATSUI, M., 1973. Electron microscope study on the flacherie virus infection in the goblet cell of the midgut of the silkworm, *Bombyx mori* L.. *Journal of Sericultural Science of Japan*. Tokyo, 42:11-16.
- MCCORMICK, W. e S. PENMAN, 1967. Inhibition of RNA synthesis in HeLa and L cells by mengovirus. *Virology*. New York, 31:135-141.
- MERITS, I., 1963. Actinomycin inhibition of RNA synthesis in rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. New York, 10:254-259.

- MORRIS, O.N., 1968. Metabolic changes in diseased insects. II. Radioautographic studies on DNA and RNA synthesis in nuclear-polyhedrosis and cytoplasmic-polyhedrosis virus infections. *Journal of Invertebrate Pathology*. New York, 11:476-486.
- NOGUEIRA, N.L., 1978. Determinação do sítio intracelular de síntese do RNA do vírus do anel do pimentão através de auto-radiografia a nível de microscopia eletrônica. Piracicaba, ESALQ/USP. 74p. (Tese de Doutorado).
- PONS, M., 1967. Effect of actinomycin D on the replication of influenza virus and influenza virus RNA. *Virology*. New York, 33:150-154.
- REYNOLDS, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*. New York, 17:208-212.
- SMITH, S.H. e D.E. SCHLEGEL, 1965. The incorporation of ribonucleic acid precursors in healthy and virus infected plant cells. *Virology*. New York, 26:180-189.
- STEINHAUS, E.A., 1949. *Principles of Insect Pathology*. New York, Mac Graw-Hill Book Company. p.417-545.
- TAKEUCHI, Y., 1967. The rearing of silkworms. In: THE JAPAN SILK ASSOCIATION, INC. *Introduction to Silkworm Rearing*. Tokyo. p.61-99.
- TAMAOKI, T. e G.C. MUELLER, 1962. Synthesis of nuclear and cytoplasmic RNA of HeLa cells and the effect of actinomycin D. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. New York, 9:451-454.

- VIGIER, P. e A. GOLDE, 1964. Effects of actinomycin D and of mitomycin C on the development of rous sarcoma virus. *Virology*. New York, 23:511-519.
- WATANABE, H., 1967a. Autoradiographic studies on the nucleic-acid synthesis in the midgut of the silkworm, *Bombyx mori* L., under normal and virus-infected conditions. *Journal of Sericultural Science of Japan*. Tokyo, 36:371-380.
- WATANABE, H., 1967b. Site of viral RNA synthesis within the midgut cells of the silkworm, *Bombyx mori*, infected with cytoplasmic-polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology*. New York, 9:480-487.
- WHITE, D.O. e I.M. CHEYNE, 1965. Stimulation of Sendai virus multiplication by puromycin and actinomycin D. *Nature*. London, 208:813-814.
- YAMAZAKI, H.; E. SAKAI; M. SHIMODAIRA e T. YAMADA, 1960. Studies on the infectious flachery (F-type) of silkworms, *Bombyx mori* L.. *Bulletin of Nagano-Ken Sericultural Experiment Station*. Nagano, 61:1-28.
- ZIMMERMAN, E.F.; M. HEETER e J.E. DARNELL, 1963. RNA synthesis in poliovirus-infected cells. *Virology*. New York, 19:400-408.