

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CAMPUS DE CASCAVEL  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM BIOCÊNCIAS  
E SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

**JÉSSICA VENCATTO SENEM**

**Citopatologia causada pelo *Alphabaculovirus* no sistema traqueal de *Bombyx mori* (Lepidóptera: Bombycidae)**

CASCAVEL-PR  
(FEVEREIRO/2014)

**JÉSSICA VENCATTO SENEM**

**Citopatologia causada pelo *Alphabaculovirus* no sistema traqueal de *Bombyx mori* (Lepidóptera: Bombycidae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Biociências e Saúde – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

**Área de Concentração:** Biologia, processo saúde-doença e políticas de saúde.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Orientador (a): Rose Meire Costa Brancalhão.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Co-Orientador (a): Ednéia Fátima Brambilla Torquato.

CASCAVEL-PR  
(FEVEREIRO/2014)

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**Ficha catalográfica elaborada por Jeanine da Silva Barros CRB-9/1362**

S479c Senem, Jéssica Vencatto  
Citopatologia causada pelo *Alphabaculovirus* no sistema traqueal de *Bombyx mori* (Lepidóptera: Bombycidae) / Jéssica Vencatto Senem — Cascavel, PR: UNIOESTE, 2014.  
61 p. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Rose Meire Costa Brancalhão  
Co-orientadora: Profa. Dra. Ednéia Fátima Brambilla Torquato  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.  
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.  
Bibliografia.

1. *Baculoviridae*. 2. Citopatologia viral. 3. Lepidoptera. 4. Sericultura. 5. Traqueias. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.

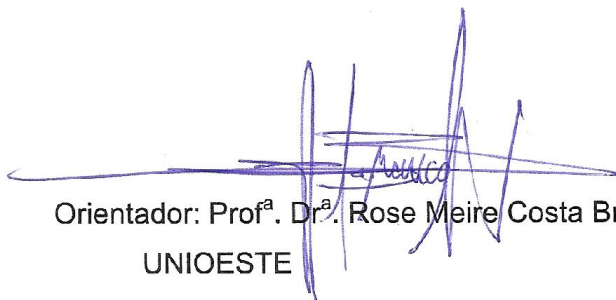
CDD 21.ed. 616

FOLHA DE APROVAÇÃO

JÉSSICA VENCATTO SENEM

**Citopatologia causada pelo *Alphabaculovirus* no sistema traqueal  
de *Bombyx mori* (Lepidóptera: Bombycidae)**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.



Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rose Meire Costa Brancalhão  
UNIOESTE



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro  
UNIOESTE



Prof<sup>a</sup>. Dr. Renato Cassol de Oliveira  
FAG

CASCADEL-PR  
(FEVEREIRO/2014)

Ao meu amado filho João Victor.

Aos meus pais, Dário e Rosmari.

À minha avó, Rita.

À minha irmã, Jaqueline.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus, por ter me dado condições físicas e mentais para que eu pudesse realizar esse trabalho e pela proteção e guia durante essa etapa da minha vida.

Serei eternamente grata a minha orientadora Profa. Dr<sup>a</sup>. Rose Meire, por me receber sem conhecer o meu trabalho. Pela confiança me aceitando como orientada, pois sei que não é desejo de um pesquisador ter como orientado alguém que não possa se dedicar exclusivamente a essa função. Agradeço pelo conhecimento transmitido, pela paciência e compreensão durante todas as etapas da pesquisa e especialmente, de ser imensamente cuidadosa em ensinar-me a escrever cientificamente, ou ter tentado fazer isso. Prosseguir os estudos, fazendo o mestrado era um sonho, que parecia muito distante, e ela foi um grande alicerce para essa conquista.

À minha co-orientadora Prof. Dr<sup>a</sup>. Ednéia, pelo tempo que dispendeu e destinou às nossas leituras juntas.

À Profa. Dr<sup>a</sup>. Lucinéia, pesquisadora do LABEF, por ser sempre solícita e esclarecedora nas suas colocações quando trocávamos ideias sobre a pesquisa.

À UNIOESTE, à Graselha, ao Programa de Pós Graduação em Biociências e Saúde, aos coordenadores, e professores que ministraram disciplinas que contribuíram ao meu aperfeiçoamento. Para um biólogo, conhecer melhor sobre o sistema capitalista é tornar o mundo científico mais crítico também, e graças às aulas da Profa. Dr<sup>a</sup>. Maria Lucia Rizzotto, hoje vejo o mundo com outros olhos.

A minha irmã Jaqueline, por ter estado ao meu lado constantemente. Por me amparar, e não me deixar desistir dessa batalha em meio aos acontecimentos. Por utilizar de suas palavras de fé em Deus, me ajudando a manter o foco na conquista desse sonho.

Aos meus pais Dário e Rosmari, e avó Rita pelo apoio e força concedidos para a realização desse trabalho. Principalmente por cuidar com tanto amor o meu pequeno príncipe João Victor, enquanto passei finais de semana lendo artigos, traduzindo e entendendo-os. Estando com eles eu ficava tranquila para essa tarefa.

Ao meu amigo e cunhado Rodrigo, pelo sincero amor que tem pelo João Victor, pelas brincadeiras, ensinamentos, cuidados e distrações, enquanto o clima em casa era de tensão por conta de tantos estudos.

À FAG, instituição de ensino em que trabalho há 10 anos e onde a minha vida docente se iniciou e continua acontecendo, agradeço pela concessão da Bolsa de Capacitação Docente, e aos colegiados de Enfermagem, Psicologia, Estética, Ciências Biológicas por permitirem minhas trocas de horários ou ausências enquanto participava de eventos científicos relacionados ao mestrado.

Às instituições UNESP e UEM, pela parceria com a realização de parte prática do experimento, e também às funcionárias Lígia e Claudete, pelo profissionalismo e cuidado na manipulação das amostras que resultaram nas imagens dessa dissertação.

À Mayarha, incrível colega de mestrado que conheci e desenvolvi grande admiração. Agradeço por toda ajuda com referências, ensinamentos com experimento, pela companhia nas viagens de apresentação de trabalhos, pela parceria sempre presente e quando mais precisei. À amizade que hoje transcende a vida de mestrandas e espero que se fortaleça com os anos.

À Celeste, técnica do laboratório de biologia celular e estrutural, sempre prestativa, por toda orientação e ajuda com o processamento histológico e a rotina do LABEF.

Aos colegas do mestrado e do LABEF: Mayarha, Sostenez, Regina, Marilúcia, Thiago, Ketlin, Juliana, Drica, Wellington, Bruno, pela ajuda, conversas, risadas e tardes de bolo de prestígio. Vou sentir saudades! Espero não ter esquecido alguém. A ajuda de todos do LABEF, sempre foi muito importante, desculpe caso não mencionei alguém aqui, a essa altura, os neurônios estão exaustos.

À Janete, funcionária da biblioteca da UNIOESTE, por disponibilizar artigos inicialmente bloqueados, sempre em tempo hábil, agilizando a atualização dos dados.

As minhas amigas Maria Luiza, Josiane e Alana, pela amizade fiel e conversas que me trouxeram a calma, a tranquilidade e a paz diante de tudo; e pelas professoras e amigas da FAG, Tatiana e Greicy, pelas noites acompanhadas de chopps para distração e relaxamento que foram necessárias em alguns momentos. Sem todas elas tudo teria sido ainda mais difícil.

## RESUMO GERAL

*Bombyx mori* é um inseto da ordem Lepidoptera encontrado somente em bancos de germoplasma, sendo utilizado em pesquisas científicas e para fins comerciais. Neste caso, seu casulo de seda, construído ao final do 5º instar larval, é usado na produção de diversos fios e tecidos. Este ramo da agroindústria brasileira, conhecido como sericicultura, se apresenta bem desenvolvido no Estado do Paraná, estando incluído no programa de agricultura familiar. Vários são os fatores que exercem influência na sericicultura nacional, como as doenças, e *B. mori* é susceptível a um vírus da família *Baculoviridae*, o *Bombyx mori multiple nucleopolyhedrovirus* (BmMNPV), gênero *Alphabaculovirus* (AlphaBV). Ao infectar as lagartas o vírus compromete a produção comercial do casulo, causando prejuízos aos produtores rurais e a indústria. Estudos comprovam que o BmMNPV é poliorganotrófico e vários são os órgãos-alvos, como o sistema traqueal; entretanto, detalhes de sua citopatologia não são conhecidos. O sistema traqueal é responsável pela aeração dos tecidos do inseto e o presente estudo objetivou descrever a citopatologia das traqueias de lagartas híbridas de *B. mori* infectadas experimentalmente pelo BmMNPV, isolado geográfico do Paraná. Para tanto, lagartas híbridas de 5º instar foram divididas em dois grupos, controle e inoculado. Neste, o inóculo viral foi fornecido na alimentação e em diferentes dias pós-inoculação (dpi), do 2º ao 9º dpi, as lagartas foram anestesiadas e dissecadas; segmentos do tegumento, músculo e glândula da seda, contendo ramos da traqueia, foram coletados e fixados em Karnovsky modificado para a microscopia eletrônica de transmissão. No 2º dpi foi efetuada análise *a fresco* da hemolinfa, para averiguar a susceptibilidade dos hemócitos. Os resultados revelaram que os hemócitos se apresentaram infectados a partir do 2º dpi e as células epiteliais da traqueia a partir do 4º dpi. A citopatologia das células traqueais revelou núcleo hipertrófico, contendo o viroplasma, que é o local de síntese dos nucleocapsídeos. Posteriormente, houve a formação e o desenvolvimento dos poliedros, acentuando-se a hipertrofia nuclear e culminando com a citólise. Víriões também foram visualizados na lâmina basal da traqueia, que se apresentou desorganizada. Assim, a citopatologia da traqueia condiz com a infecção causada por AlphaBV, e as informações obtidas permitem um melhor entendimento do ciclo infeccioso do BmMNPV no corpo do inseto. O tempo de infecção, posterior ao dos hemócitos, e a presença de víriões na lâmina basal da traqueia, indicam que este sistema é alvo secundário e, ainda, que a hemolinfa se apresenta como um importante dispersor da infecção viral.

**Palavras-chave:** *Baculoviridae*. Citopatologia viral. Lepidoptera. Sericicultura. Traqueias.



## GENERAL ABSTRACT

*Bombyx mori* is an insect of the order Lepidoptera that is only found only in germplasm banks; it is used in scientific research and for commercial purposes. In the latter case, the silk cocoon, which is produced at the end of the 5th larval instar, is used in the production of various yarns and fabrics. This branch of Brazilian agribusiness, known as sericulture, is well developed in the state of Paraná, where it is a form of small-scale family farming. Several factors impact negatively on Brazilian sericulture, such as diseases during rearing, and *B. mori* is susceptible to a virus from the *Baculoviridae* family, namely, *Bombyx mori multiple nucleopolyhedrovirus* (BmMNPV), genus *Alphabaculovirus* (AlphaBV), which infects the larvae and jeopardises commercial production of the cocoon, causing losses to farmers and industry. Studies have proved that BmMNPV is polyorganotropic and there are several target organs, such as the tracheal system; however, details of its cytopathology are not known. The tracheal system is responsible for the aeration of the tissues of the insect. Thus, the present study aimed to describe the cytopathology of the tracheas of hybrid larvae of *B. Mori*, infected experimentally with BmMNPV, and isolated geographically in the state of Paraná. Fifth instar hybrid larvae were divided into two groups; one control, and the other inoculated. After ingestion, and on different days post-inoculation (dpi), from the 2nd to the 9th dpi, the larvae were anesthetized and dissected. Segments of organs such as the integument, muscle and silk gland, containing branches of the trachea, were collected and fixed in Karnovsky modified for transmission electron microscopy. On the 2st dpi, fresh hemolymph analysis was conducted in order to determine the susceptibility of the hemocytes. The results revealed that the hemocytes were infected from the 2nd dpi and the epithelial cells of the trachea were infected from the 4th dpi. The cytopathology of the tracheal cells showed hypertrophic nucleus, containing the viroplasm, the site of the synthesis of the nucleocapsids. Subsequently, the formation and development of the polyhedra occurred, accentuating the nuclear hypertrophy and culminating in cell lysis. Virions were also observed, immersed in the basal lamina of the trachea, which appeared to be disorganized. Thus, the cytopathology of the trachea was consistent with the infection caused by AlphaBV, and the data that was obtained provides a better understanding of the infectious cycle of BmMNPV in the body of the insect. The time of infection, later for the hemocytes, and the presence of virions in the basal lamina of the trachea, indicated that this system is a secondary target for infection, and also that the hemolymph is an important dispersant of viral infection.

**Keywords:** *Baculoviridae*. Viral cytopathology. Lepidoptera. Sericulture. Tracheas.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ciclo de vida de *B. mori*. ..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 2. Árvore filogenética da família *Baculoviridae*. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 3. Ciclo de vida do Baculovírus ..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4. Poliedros de BmMNPV. .... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 5. Secção através de um espiráculo ..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 6. Distribuição corporal de traqueias e espiráculos... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 7. Sistema traqueal . .... **Erro! Indicador não definido.**

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AlphaBV:** *Alphabaculovirus*

**BmMNPV:** *Bombyx mori multiple nucleopolyhedrovirus*

**BV:** *Budded virus*

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**dpi:** Dia pós-inoculação

**kb:** kilobase

**mm:** Milímetro

**MNPV:** *multiple nucleopolyhedrovirus*

**MP:** Matriz peritrófica

**nm:** Nanômetros

**NPV:** Nucleopolyhedrovirus ou nucleopoliedrovirus

**ODV:** *Ocludded virus*

**PRONAF:** Programa Nacional de Fortalecimento da Agricultura Familiar

**SNPV:** *single nucleopoliedrovirus*

**µm:** Micrômetros

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO GERAL DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
2.1 <i>BOMBYX MORI</i> .....	16
2.2. SERICICULTURA.....	19
2.3 BACULOVÍRUS.....	21
2.4 SISTEMA TRAQUEAL E SUSCEPTIBILIDADE AO ALPHABV.....	26
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>30</b>
<b>ARTIGO 1.....</b>	<b>37</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>58</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

*Baculoviridae* é uma família de vírus entomopatogênicos, constituídos de DNA circular fita dupla, cujo gênero *Alphabaculovirus* (AlphaBV) abrange nucleopoliedrovírus (NPV) que infectam insetos da ordem Lepidoptera, como o bicho-da-seda, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), e causam a doença poliedrose nuclear, caracterizada pela presença de estruturas poliédricas, o poliedro ou corpo de oclusão, no núcleo das células infectadas (BRANCALHÃO; TORQUATO; FERNANDEZ, 2009; ROHRMANN, 2011).

Os NPV podem apresentar um nucleocapsídeo por envelope, *single nucleocapside* (SNPV), ou vários, *multiple nucleocapside* (MNPV) (ROHRMANN, 2011); sendo estes considerados mais virulentos (ADAMS; McCLINTOCK, 1991; FAN et al., 2007; HONG et al., 2000). Além disso, conforme discutem Liang et al. (2013), é frequente a variação genética em NPV de mesma espécie e de regiões geográficas diferentes, o que pode estar relacionado à adaptação às condições ambientais e é um fator importante na sobrevivência do vírus, com reflexos na virulência do isolado.

No Brasil, especificamente no estado do Paraná, foi identificado um isolado geográfico do NPV infectando lagartas híbridas de *B. mori* e que pertence ao tipo múltiplo, o *Bombyx mori multiple nucleopolyhedrovirus* (BmMNPV). Este é poliorganotrófico e vários tecidos foram identificados como alvos: tecido gorduroso, tegumento, sistema nervoso central, testículos, cárdia, regiões média e posterior da glândula da seda, traqueia, reto e piloro (BAGGIO et al., no prelo; BRANCALHÃO; SOUZA; SOARES, 2002; BRANCALHÃO; RIBEIRO, 2003; BRANCALHÃO; TORQUATO; FERNANDEZ, 2009; PEREIRA et al., 2008; RIBEIRO et al., 2009; TORQUATO; MIRANDA-NETO; BRANCALHÃO, 2006; VESSARO-SILVA et al., no prelo).

AlphaBV é caracterizado por apresentar dois fenótipos durante seu ciclo infeccioso: o *occlusion-derived bodies* (ODV), cujos vírions derivam do corpo de oclusão e são responsáveis pela infecção primária, nas células epiteliais do intestino médio; e os *budded vírions* (BV) ou vírus broto, que desencadeiam a infecção

sistêmica, ou seja, de uma célula a outra no corpo do inseto (LIANG et al., 2013; ROHRMANN, 2011). A infecção inicia quando poliedros virais são ingeridos pelo inseto, liberando os ODV no lúmen do intestino médio. Estes penetram nas células epiteliais, onde podem iniciar seu ciclo infeccioso, produzindo BV, que brotam da região basal da célula e alcançam a hemolinfa, considerada um importante dispersor da infecção no corpo do inseto (ADAMS; McCLINTOCK, 1991; BARRETT et al., 1998; CHAPMAN, 1998; GRANADOS; LAWLER, 1981; GRANADOS; WILLIAMS, 1986; HAAS-STAPLETON; WASHBURN; VOLKMAN et al., 2005; STOLTZ; PAVAN; CUNHA, 1972).

Entretanto, vários autores atribuem às traqueias a função de órgão dispersor da infecção, pelo fato da mesma proporcionar uma espécie de ducto de passagem dos vírus através da lâmina basal (ADAMS, McCLINTOCK, 1991; BRANCALHÃO; TORQUATO; FERNANDEZ, 2009; ENGELHARD et al., 1994; KIRCKPATRICK et al., 1994; PEREIRA et al., 2008; RAHMAN; GOPINATHAN, 2003; RAHMAN; GOPINATHAN, 2004; TORQUATO; MIRANDA-NETO; BRANCALHÃO, 2006). Esta é uma estrutura acelular que, conforme Passarelli (2011) circunda tecidos de insetos e atua como um filtro molecular, excluindo algumas partículas, como as virais. Ainda, outros autores consideram que tanto a traqueia, quanto a hemolinfa, podem ser dispersores de infecção viral (BRANCALHÃO; TORQUATO; FERNANDEZ, 2009).

Traqueias são órgãos do sistema traqueal responsáveis pela aeração dos tecidos do inseto (CHAPMAN, 1998). E, como colocado anteriormente este sistema é alvo do BmMNPV. Uma vez que *B. mori* é infectado, a poliedrose nuclear induz a morte desse hospedeiro. Esse inseto faz parte da sericicultura, que é o ramo da agricultura brasileira que visa a criação de bichos-da-seda para comercialização de fios e tecidos (PANUCCI-FILHO; CHIAU; PACHECO, 2011). Essa atividade se desenvolve em pequenas propriedades rurais, onde predomina o trabalho familiar, sendo uma forma de subsistência de famílias rurais, conferindo renda quase que mensal aos seus produtores, minimizando o êxodo rural. Além disso, o setor sericícola apresenta baixo impacto ambiental, uma vez que não se deve utilizar agrotóxico na propriedade rural e, com isso, a sericicultura se insere no chamado desenvolvimento sustentável (BRANCALHÃO, 2002; DOURADO et al., 2011; SEAB, 2013).

Assim, considerando a relevância de *B. mori* na sericicultura, a importância do sistema traqueal na aeração dos tecidos, seu possível papel na dispersão viral, a

ausência de detalhes citopatológicos da infecção pelo BmMNPV neste órgão e a virulência deste isolado geográfico, este estudo descreveu a citopatologia causada pelo BmMNPV na traqueia de lagartas híbridas de *B. mori*.

A presente dissertação originou o artigo científico intitulado: “Citopatologia da Traqueia de *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) ao *Bombyx mori multiple nucleopolyhedrovirus* (BmMNPV)” (Artigo 1), que será submetido à Revista Anais da Academia Brasileira de Ciências, cujas normas são apresentadas no anexo 1.

## 2. REVISÃO GERAL DE LITERATURA

O estudo aborda temas das áreas de entomologia, sericicultura e virologia e sua estrutura textual foi organizada em tópicos, visando otimizar a exposição dos seus conteúdos.

### 2.1 *Bombyx mori*

Conta a história que o bicho-da-seda, *Bombyx mori* Linneau, 1758 (Lepidoptera: Bombycidae), foi descoberto na China há 5.000 anos, por uma imperatriz chinesa Hish-Ling-Shi, que ao tomar chá sob uma amoreira, se deparou com um casulo de seda que caiu em sua xícara. Em virtude do aquecimento da bebida, o casulo se desenovelou, revelando sua composição em forma de fios de seda e despertando a curiosidade da imperatriz. Diante desse fato, o inseto passou a ser domesticado e houve a confecção do primeiro tecido de seda (um xale), com o qual a imperatriz presenteou o marido, o imperador Hwan-Té (PAPAVERO; PUJOL LUZ, 2011).

Os fios de seda passaram a ser explorados comercialmente e visando melhorar a qualidade e quantidade da seda produzida, foram feitos cruzamentos genéticos entre as raças de origem geográfica diferente, como a chinesa e a japonesa, o que resultou nos híbridos de *B. mori* (NAGARAJU, 2000). Devido a manipulação efetuada pelo homem para obtenção de híbrido com características de interesse na sericicultura, o inseto não existe mais na natureza estando disponível apenas em bancos de germoplasma, para fins de criação pelo produtor e pesquisa experimental (PEREIRA et al., 2013).

*B. mori* apresenta o corpo dividido em cabeça, tórax e abdome, de formato cilíndrico e segmentado em anéis. A cabeça tem forma globular e contém seis olhos simples ou ocelos, em cada lado, um par de antenas e o aparelho bucal, para mastigar e expelir a seda. O tórax apresenta três pares de pernas, que servem para segurar o alimento, no abdome se encontram quatro pares de pernas abdominais e um par de pernas caudais, com funções locomotoras e de fixação do alimento. A anatomia interna do inseto é constituída de um tubo digestivo, túbulos de Malpighi,



tecidos gorduroso, nervoso, reprodutor, muscular, o tegumento, as glândulas da seda e um sistema traqueal (CORRADELO, 1987).

*B. mori* é um inseto holometábolo e seu ciclo de vida ocorre em 30 a 48 dias, sendo iniciado com a deposição de aproximadamente 500 ovos, realizada por uma mariposa. Dos ovos emergem as lagartas que passam por quatro ecdises ou mudas do exoesqueleto e cinco idades ou instares larvais, que duram de 20 a 24 dias. Essa fase do desenvolvimento é a única em que o inseto se alimenta, com folhas frescas de amoreira (*Morus sp.*). No final do 5º instar, a lagarta inicia a construção de um casulo de seda em torno do seu próprio corpo, transformando-se em pupa ou crisálida, estágio que dura de 10 a 12 dias. A seguir, a pupa se transforma em uma mariposa, que emerge do casulo e vive em média 3 a 6 dias. Nesse período ocorre a cópula e a postura dos ovos, reiniciando o ciclo de vida (Figura1) (FONSECA; FONSECA, 1986; HANADA; WATANABE, 1986; PANUCCI-FILHO; CHIAU; PACHECO, 2011).

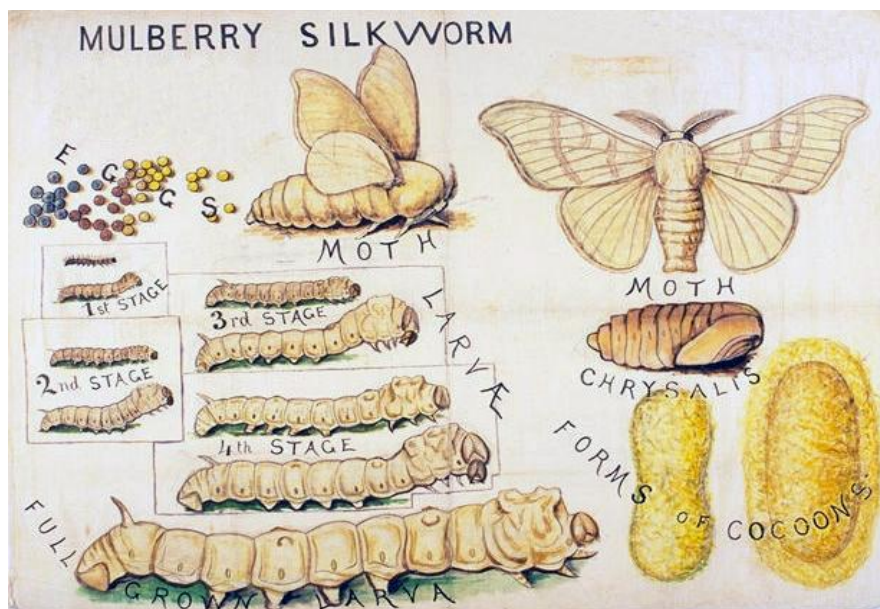


Figura 1. Ciclo de vida de *B. mori*. Disponível em: < <http://aegfloresta.blogspot.com.br/2012/04/v%20amos-criar-bichos-da-seda.html>>. Acesso em: 18 dez. 2013.

O casulo produzido pelo bicho-da-seda é constituído de um único fio de seda, mede de 800 a 1.500 metros de comprimento e 0,002 mm de espessura (HANADA; WATANABE, 1986). É sintetizado pelas glândulas da seda do inseto e é composto de: sericina, constituída pelos aminoácidos ácido aspártico e serina; e de fibroína, formada por glicina, alanina, serina e tirosina e há ainda uma glicoproteína P25. (ALCÂNTARA; DALTIM, 1995, MONDAL et al., 2007).

As proteínas da seda pertencem a famílias distintas e são expressas por genes que compõe um genoma de 560 milhões de pares de bases, equivalente a um sexto do genoma humano (NAGARAJU, 2000).

Fibroína e sericina apresentam várias aplicações em ciência e tecnologia, envolvendo áreas da biologia celular, fisiologia, bioquímica, biologia molecular, genética e também aplicadas na área médica (KUNDU et al., 2013; QIN et al., 2012).

Experimento envolvendo obesidade demonstrou que peptídeos da seda inibem o acúmulo de lipídios e a diferenciação morfológica dos adipócitos, bloqueiam a expressão de genes específicos do adipócito, inibindo a adipogênese e sugerem sua utilização para tratamento da obesidade e doenças metabólicas relacionadas (JUNG et al., 2011; SEO et al., 2011).

As proteínas da seda se mostraram adequadas na confecção de suturas cirúrgicas, de suplementos alimentares e engenharia de tecidos. Conforme destacam Jung et al. (2013), tais proteínas provocaram a diferenciação dos osteoblastos da medula óssea de ratos, demonstrando seu uso potencial como alimentos funcionais que promovem a cicatrização óssea e intervenções terapêuticas para fraturas ósseas e osteoporose.

Park et al. (2010) compararam *in vivo* e *in vitro*, tratamento com fibroína e um ácido polilático (PLA) sobre a regeneração óssea e afirmaram que a fibroína mostrou, significativamente, maior proliferação e atividade da fosfatase alcalina dos osteoblastos do que PLA, afirmando ser benéfica em terapias de cicatrização óssea.

Uma membrana de fibroína foi confeccionada visando fornecer uma estrutura porosa e com propriedades mecânicas adequadas que propiciam o crescimento celular e a manipulação de células para estudos de cultura de células, e esse modelo também mostrou ser uma aplicação viável da proteína da seda (TAMADA, 2005).

Ghaznavi et al. (2011) analisaram o efeito da fibroína da seda para reparação de nervos periféricos, através de respostas inflamatórias celulares e recuperação funcional, em um modelo de defeito do nervo isquiático de ratos. E após oito semanas de tratamento, a fibroína apresentou capacidade de imunogenicidade e remielinização favorável para o reparo do nervo.

Ensaio de fibroína foi realizado visando obter membranas que pudessem substituir revestimentos como dispositivos cardiovasculares e atuar como curativos em feridas. Os resultados apresentaram sucesso, comprovado por testes de

crystalinidade, de resistência térmica e da ausência de citotoxicidade das membranas, bem como a integridade da estrutura secundária da fibroína quando submetida a um tratamento com etanol (MORAES et al., 2013).

Experimento de engenharia de tecidos desenvolveu um agente espessante com microesferas de fibroína, para serem aplicadas ao tratamento de incontinência urinária de esforço, caracterizada pelo aumento do lúmen da uretra. Em curto prazo esse tratamento apresentou melhora na estrutura do esfíncter uretral, exibido por uma melhor regeneração do tecido (SHI et al., 2013).

Modelo experimental humano utilizou células-tronco endometriais, na intenção de causar crescimento de células uroteliais, em um substrato de nanofibras de proteínas da seda e de colágeno, afirmando que a seda aumentou a diferenciação das células confirmando ser uma fonte adequada, para uso potencial na reconstrução da parede da bexiga urinária de mulheres (SHOAE-HASSANI et al., 2013).

Apesar de inúmeras aplicações em áreas diferenciadas da biologia e da medicina, *B. mori* é ainda mais utilizado economicamente como um produtor de fios de seda para a sericicultura (GOLDSMITH; SHIMADA; ABE, 2005).

## 2.2. SERICICULTURA

A sericicultura é uma atividade da agroindústria nacional, destinada a criação comercial do bicho-da-seda para a produção de casulos, que serão processados em fios e tecidos de seda. No Brasil a atividade se desenvolve em pequenas propriedades rurais e os insetos, no estágio de lagarta, são criados em barracões ou sirgarias. Na propriedade rural também há o cultivo da amoreira (*Morus sp.*), cujas folhas são utilizadas na alimentação das lagartas (CORRADELO, 1987).

O início da sericicultura no País ocorreu no século XIX, no reinado de D. Pedro I, no município de Itaguaí-RJ, onde foi criada a primeira indústria de seda nacional, a “Imperial Companhia Seropédica Fluminense”. Em 1912, Minas Gerais instalou a 1ª Estação Experimental de Sericicultura, no município de Barbacena, que se transformou mais tarde na Indústria de Seda Nacional. E em 1940, imigrantes japoneses fundaram, no município de Bastos-SP, a Sociedade Colonizadora do Brasil – “Brajiru Takushoku Kumiai”, atual Fiação de Seda BRATAC S.A., a única indústria de fiação de seda que atua no Brasil (ZANETTI, 2007).

No Paraná a sericicultura iniciou em 1928, no município de Cambará (ZANETTI, 2007). E há 10 anos o estado é o maior produtor nacional, na safra 2011/12 gerou divisas na ordem de R\$ 27,60 milhões, concentrando 98% da produção. No ano de 2013, 191 municípios paranaenses e 2.240 famílias desenvolveram a atividade em suas propriedades, com reflexos positivos na economia do estado (SEAB, 2013).

A sericicultura apresenta a vantagem de, quando comparada a outras culturas, permitir uma renda quase que mensal, o que pode chegar a 65% de renda total das famílias rurais (KURIN, 2002). A atividade faz parte ainda do Programa Nacional de Fortalecimento da Agricultura Familiar (PRONAF), desenvolvido pelo Estado que financia o manejo da cultura, tendo como critérios, o tamanho da propriedade, a utilização de mão de obra predominantemente familiar e a renda auferida (TSUKAMOTO, 2011).

Esse ramo de atividade da agroindústria abrange a criação do bicho-da-seda, que ao término de uma das etapas do seu ciclo de vida larval, produz o casulo de seda, que é então comercializado e processado na indústria. Assim, além dos empregos diretos no meio rural, este tipo de cultura gera uma série de empregos indiretos na cidade e no campo (SEAB, 2010).

Na antiguidade, a atividade ganhou espaço no comércio e ultrapassou as fronteiras da China, percorrendo todo o continente, na famosa Rota da Seda. Hoje, diversos países se ocupam da sericicultura, mas a produção é liderada ainda pela China, em seguida, Índia, Uzbequistão e Tailândia (GUO PING; JIE XI, 2011; RAJU et al., 2012).

O Brasil ocupa a quinta posição no *ranking*, representando 0,86% da produção mundial de casulos verdes e fios de seda (BUSCH, 2011). No país, as pessoas que vivem no campo, envolvidas com pequenas produções, como é o caso da sericicultura, devem ser amparadas técnica e economicamente por órgãos governamentais responsáveis pela atividade de agricultura familiar, permitindo e assegurando o contato com a “terra” e a aproximação do ser humano em atividades interdisciplinares de inclusão na sociedade (GUANZIROLI et al., 2001; PANUCCI-FILHO; CHIAU; PACHECO, 2011).

Notada a importância da sericicultura para o estado do Paraná e ao Brasil, o país possui um banco de germoplasma público, situado na Universidade Estadual de Maringá (UEM), em Maringá-PR. Esse banco contém raças distintas, que com seu

cruzamento originam híbridos, tais raças foram caracterizadas de acordo com critérios específicos, dentre eles, a qualidade e quantidade de seda produzida (PEREIRA et al., 2013).

Porém, assim como outras culturas, a sericicultura também apresenta problemas que fragilizam essa cadeia produtiva, e dentre eles estão os que envolvem as doenças que afetam o ciclo de vida do bicho-da-seda, como as causadas por protozoários, fungos, bactérias e vírus. No caso específico das doenças virais, esta é causada pelo vírus da família *Baculoviridae*, gênero *Alphabaculovirus*. A doença afeta o desenvolvimento das lagartas de *B. mori*, bem como a produção de casulos de seda, trazendo prejuízos aos produtores rurais e à indústria sericícola (POTRICH et al., 2007).

### 2.3 BACULOVÍRUS

A família *Baculoviridae* representa um grande grupo de vírus entomopatogênicos, descoberto na China, há 5.000 anos, com o surgimento de doenças que acometem *B. mori*. Os Baculovírus são vírus com DNA de fita dupla, circular, na forma de bastonetes, com tamanho de 80 a 180 kb, que codificam 90 a 180 genes (ROHRMANN, 2011). A família é dividida em quatro gêneros: *Alphabaculovirus* (AlphaBV) e *Betabaculovirus*, que infectam Lepidoptera; *Gammabaculovirus*, que infecta Himenoptera; e *Deltabaculovirus* de Diptera (BERRETTA et al., 2013) (Figura 2).

AlphaBV é um nucleopoliedrovírus (NPV) que ocasiona a doença conhecida como poliedrose nuclear, caracterizada pela presença de estruturas poliédricas no núcleo das células susceptíveis (ROHRMANN, 2011). As partículas virais do BmMNPV apresentam tamanho de 95 nm de diâmetro e 315 nm de comprimento (BRANCALHÃO; TORQUATO; CASTRO, 2002). E a forma dos poliedros pode variar de triangular, tetraédrico, hexaédrico ou octaédrico. São altamente resistentes às condições ambientais diversas, evidências sugerem que eles podem resistir ao ambiente do trato gastrointestinal de pássaros, os quais podem facilitar a sua dispersão. Com essas características, os poliedros saem do corpo do inseto, e permanecem dispostos no ambiente, podendo infectar lagartas sadias, disseminando a infecção viral (ROHRMANN, 2011). Baseado em estudos filogenéticos NPV pode ser organizado em grupo I ou II (KATSUMA et al., 2011). Os

representantes do grupo I, como o BmNPV, utilizam a proteína GP64 para fazer fusão com a membrana plasmática das células do epitélio do intestino médio, já os do grupo II, utilizam a proteína F nesta fusão (ROHRMANN, 2011).

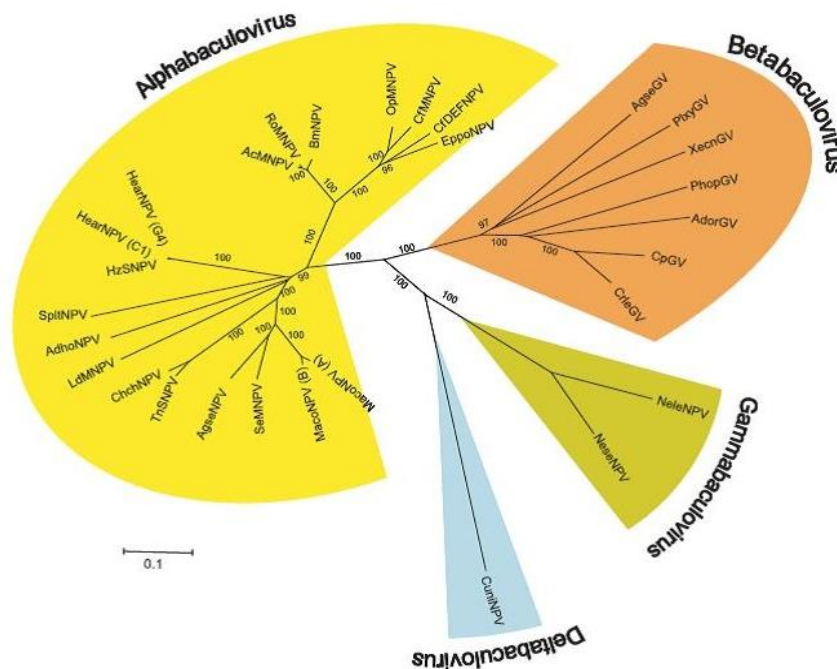


Figura 2. Árvore filogenética da família *Baculoviridae*. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16648963>>. Acesso em: 24 out. 2012.

O ciclo infeccioso do AlphaBV inicia quando as lagartas fazem a ingestão dos poliedros virais, porventura presentes nas folhas de amoreiras e quando alcançam o intestino médio do inseto, são dissolvidas por ação de serina protease, da proteína vermelho fluorescente e do pH alcalino (pH 10 – 11), que digerem a poliedrina, liberando os vírions no lúmen do intestino médio. Os vírions derivados do corpo de oclusão, os ODV, são constituídos de DNA viral e das proteínas do capsídeo e atravessam a matriz peritrófica (MP). A MP é uma rede de quitina existente ao longo do intestino médio, e visa a sua proteção e defesa contra agentes patogênicos como bactérias, fungos e vírus. Ao atravessar a MP, os ODVs iniciam a infecção primária, em que os nucleocapsídeos se fundem com as membranas das microvilosidades das células colunares do intestino médio, através de receptores presentes no envelope lipoprotéico das células (BERRETTA et al., 2013).

Para infectar as células, a membrana do BV apresenta uma proteína gp64 que é reconhecida por receptores celulares revestidos por clatrina. Após endocitose e transferência para o endossoma ocorre a fusão do envelope do nucleocapsídeo

com a membrana endossomal, liberando os nucleocapsídeos no citoplasma. Estes entram no núcleo, através dos poros nucleares, se inserem no genoma da célula hospedeira e promovem a transcrição de genes e replicação do DNA viral em meio ao estroma virogênico, causando um aumento no volume do núcleo ou hipertrofia nuclear. O retículo endoplasmático e o complexo de Golgi sintetizam as proteínas que compõem o nucleocapsídeo e que se inserem na membrana plasmática, e no brotamento formam o envelope do BV, que sai da célula (ROHRMANN, 2011).

Outra via pode ser utilizada disseminação viral, onde vírions migram para a região da membrana lateral da célula, alcançando as traqueias, importante órgão de dispersão viral (LIMA et al., 2013). O ciclo de infecção se completa produzindo os poliedros, que são liberados após lise celular (BERRETTA et al., 2013) (Figura 3).

Os poliedros ou corpos de oclusão poliédricos apresentam um envelope composto por carboidratos, proteínas fosforiladas e uma proteína do envelope do poliedro (PEP), associada à proteína p10, que parece ser necessária à sua montagem correta; e no seu interior, uma matriz protéica de poliedrina contendo os vírus (ROHRMANN, 2011).

Autores discutem que a proteína p10 se associa aos microtúbulos e pode estar envolvida na formação de estruturas fibrilares, elétron-densas no núcleo de 80% das células, causando sua desintegração, através da fragmentação do citoplasma e ruptura da membrana plasmática (CARPENTIER et al., 2008).

Outra característica desses microrganismos é que, alguns vírus apresentam um único nucleocapsídeo organizado por envelope, já outros apresentam vários nucleocapsídeos organizados em um mesmo envelope, assim são caracterizados respectivamente, em "*single nucleocapside*" - SNPV e "*multiple nucleocapside*" – MNPV. Estes por sua vez, podem apresentar até 19 nucleocapsídeos por envelope, tornando-os mais virulentos que os SNPV (ROHRMANN, 2011).

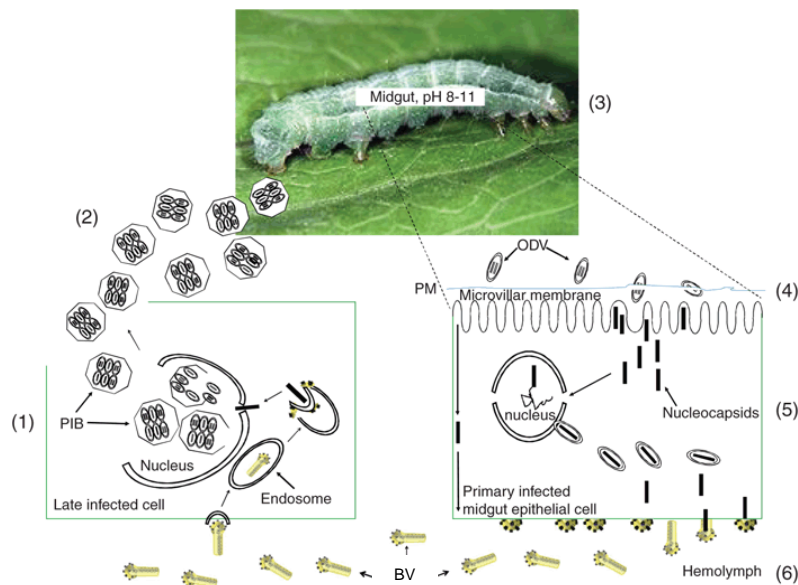


Figura 3. Ciclo de vida do Baculovírus (Modificado de Airene et al., 2013). Disponível em: <[http://www.nature.com/mt/journal/v21/n4/fig\\_tab/mt2012286f1.html](http://www.nature.com/mt/journal/v21/n4/fig_tab/mt2012286f1.html)>. Acesso em: 18 dez. 2013.

No Brasil, no estado do Paraná, foi identificado um isolado geográfico de nucleopolyhedrovirus que infecta *B. mori*, o BmMNPV, como mostra a figura 4 (BRANCALHÃO; TORQUATO; CASTRO, 2002).

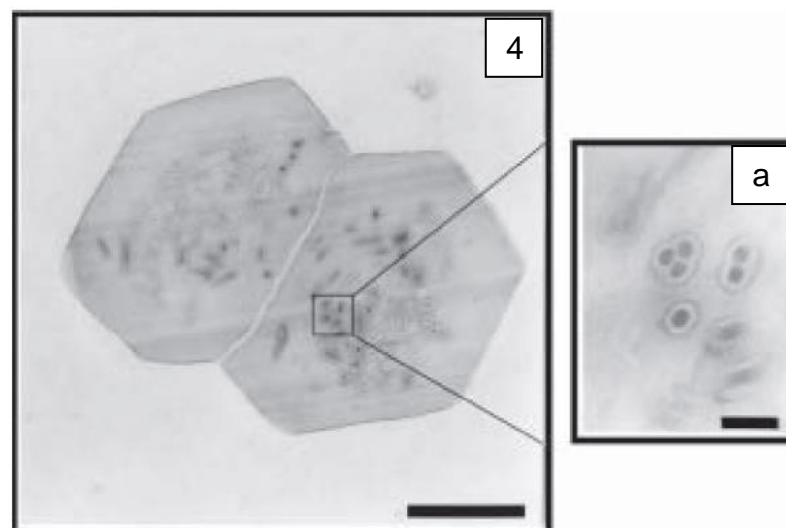


Figura 4. Poliedros maduros de BmMNPV com vários vírions. Escala 1 mm. (a) Seções transversais de vírions com um, dois e três nucleocapsídeos envelopados. Escala 0,1 mm (Brancahã, 2002).

A partir dessa descoberta, vários tecidos se mostraram alvos de infecção do BmMNPV, dentre eles: o tegumento (BRANCALHÃO; RIBEIRO, 2003); as células gordurosas (BRANCALHÃO; SOUZA; SOARES, 2002); a glândula da seda (BRANCALHÃO; TORQUATO; FERNANDEZ, 2009); o testículo (PEREIRA et al., 2008); as células da cárdia (RIBEIRO et al., 2009); o tecido nervoso (TORQUATO;



MIRANDA-NETO; BRANCALHÃO, 2006a), o piloro (BAGGIO et al., no prelo) e as células do reto (VESSARO-SILVA et al., no prelo).

No tegumento de *B. mori*, o BmMNPV comprometeu a síntese e secreção dos constituintes químicos dessa estrutura. Os sinais da infecção no órgão foram evidenciados a partir do 5° dpi, através da fragilidade do tegumento e culminando com sua ruptura. Isto acarreta no extravasamento da hemolinfa no ambiente, que contém poliedros virais, o que ocasiona a dispersão da infecção viral (BRANCALHÃO; RIBEIRO, 2003).

As células gordurosas do inseto, que constituem um tecido relacionado ao metabolismo de lipídios, revelaram sinais da infecção a partir do 4° dpi. Neste período foi verificada a lise das células, com a liberação de fosfolipídios, ácidos graxos e colesterol na hemolinfa, o que lhe confere um aspecto leitoso (BRANCALHÃO; SOUZA; SOARES, 2002).

As regiões média e posterior da glândula da seda de *B. mori*, se mostraram suscetíveis ao BmMNPV também no 4° dpi, sendo que a região anterior não mostrou sinais de infecção. Dessa forma, a região anterior da glândula não é susceptível (BRANCALHÃO; TORQUATO; FERNANDEZ, 2009).

O epitélio de revestimento externo dos testículos da lagarta evidenciou infecção no 6° dpi, e o interno e o septo intertesticular apresentaram-se infectados a partir do 7° dpi, comprometendo a espermatogênese (PEREIRA et al., 2008).

As células da cárdia, uma pequena região de transição do trato digestório dos insetos, entre os intestinos anterior e médio, tiveram sua susceptibilidade comprovada por Ribeiro et al. (2009) a partir do 6° dpi. A infecção se confirmou através da citopatologia e o tecido se mostrou com acentuadas modificações como a desorganização da lâmina basal e poliedros liberados no lúmen intestinal.

Ainda, Torquato, Miranda-Neto e Brancalhão (2006a), estudaram o sistema nervoso central de *B. mori* e registraram a infecção a partir do 5° dpi, a citopatologia não evidenciou a lise celular; entretanto, mostrou poliedros em espaços nos gânglios e conectivos nervosos, provenientes da infecção da traqueia que penetra no tecido, além disso, discutem o papel deste órgão na dispersão da infecção neste sistema.

Recentemente, o piloro, região entre os intestinos médio e posterior, responsável por controlar a passagem do alimento, revelou infecção na área posterior do anel intersticial posterior (AIP) a partir do 5° dpi, afetando a dinâmica do

intestino na passagem do alimento ao íleo para a formação dos pellets fecais (BAGGIO et al., no prelo).

E estudando o reto de *B. mori*, Vessaro-Silva et al. (no prelo) verificaram um comportamento distinto frente a infecção experimental pelo BmMNPV. Poliedros virais foram observados no 5º dpi apenas na região posterior do reto, ou canal anal; entretanto o equilíbrio do órgão se apresentou afetado devido também a infecção de outros alvos conhecidos, desta forma, foi verificada alterações no processo de digestão do inseto.

Assim, este vírus é poliorganotrófico, e vários autores colocam que a infecção sistêmica é estabelecida através da hemolinfa (ADAMS; McCLINTOCK, 1991; BARRET et al., 1998; CHAPMAN, 1998; GRANADOS; LAWLER, 1981; GRANADOS; WILLIAMS, 1986; HAAS-STAPLETON; WASHBURN; VOLKMAN, 2005; STOLTZ; PAVAN; CUNHA, 1972;). Entretanto, alguns autores atribuem esta função às traqueias (BRANCALHÃO; TORQUATO; FERNANDEZ, 2009; ENGELHARD et al., 1994; KIRCKPATRICK et al., 1994; PEREIRA et al., 2008; RAHMAN; GOPINATHAN, 2003; RAHMAN; GOPINATHAN, 2004; TORQUATO; MIRANDA-NETO; BRANCALHÃO, 2006a).

#### 2.4 SISTEMA TRAQUEAL E SUSCEPTIBILIDADE AO AlphaBV

O sistema traqueal apresenta um conjunto de pequenas aberturas no corpo das lagartas, denominadas espiráculos, dispostos em cada segmento do corpo, exceto o segundo, terceiro e décimo segundo. No total, são nove pares de aberturas externas que através de movimentos corporais, permitem a entrada e saída de gases respiratórios (CHAPMAN, 1998; CORRADELLO, 1987; HANADA; WATANABE, 1986).

Snodgrass e Eickwort (1993) relatam a presença de três pares de espiráculos torácicos e dez pares de espiráculos nos segmentos abdominais, enquanto Chapman (1998) coloca a presença de dez pares, sendo que dois são torácicos e oito abdominais. Já *B. mori* apresenta no estágio larval nove espiráculos, um localizado no tórax e oito distribuídos pelo abdome (HANADA; WATANABE, 1986). Músculos específicos atuam no fechamento e abertura do espiráculo e a regulação do seu funcionamento é feita pelo sistema nervoso central, que responde localmente a estímulos químicos, como as concentrações de oxigênio e de gás carbônico, ou

seja, de acordo com a demanda dos tecidos corporais. A figura 5 apresenta a morfologia de um espiráculo (CHAPMAN, 1998).

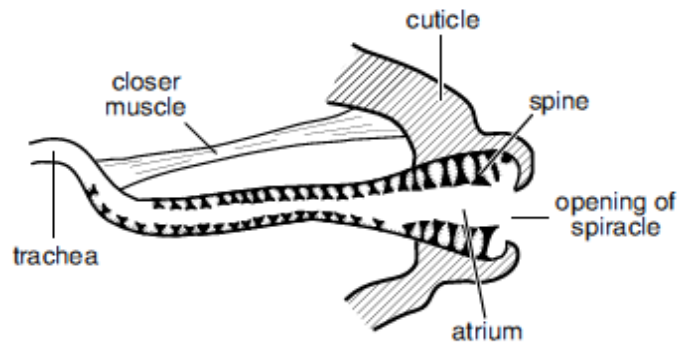


Figura 5. Secção através de um espiráculo (Chapman, 1998).

Os espiráculos se abrem internamente para as traqueias, que se originam de invaginações do ectoderma e se dispõem longitudinalmente no corpo do inseto, com ramificações contralaterais e transversais que se anastomosam e são responsáveis pela aeração dos tecidos do inseto (EATON, 1939), (Figura 6).

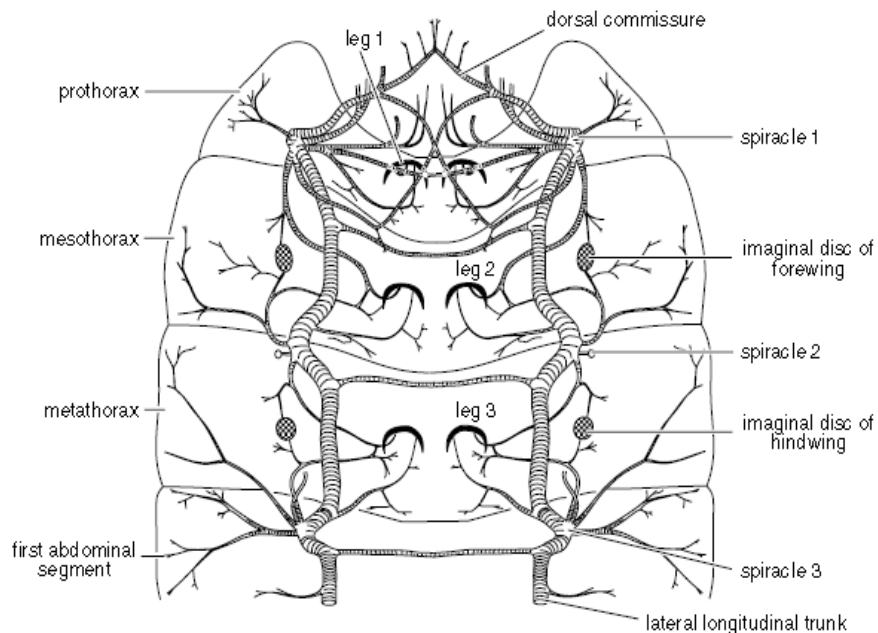


Figura 6. Distribuição de traqueias e espiráculos nos segmentos torácicos e primeiro segmento abdominal corporal de lagarta de inseto (Chapman, 1998).

Traqueias são os maiores tubos do sistema traqueal, com calibre de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$ . Internamente são revestidas por cutícula ou íntima, constituída de uma camada externa, denominada epicutícula, seguida de outra composta de resilina e quitina. São formadas por células epiteliais traqueais que apresentam tenídios (Figuras 7a e 7b). Essas estruturas espirais percorrem ao longo do eixo das traqueias e evitam que o lúmen sofra colapso, o que impediria a

passagem de gases respiratórios. Os tenídios traqueais apresentam uma camada de mesocutícula e outra de exocutícula (CHAPMAN, 1998). Conforme adentram nos tecidos os ramos da traqueia apresentam calibres menores até formarem estruturas tubulares delgadas, as traquéolas, constituídas por uma única célula, os traqueoblastos ou células traqueolares (Figura 7a). O diâmetro das traquéolas é de cerca de 1  $\mu\text{m}$ , mas pode reduzir a 0,1  $\mu\text{m}$  ou menos. Traquéolas também são revestidas pela cutícula com uma camada de epicutícula e, diferente das traqueias, as traquéolas estão intimamente conectadas às células dos tecidos, (SNODGRASS; EICKWORT, 1993) (Figura 7b, 7c e 7d).

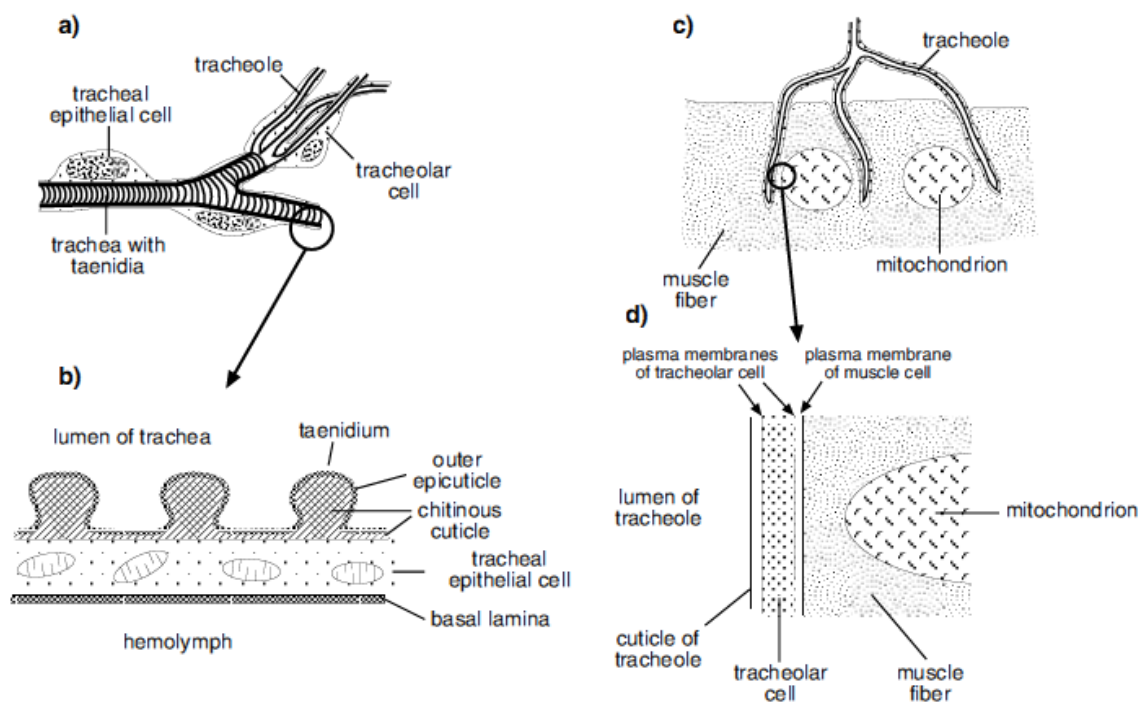


Figura 7: Sistema traqueal. (A) Diagrama mostrando a traquéia e traquéolas. (B) Corte longitudinal da parede traqueal. Lúmen traqueal acima, hemolinfa abaixo. (C) mostra o diagrama traqueolar penetrando uma fibra muscular. (D) O destaque em maior aumento da área circutada em (c) (Chapman, 1998).

O sistema traqueal é susceptível ao NPV, incluindo estudos em *B. mori* (BRANCALHÃO; TORQUATO; FERNANDEZ, 2009; ENGELHARD et al., 1994; KIRCKPATRICK et al., 1994; PEREIRA et al., 2008; RAHMAN; GOPINATHAN, 2004; TORQUATO; MIRANDA-NETO; BRANCALHÃO, 2006a). Conforme colocado anteriormente, a traqueia se apresenta como um órgão dispersor da infecção viral, devido a facilidade com que as partículas virais atravessam a lâmina basal e alcançam os tecidos. Além disso, detalhes da citopatologia da infecção não são descritos.

Buscando compreender o elo entre a dispersão viral e o sistema traqueal, Engelhard et al. (1994), desenvolveram um modelo de mecanismo de penetração na lâmina basal das células do sistema traqueal e para seguir a progressão da infecção dentro do inseto, utilizaram um recombinante de *Autographa californica multiplo nucleopolyhedrovirus* designado AcMNPV-hsp70/lacZ, que permitiu visualizar a infecção viral via hospedeiros larvais, assim relataram que as células epidérmicas traqueais, atuam como um sistema linfático, que localmente, se contactam com outras células através dos pés epidérmicos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Analisar a citopatologia causada pelo AlphaBV, o BmMNPV, isolado geográfico do paraná, na traqueia de lagartas híbridas *B. mori*.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Descrever o ciclo infeccioso do BmMNPV nas células epiteliais traqueais de *B. mori*.

Verificar alteraes na organizao tecidual da traqueia submetida a inoculao experimental com o BmMNPV.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. R.; McCLINTOCK, J. T. Baculoviridae. Nuclear Polyhedrosis Viruses. Part 1. Nuclear Polyhedrosis Viruses of Insects. In: **Atlas of Invertebrate Viruses** (Adams JR and Bonami JR, eds.). CRC Press, Florida, p. 89-180,1991.
- ALCÂNTARA, M. R.; DALTIM, D. A química do processamento têxtil. **Química Nova**. v. 19, n. 3, p. 320-330, mai-jun, 1996. Disponível em: [http://quimicanova.sbq.org.br/qn/qnol/1996/vol19n3/v19\\_n3\\_17.pdf](http://quimicanova.sbq.org.br/qn/qnol/1996/vol19n3/v19_n3_17.pdf) Acesso em: 24 out. 2012.
- BAGGIO, M. P. D.; RIBEIRO, L. F. C.; VESSARO-SILVA, S. A.; BRANCALHÃO, R. M. C. *Bombyx mori* Pylorus Infection by *Alphabaculovirus*. **Genetics and Molecular Research** (no prelo).
- BARRETT, J. W., BROWNRIGHT, A. J., PRIMAVERA, M. J., PALLI, S. R. Studies of the nucleopolyhedrovirus infection process in insects by using the green fluorescence protein as a reporter. **Journal of Virology**, v. 72, n. 4, p. 3377-3382, abr. 1998. Disponível em: <http://jvi.asm.org/content/72/4/3377.full.pdf+html> Acesso em: 24 out. 2012.
- BERRETTA, M. F.; FERRELLI, L.M.; SALVADOR, R.; SCIOCCO, A.; ROMANOWSKI, V. Baculovirus Gene Expression. In: **Current Issues in Molecular Virology - Viral Genetics and Biotechnological Applications**. Argentina, 2013. cap. 3, p. 57-78.
- BRANCALHÃO, R. M. C. Vírus entomopatogênicos no bicho-da-seda. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 24, p. 54-58, jan-fev, 2002. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio24/virus.pdf> Acesso em: 24 out. 2012.
- BRANCALHÃO, R. M. C., TORQUATO, E. F. B., CASTRO, M. E. B. Identificação de um isolado de *Bombyx mori multiple* nucleopolyhedrovirus (BmMNPV) no Estado do Paraná, Brasil. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Brasília, n. 33, p. 6-13, dez, 2002a. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/175287/1/bp033.pdf> Acesso em: 24 out. 2012.
- BRANCALHÃO, R. M. C., SOUZA, V. B. V.; SOARES, M.A.M. Infecção causada por *Nucleopolyhedrovirus* nas células gordurosas de *Bombyx mori* L., 1758 (LEPIDOPTERA: BOMBYCIDAE). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 57-63, abr-jun, 2002b. Disponível em: [http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V69\\_2/brancalhao.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V69_2/brancalhao.pdf) Acesso em: 24 out. 2012.
- BRANCALHÃO, R. M. C., TORQUATO, E. F. B., FERNANDEZ, M. A. Cytopathology of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) silk gland caused by *multiple* nucleopolyhedrovirus. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 1, p. 162-172, 2009. Disponível em: <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2009/vol8-1/pdf/gmr545.pdf> Acesso em: 24 out. 2012.

BRANCALHÃO, R. M. C.; RIBEIRO, L. F. C. Cytopathology of BmNPV infection in the integument of *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, Umuarama, v. 6, n. 1, p. 15-20, jan-jun, 2003. Disponível em: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislin.d.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS &lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=360734&indexSearch=ID> Acesso em: 24 out, 2012.

BUSCH, A. P. B. **Sericicultura**. Disponível em: <[http://www.seab.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/seda\\_2010\\_11.pdf](http://www.seab.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/seda_2010_11.pdf)>. Acesso em: 12 jul. 2012.

CARPENTIER, D. C. J.; GRIFFITHS, C. M.; KING, L. A. The baculovirus P10 protein of *Autographa californica Nucleopolyhedrovirus* forms two distinct cytoskeletal-like structures and associates with polyhedral occlusion bodies during infection. **Virology**, v. 371, n. 2, p. 278 – 291, fev. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17991504> Acesso em: 26 out. 2012.

CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. 4<sup>th</sup>. Cambridge. Cambridge University Press, v. 3, 1998.

CORRADELO, E. F. A. **Bicho-da-Seda e amoreira: da folha ao fio, a trama de um segredo milenar**. Ícone. p.64-91, 1987.

DOURADO, L. A., RIBEIRO, L. F. C., BRANCALHÃO, R. M. C., TAVARES, J., BORGES, A. R., FERNANDEZ, M. A. Silkworm salivary glands are not susceptible to *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis vírus. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 1. p. 335-339, fev, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21365549> Acesso em: 24 out. 2012.

EATON, J. L. **Lepidopteran anatomy**. Blacksburg, Virginia: John Wiley & Sons, 1939.

ENGELHARD, E. K.; KAM MORGAN, L. N. W.; WASHBURN, J. O.; VOLKMAN, L. E. The insect tracheal system: A conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 91, n. 8, p. 3224-3227, abr. 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC43548/> Acesso em: 24 out. 2012.

FAN, Q.; LI, S.; WANG, L.; ZHANG, B.; YE, B.; ZHAO, Z. The genome sequence of the multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus of the Chinese oak silkworm *Antheraea pernyi*. **Virology**, v. 366, n. 2, p. 304-315, abr. 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682207003170>. Acesso em: 24 out. 2012.

FONSECA, A. S.; FONSECA, T. C. **Cultura da amoreira e criação do bicho-da-seda**. São Paulo: Nobel, p. 246, 1986.

GHAZNAVI, A. M.; KOKAI, L. E.; LOVETT, M. L.; KAPLAN, D. L.; MARRA, K. G. Silk Fibroin Conduits: A Cellular and Functional Assessment of Peripheral Nerve Repair **Annals Plastic Surgery**. v. 66, n. 3, p. 273–279, mar, 2011. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3090669/pdf/nihms275892.pdf>  
Acesso em: 24 out. 2012.

GOLDSMITH, M. R.; SHIMADA, T.; ABE, H. The genetics and genomics of the silkworm, *Bombyx mori*. **Annual Review of Entomology**. v. 50, p. 71-100, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15355234> Acesso em: 24 out. 2012.

GRANADOS, C. F.; LAWLER, K. A. In vitro pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. **Virology**. V. 108, n. 2, p. 297-308, 1981. Disponível em: <http://lib.bioinfo.pl/paper:18635031> Acesso em: 24 out. 2012.

GRANADOS, R. R.; WILLIAMS, K. A. In vivo infection and replication of baculovirus. In: GRANADOS, R. R.; FEDERICI, B. A. (Eds.) **The biology of baculoviruses**. Florida: CRC Press, v. 1, p.89-108, 1986.

GUANZIROLI, C. F. ROMEIRO, A., BUAINAIN, A. M., SABBATO, A. D., BITTENCOURT, G. **Agricultura familiar e reforma agrária no século XXI**. Rio de Janeiro: Garamond, 2001. Disponível em: <http://www.garamond.com.br/arqui vo/321.pdf> Acesso em: 24 out. 2012.

GUO-PING, K.; XI-JIE, G. Overview of silkworm pathology in China. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 79, p. 18046-18056, dez. 2011. Disponível em: <http://www.academicjournals.org/ajb/PDF/pdf2011/12Dec/Guo-Ping%20and%20Xi-Jie.pdf>. Acesso em: 24 out. 2012.

HAAS-STAPLETON, E. J., WASHBURN, J. O., VOLKMAN, L. E. *Spodoptera frugiperda* resistance to oral infection by *Autographa californica multiple* nucleopolyhedrovirus linked to aberrant occlusion-derived virus binding in the midgut. **Journal of General Virology**. v. 86, n. 5, p. 1349-1355, maio, 2005. Disponível em: <http://vir.sgmjournals.org/content/86/5/1349.full.pdf+html> Acesso em: 24 out. 2012.

HANADA, Y.; WATANABE, J. K. **Manual de criação do bicho-da-seda**. Curitiba, Cocamar, p. 224, 1986.

HONG, H. K.; WOO, S. D.; CHOI, J. Y.; LEE, H. K.; KIM, M. H.; JE, Y. H.; KANG, S. K. Characterization of four isolates of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. **Archives of Virology**, v. 145, n. 11, p. 2351-2361, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11205122>. Acesso em: 24 out. 2012.

JUNG, S. R.; SONG, N. J.; HWANG, H. S.; AN, J. J.; CHO, Y. J.; KWEON, H. Y.; KANG, S. W.; LEE, K. G.; YOON, K.; KIM, B. J.; NHO, C. W.; CHOI, S. Y.; PARK, K. W. Silk peptides inhibit adipocyte differentiation through modulation of the Notch pathway in C3H10T1/2 cells. **Nutrition Research**, v. 31, n. 9, p. 723 – 730, set. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22024497>. Acesso em: 24 out. 2012.

JUNG, S. R.; SONG, N. J.; YANG, D. K.; CHO, Y. J.; KIM, B. J.; HONG, J. W.; YUN, U. J.; JO, D. G.; LEE, Y. M.; CHOI, S. Y.; PARK, K. W. Silk proteins stimulate osteoblast differentiation by suppressing the Notch signaling pathway in



mesenchymal stem cells. **Nutrition Research**. v. 33, n. 2, p. 162-70, feb, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23399667> Acesso em: 24 out. 2013.

KATSUMA, S.; TSUCHIDA, A.; MATSUDA-IMAI, N.; KANG, W.; SHIMADA, T. Role of the ubiquitin-proteasome system in *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus infection. **Journal General Virology**. v. 92, p. 699–705, 2011.

KIRKPATRICK, B. A.; WASHBURN, J. O.; ENGELHARD, E. K.; VOLKMAN, L. E. Primary infection of insect tracheae by *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. **Virology**. v. 203, n. 1, p. 184-186. ago, 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8030276> Acesso em: 24 out. 2012.

KUNDU, B.; KURLAND, N. E.; BANO, S.; PATRA, C.; ENGEL, F. B.; YADAVALLI, V. K.; KUNDU, S. C. Silk proteins for biomedical applications: Bioengineering perspectives. **Progress in Polymer Science**. set, 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670013001081> Acesso em: 24 out. 2013.

KURIN, R. The Silk Road: Connecting Cultures, Creating Trust. Talk story, Fall. **Smithsonian Center for Folklife and Cultural Heritage**, v. 21, p. 1-11, 2002. Disponível em: [http://archive.org/stream/silkroadconnecti00smit/silkroadconnecti00smit\\_djvu.txt](http://archive.org/stream/silkroadconnecti00smit/silkroadconnecti00smit_djvu.txt) Acesso em: 24 out. 2012.

LIANG, X.; LU, Z-L.; WEI, B-X.; FENG, J-L.; QU, D.; LUO, T. R. Phylogenetic analysis of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus polyhedrin and p10 genes in wild isolates from Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. **Virus Genes**, v. 46, n. 1, p.140-151, fev. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23011774>. Acesso em: 24 out. 2012.

LIMA, A. A. O papel das enzimas quitinase e catepsina na patologia viral de baculovírus. Universidade de Brasília, Brasília, [Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, UNB], 2013.

MONDAL, M.; TRIVEDY, K.; KUMAR, S. N. The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* - a review. **Caspian Journal of Environmental Sciences**. v. 5, n. 2, p. 63-76, 2007. Disponível em: [http://www.sid.ir/Em/VEWSSID/J\\_pdf/120920070208.pdf](http://www.sid.ir/Em/VEWSSID/J_pdf/120920070208.pdf). Acesso em: 24 out. 2012.

MORAES, M. A.; BEPPU, M. M. Biocomposite membranes of sodium alginate and silk fibroin fibers for biomedical applications. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 130, p. 3451–3457, jun, 2013. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/app.39598/abstract> Acesso em: 24 out. 2013.

NAGARAJU, J. Recent advances in molecular genetics of the silk moth, *Bombyx mori*. **Current Science**, v. 78, n. 2, p. 151-161. jan, 2000. Disponível em: <http://www.cdfd.org.in/lmg/PDF/jn28.pdf> Acesso em: 24 out. 2012.

PANUCCI-FILHO, L., CHIAU, A.V., PACHECO, V. Custo da sericicultura: A

produção de casulos de Bicho-da-Seda no Paraná. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, Maringá, v.4, n.1, p. 37-55, jan-abr, 2011. Disponível em: <http://www.cesumar.br/pesquisa/periodicos/index.php/rama/article/view/1747/11> 85 Acesso em: 24 out. 2012.

PAPAVERO, N., PUJOL LUZ, J. R. Notas sobre o bicho-da-seda no folclore Chinês. **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 55, n. 1, p. 141–142, março, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbent/v55n1/a24v55n1.pdf> Acesso em: 11 mar. 2013.

PARK, S. Y.; KI, C. S.; PARK, Y. H.; JUNG, H. M. ; WOO, K. M.; KIM, H. J. Electrospun silk fibroin scaffolds with macropores for bone regeneration: an in vitro and in vivo study. **Tissue Engineering Part A**. v. 16, n. 4, p. 1271-1279, apr, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=PARK%2C+S.+Y.%3B+KI%2C+C.+S.%3B+PARK%2C+Y.+H..%3B+JUNG%2C+H.+M.+%3B+WOO%2C+K.+M.%3B+KIM%2C+H.+J.+Tissue+Engineering+Part+A.+v.+16%2C+n.+4%2C+p.+1271-1279%2C+apr%2C+2010>. Acesso em: 24 out. 2012.

PASSARELLI, A. L. Barriers to success: how baculoviruses establish efficient systemic infections. **Virology**. v. 411, n. 2, p. 383-392, março, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3058624/> Acesso em: 24 out. 2012.

PEREIRA, E. P., CONTE, H., RIBEIRO, L. F. C., ZANATTA, D. B., BRAVO, J. P., FERNANDEZ, M. A., BRANCALHÃO, R. M. C. Cytopathological process by *multiple Nucleopolyhedrovirus* in the testis of *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). **Journal of Invertebrate Pathology** v. 99, n. 1, p. 1-7, maio, 2008. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0022201108001018/1-s2.0-S0022201108001018-main.pdf?tid=968ad628-1dde-11e2-b369-00000aab0f6b&acdnat=1351085442a9e58d0ef74d8b4ade6405f9c84e72d2> Acesso em: 24 out. 2012.

PEREIRA, N. C; MUNHOZ, R.E.F.; BIGNOTTO, T.S.; BESPALHUK, R.; GARAY, L.B.; SAEZ, C.R.N.; FASSINA, V.A.; NEMBRI, A.; FERNANDEZ, M.A. Biological and molecular characterization of silkworm strains from the Brazilian germplasm bank of *Bombyx mori* **Genetics and Molecular Research** v. 12, n. 2, p. 2138-2147, jun, 2013. Disponível em: <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2013/vol12-2/pdf/gmr2328.pdf> Acesso em: 24 out. 2013.

POTRICH, M., ALVES, L. F. A., BRANCALHÃO, R. M. C., DALCIN, G. Entomopatógenos associados a lagartas de *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) no Estado do Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 4, p.363-367, out-dez, 2007. Disponível em: [http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v74\\_4/potrich.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v74_4/potrich.pdf) Acesso em: 26 out. 2012.

QIN, L.; XIA, H.; SHI, H.; ZHOU, Y.; CHEN, L.; YAO, Q.; LIU, X.; FENG, F.; YUAN, Y.; CHEN, K. Comparative proteomic analysis reveals that caspase-1 and serine protease may be involved in silkworm resistance to *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 12, p. 3630-3638, 2012.

Disponível em: [http://ac.els-cdn.com/S1874391912002217/1-s2.0-S1874391912002217-main.pdf?\\_tid=3ae2bb4a-0520-11e3-9915-00000aab0f6c&acdnat=1376512353\\_cd74a9099bbe0dbe8c6c234ba5b777f6](http://ac.els-cdn.com/S1874391912002217/1-s2.0-S1874391912002217-main.pdf?_tid=3ae2bb4a-0520-11e3-9915-00000aab0f6c&acdnat=1376512353_cd74a9099bbe0dbe8c6c234ba5b777f6). Acesso em: 06 ago. 2013.

RAHMAN, M. M., GOPINATHAN, K. P. *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus based surface display system for recombinant proteins. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 8, p. 2023-31. ago, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12867632> Acesso em: 24 out. 2012.

RAHMAN, M. M., GOPINATHAN, K. P. Systemic and *in vitro* infection process of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. **Virus Research**, v. 101, n. 2, p. 109-118. maio, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15041178> Acesso em: 24 out. 2012.

RAJU, A. H. H.; MAMATHA, D. M.; RAO, M. R.; KANJI, V. K. Impact of turmeric on the protein and lipid metabolic profiles of silkworm, *Bombyx mori* L. and cocoon production. **Current Biotica**, v. 6, n. 2, p. 208-226, 2012. Disponível em: <http://www.ets-staffing.com/currentbiotica/Journals6-IssueII/CB-6-2-Full-length-9.pdf> Acesso em: 24 out. 2012.

RIBEIRO, L. F. C.; BRANCALHÃO, R. M. C., TORQUATO, E. F. FERNANDEZ, M. A. Susceptibility of the *Bombyx mori* cardia cells to *Nucleopolyhedrovirus, multiple* subgroup, BmMNPV. **Journal of Invertebrate Pathology** v.100, n. 3 p. 195–198, mar, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19211024> Acesso: 24 out. 2012.

ROHRMANN, G. F. **Baculovirus Molecular Biology**. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); NCBI; 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK49500/>. Acesso em: 13 fev. 2013.

SECRETARIA DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO DO PARANÁ - SEAB. **Relatório Takii: Perfil da Sericicultura no Estado do Paraná, safras 2009/2010**. Curitiba, 2010.

SECRETARIA DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO DO PARANÁ – SEAB. **Relatório Takii: Perfil da Sericicultura no Estado do Paraná, safras 2010-2011/2011-2012**. Curitiba, 2013.

SEO, C-W.; IN, C. U.; CATHERINE, W. R.; MI, Y. K. Antihyperlipidemic and Body Fat-Lowering Effects of Silk Proteins with Different Fibroin/Sericin Compositions in Mice Fed with. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 59, p. 4192-4197, 2011. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf104812g>. Acesso em: 06 jul. 2013.

SHI, L. B.; CAI, H. X.; CHEN, L. K.; WU, Y.; ZHU, S. A.; GONG, X. N.; XIA, Y. X.; OUYANG, H. W.; ZOU, X. H. Tissue engineered bulking agent with adipose-derived stem cells and silk fibroin microspheres for the treatment of intrinsic urethral sphincter deficiency. **Biomaterials**, v. 35, n. 5, p. 1519–1530, feb, 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961213013781> Acesso em:

01 dec. 2013.

SHOAE HASSANI, A.; MORTAZAVI TABATABAEI, S. A.; SHARIF, S.; SEIFALIAN, A. M.; AZIMI, A.; SAMADIKUCHAKSARAEI, A.; VERDI, J. Differentiation of human endometrial stem cells into urothelial cells on a three-dimensional nanofibrous silk–collagen scaffold: an autologous cell resource for reconstruction of the urinary bladder wall. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. jan, 2013. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/term.1632/abstract;jsessionid=590778C1EB712F85E25DBBF6771E69B2.f03t01> Acesso em: 24 out. 2013.

SNODGRASS, R. E.; EICKWORT, G. C. **Principles of Insect Morphology**. New York, Cornell University Press, p. 338-369, 1993.

STOLTZ, D. B.; PAVAN, C.; CUNHA, A. B. Nuclear polyhedrosis vírus: a possible example of *De Novo* Intranuclear Membrane Morphogenesis. **Journal of General Virology**. v. 19, p. 145-150, set, 1972. Disponível em: <http://vir.sgmjournals.org/content/19/1/145> Acesso em: 24 out. 2012.

TAMADA, Y. New Process to Form a Silk Fibroin Porous 3-D Structure. **Biomacromolecules** v. 6, n. 6, p. 3100-3106, sep, 2005. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm050431f> Acesso em: 24 out. 2012.

TORQUATO, E. F. B., MIRANDA NETO, M. H. M., BRANCALHÃO, R. M. C. *Nucleopolyhedrovirus* Infected Central Nervous System Cells of *Bombyx mori* (L.) (Lepidoptera: Bombycidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 1, p. 070-074, jan-fev, 2006. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1519-566X2006000100010](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-566X2006000100010) Acesso em: 24 out. 2012.

TSUKAMOTO, R. Y. Políticas públicas para a agricultura familiar: o Norte do Paraná em foco. **Revista Geográfica de América Central**, Costa Rica, v. 2, n. 47, p. 1-19, jul-dez, 2011. Disponível em: <http://revistas.una.ac.cr/index.php/geografica/article/view/2359>. Acesso em: 26 out. 2012.

VESSARO SILVA, S. A.; BRANCALHÃO, R. M. C.; BAGGIO, M. P. D.; RIBEIRO, L. F. C. Differential behavior of the rectum of *Bombyx mori* in relation to experimental inoculation with *Alphabaculovirus*. **Genetics and Molecular Research**. no prelo.

ZANETTI, R. Introdução à sericicultura. **Notas de aula**. DEN/UFLA, Lavras, 2007. Disponível em: <http://www.den.ufla.br/siteantigo/Professores/Ronald/DisCIPLINAS/Notas%20Aula/Sericicultura%20introducao.pdf> Acesso em: 06 out. 2012.

**ARTIGO 1:****Citopatologia da traqueia de *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) ao *Bombyx mori multiple nucleopolyhedrovirus* (BmMNPV)**

Submetido à Revista Anais da Academia Brasileira de Ciências<sup>1</sup>.

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_serial&pid=0001-3765&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_serial&pid=0001-3765&lng=en&nrm=iso)

---

<sup>1</sup> Normas da Revista no anexo 1.

## Citopatologia da traqueia de *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) ao *Bombyx mori multiple nucleopolyhedrovirus* (BmMNPV)

JÉSSICA VENCATTO SENEM<sup>1, 2</sup>; EDNÉIA FÁTIMA BRAMBILLA TORQUATO<sup>3</sup>; LUCINÉIA DE FÁTIMA CHASKO RIBEIRO<sup>1</sup>; ROSE MEIRE COSTA BRANCALHÃO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós Graduação em Biociências e Saúde (PPGBS), UNIOESTE, Campus de Cascavel

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade Assis Gurgacz (FAG), Avenida das Torres, 500, Loteamento FAG, 85806-095, Cascavel - PR, Brasil

<sup>3</sup> Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Campus de Cascavel, Rua Universitária, 1619, Universitário, 85819-110, Cascavel – PR, Brasil

### Abstract

*Bombyx mori* is found in germplasm banks and it plays an important role in the silk industry. Morphological data related to resistance and/or susceptibility to disease is important when selecting hybrids for commercial and scientific interest. This study analyzed the cytopathology of the trachea of *B. Mori* in relation to *Bombyx mori multiple nucleopolyhedrovirus* (BmMNPV), isolated geographically in Paraná state, Brazil. Fifth instar larvae were divided into two groups, control and inoculated; the viral suspension used was  $2.4 \times 10^7$  polyhedral occlusion bodies/mL. From the 2nd day post-inoculation (dpi) to the 9th dpi, segments of organs, containing branches of the trachea, were processed for transmission electron microscopy. Analyses of fresh hemolymph were performed to verify the susceptibility of the hemocytes. Signs of infection were first detected on the 2nd dpi in the hemocytes, and in the tracheal cells on the 4th dpi. The cytological examination of the trachea showed the stages of the viral cycle, which was the same as in other tissues. Virions were detected in the basal lamina of the trachea, which showed structural disorganization. Thus, the trachea is a secondary target of infection and the hemolymph is an important organ for the dispersal of viral infection.

Keywords: *Baculoviridae*. Lepidoptera. Sericulture. Trachea.

### INTRODUÇÃO

*Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae), denominado bicho-da-seda da amoreira, é um holometábolo que produz ao final do 5º instar larval um casulo de seda, amplamente utilizado na indústria sericícola, para produção de diversos tipos de fios e tecidos (Sabbag et al. 2013, Takahashi et al. 2009). O inseto apresenta

diferentes raças geográficas, como a chinesa e a japonesa, utilizadas como matrizes na produção de híbridos comerciais mais produtores de seda e resistentes aos patógenos favorecendo o setor produtivo (Porto et al. 2004; Ribeiro et al. 2009a).

Devido ao longo processo de domesticação a espécie não é mais encontrada na natureza, estando presente somente em bancos de germoplasma, como o da Universidade Estadual de Maringá, PR, Brasil; sua caracterização e conservação são essenciais na preservação do patrimônio genético de *B. mori* (Pereira et al. 2013). Além disso, propicia o fortalecimento da sericicultura, que no Brasil se desenvolve em pequenas propriedades rurais, onde predomina o trabalho familiar, com significativa geração de renda ao produtor, o que contribui na diminuição do êxodo rural (Panucci-Filho et al. 2011).

Segundo Nagaraju (2000) raças e linhagens de *B. mori* apresentam particularidades nas suas características morfológicas, de desenvolvimento, comportamentais e bioquímicas. Acrescenta que a diversidade genética resulta dos cruzamentos entre as raças geográficas, responsáveis por uma variedade de atributos quantitativos relacionados ao tamanho do corpo, duração na alimentação, tolerância térmica e resistência às doenças.

Doenças na criação, entre outras variáveis, representam um risco e potencial prejuízo aos produtores e a toda cadeia produtiva da seda. Os vírus são importantes patógenos que ameaçam a produção em regiões tropicais (Khurad et al. 2004, Potrich et al. 2007, Rahman e Gopinathan 2003). No Brasil, especificamente no estado do Paraná, foi identificado um isolado geográfico do nucleopoliedrovírus (NPV) infectando lagartas de *B. mori* e que pertence ao chamado subgrupo múltiplo, o BmMNPV (família *Baculoviridae*, gênero *Alphabaculovirus* – AlphaBV), responsável pela doença poliedrose nuclear (Brancahão 2002). Esta representa um

sério problema para a sericicultura, pois uma vez doentes as lagartas não se curam e devem ser eliminadas, para se evitar a disseminação e propagação do patógeno no ambiente (Liang et al. 2013, Qin et al. 2012, Satadal et al. 2012, Sengupta et al. 1990).

Os NPV são constituídos por uma molécula de DNA circular fita dupla, que se associa com proteínas do capsídeo, formando o nucleocapsídeo. Este é envolto por um envelope lipoprotéico e constitui o nucleocapsídeo envelopado ou vírion. Quando ocorre apenas um nucleocapsídeo por envelope o subgrupo viral é denominado simples (SNPV), e no caso de mais de um nucleocapsídeo por envelope é múltiplo (MNPV) (Rohrmann 2011), considerado o mais virulento (Adams e McClintock 1991, Brancalhão et al. 2002a, Fan et al. 2007, Washburn et al. 2003,). Liang et al. (2013) discutem a presença de variação genética em NPV de mesma espécie e de regiões geográficas diferentes, o que pode afetar sua virulência.

O BmMNPV é poliorganotrófico e vários tecidos foram identificados como alvos: piloro, tegumento, traqueia, tecido gorduroso, cárdia, sistema nervoso central, testículo, regiões média e posterior da glândula da seda e células do reto (Baggio et al 2013, Brancalhão et al. 2002a, Brancalhão et al. 2002b, Brancalhão e Ribeiro 2003, Brancalhão et al. 2009, Pereira et al. 2008, Ribeiro et al. 2009b, Torquato et al. 2006a, Vessaro-Silva et al. no prelo).

Vários autores ao estudarem a susceptibilidade de tecidos de *B. mori* ao BmMNPV, como glândula da seda, testículo e tecido nervoso, relataram que a traqueia é alvo da infecção; entretanto, não apresentaram detalhes de sua citopatologia (Brancalhão et al. 2009, Pereira et al. 2008 e Torquato et al. 2006a). Da mesma forma, Engelhard et al. (1994) e Kirckpatrick et al. (1994) verificaram a



susceptibilidade da traqueia de lepidoptera ao *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV).

Assim, considerando a importância do sistema traqueal no equilíbrio metabólico do inseto e a necessidade de se caracterizar o banco de germoplasma do bicho-da-seda com o máximo de informações, especialmente as relacionadas à resistência a doenças, o presente estudo analisou a citopatologia da infecção causada pelo BmMNPV, isolado geográfico do Paraná, Brasil, nas células traqueais de lagartas híbridas de *B. mori*.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### ***Insetos***

Lagartas híbridas de *B. mori*, resultantes do cruzamento das raças Chinesa, linhagem C37 e Japonesa M11-2 no 3º instar do desenvolvimento foram obtidas do banco de germoplasma da Universidade Estadual de Maringá (UEM), localizada na cidade de Maringá, PR, Brasil. As lagartas foram acondicionadas em caixas de polietileno e mantidas em sala de criação, com temperatura de 23°C e umidade de 70% (Hanada e Watanabe 1986). A alimentação, folhas frescas de amoreira (*Morus* sp.), foi fornecida três vezes ao dia, *ad libitum*, até o 5º instar.

### ***Inoculação viral***

*Bombyx mori* multiple nucleopolyhedrovirus, BmMNPV, isolado geográfico do Paraná, Brasil, foi identificado por Brancalhão (2002), (GenBank número de acesso EU251694.1). O inóculo viral do BmMNPV foi obtido de lagartas previamente infectadas, mantido em temperatura de -4°C e quantificado em câmara de Neubauer na concentração de  $2,4 \times 10^7$  corpos de oclusão poliédricos/mL.

A inoculação foi efetuada quando as lagartas híbridas passaram para o 5º instar, através do fornecimento individual de discos foliares de amoreira de 2 cm<sup>3</sup>, contendo a suspensão viral do BmMNPV. Lagartas controle foram alimentadas com discos foliares contendo água.

Após a ingestão dos discos foliares, as lagartas novamente foram acondicionadas nas caixas de polietileno, recebendo a alimentação de rotina, isenta de BmMNPV.

### ***Análise da hemolinfa e dos sinais de infecção***

Para acompanhamento da infecção e da viabilidade do inóculo do BmMNPV, foi realizada a análise da hemolinfa, através da punção do tegumento na região das falsas pernas caudais, do 2º ao 9º dia pós inoculação (dpi). Uma gota da hemolinfa foi coletada e colocada sobre lâmina de vidro para análise *a fresco* em microscopia de luz.

### ***Microscopia Eletrônica***

Lagartas foram selecionadas aleatoriamente da caixa de criação, do 2º ao 9º dpi, anestesiadas no *freezer*, por cerca de 5 minutos, e dissecadas através da abertura longitudinal do tegumento, do ânus até a altura da cabeça, com auxílio do microscópio estereoscópico.

Segmentos da traqueia nas regiões do tegumento, músculo e glândula da seda, foram coletados e colocados em frascos individualizados, previamente identificados, contendo o fixador Karnovsky modificado (Karnovsky 1965), por 2 horas a 4°C. Na sequência, foram lavados três vezes em solução de tampão cacodilato de sódio 0,05 M, em intervalos de 10 minutos cada. Posteriormente, foi realizada a pós-fixação com tetróxido de ósmio, a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, por 2 horas. Os segmentos foram lavados duas vezes em água

destilada, por 15 segundos cada, e imersos em acetato de uranila 0,5%, *overnight* a 4°C.

A desidratação foi realizada em soluções de acetona a 50%, 70%, 80%, 90% e 100%, por 10 minutos cada, e a inclusão em resina Spurr (Spurr 1969), nas proporções Spurr:acetona [1:1], e [1:3], 3 horas cada, e Spurr puro *overnight*. O emblocamento foi feito em estufa a 70°C, por 48 horas. Secções de 60-80 nm foram contrastadas em acetato de uranila a 2% e citrato de chumbo (Reynold's 1963), por 10 minutos cada.

Imagens da microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram produzidas no equipamento CM100 da Philips, no Instituto de Biociências, Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Campus de Botucatu-SP e com equipamento EM900 Zeiss do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa – COMCAP da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Na análise citopatológica, vírions e poliedros do BmMNPV foram detectados nas células do epitélio traqueal de lagartas híbridas de *B. mori* a partir do 4° dpi, mesmo tempo observado por Brancalhão et al. (2002b) e Torquato et al. (2006a); entretanto, Brancalhão et al. (2009) e Pereira et al. (2008) verificaram a infecção no 6° dpi, e Brancalhão e Ribeiro (2003), no 5° dpi. Estas diferenças nos tempos de infecção são características dos AlphaBV e podem estar relacionadas a diversos fatores referentes: ao manejo da criação, como desinfecção, limpeza do barracão de criação, temperatura, quantidade de lagartas e disponibilidade do alimento (Hanada e Watanabe 1986, Porto et al. 2004); ao inóculo viral, sua virulência e a quantidade ingerida (Adams e McClintock 1991, Granados e Williams 1986); e a raça e linhagem

de *B. mori* utilizada (Nakazawa et al. 2004, Ponnuvel et al. 2003, Yao et al. 2003), além da idade, onde lagartas mais velhas são mais resistentes que as de 1º e 2º instares (Kirckpatrick et al. 1994).

Os núcleos das células infectadas se apresentaram hipertrofiados e em diferentes estágios de infecção (Figs. 1 e 2), indicando a replicação assincrônica do vírus (Rohrmann 2011). Nestes núcleos, a primeira estrutura viral visível foi o viroplasma ou estroma virogênico (Fig. 1a), local de síntese do DNA viral e montagem do capsídeo, formando os nucleocapsídeos (Granados e Lawler 1981, Slack e Arif 2007) (Fig. 1b), seguido do seu envelopamento, constituindo os nucleocapsídeos envelopados ou vírions (Fig. 1c) (Adams e McClintock 1991). Rohrmann (2011) discute que o envelope viral é produzido a partir de microvesículas (Fig. 1a), provenientes da membrana nuclear interna modificada pela presença de proteínas virais.

Brancahã et al. (2009) detectaram a presença de um número variável de nucleocapsídeos por envelope para o BmMNPV, sendo 11 o máximo encontrado; porém, neste estudo, foi verificado ser mais frequente a presença de um nucleocapsídeo por envelope, fato que tem levado a se considerar a espécie tipo simples, BmSNPV (Rohrmann 2011). Entretanto, o autor coloca que o BmSNPV se apresenta mais relacionado geneticamente ao AcMNPV, do que com outros SNPV e, com isso, é difícil atribuir características específicas para os fenótipos simples e múltiplo.

Quando a síntese de nucleocapsídeos está completa, começa a formação e o desenvolvimento dos poliedros (Figs. 1d e 2a), que são montados pelo acúmulo e cristalização contínuos da poliedrina ao seu redor (Rohrmann 2011). Inicialmente, os

poliedros são imaturos, menores, não envelopados e sem forma geométrica definida; posteriormente, tornam-se maiores, adquirem o envelope e o formato poliédrico. A oclusão dos vírions nos poliedros ocorre principalmente na região entre a membrana nuclear e o viroplasma, e ao final da infecção, todo o núcleo contém poliedros maduros (Brancahã et al. 2009).

O envelope do poliedro ou “calyx” é uma estrutura elétron-densa que protege os vírions e envolve os poliedros, evitando sua agregação (Liang et al. 2013), quimicamente ele é constituído por carboidratos e proteínas (Rohrmann 2011), como a p10, uma proteína multifuncional, que atua na montagem correta dos poliedros, já que poliedros com alterações nesta proteína apresentam baixa infectividade (Carpentier et al. 2008).

Poliedros maduros com tamanho e forma diferentes foram visíveis nos núcleos infectados (Fig. 2a). Torquato et al. (2006b) colocam que poliedros de BmMNPV apresentam tamanho de 2,5 a 4,5  $\mu\text{m}$  e a forma característica de octaedro truncado, mas discutem a presença de poliedros triangulares, tetraédricos e/ou hexaédricos. Diferenças no tamanho dos poliedros são características dos NPV e podem estar relacionadas com: a quantidade de nucleocapsídeos ocluídos; o metabolismo da célula infectada; e a variação genética (Adams e McClintock 1991), sendo que esta também exerce influência na geometria viral (Hong et al. 2000), somada à mutações na poliedrina (Cheng et al 2012, Gong e Lu 1993, Katsuma et al. 1999). Tal variedade de formas parece ainda estar relacionada com as posições que o poliedro toma nas preparações e as diferentes faces que são expostas à observação microscópica (Torquato et al. 2006b), o que nos leva a concordar com

Adams e McClintock (1991), quanto ao seu pouco valor na identificação do vírus, não devendo ser usada como única fonte para a identificação viral.

As regiões elétron-lucentes observadas nos núcleos infectados, que contêm poliedros maduros (Fig. 2a), parecem representar regiões desintegradas do nucleoplasma, como as citadas por Van Oers e Vlak (1997) e que, segundo estes autores, são resultantes da ação da p10. Esta proteína também atua na desintegração do envoltório nuclear e na lise celular, através de associações com microtúbulos (Carpentier et al. 2008).

Os poliedros no meio extracelular e na hemocele devem ser liberados de forma eficiente do seu hospedeiro, possibilitando a transmissão horizontal da doença. Ohkawa et al. (1994) mostrou que o genoma de BmNPV expressa uma catepsina, responsável pela liquefação do corpo do inseto e também, conforme Daimon et al. (2006), expressa uma quitinase, que em conjunto são responsáveis pela ruptura da cutícula, liberando poliedros para o meio.

No meio ambiente os poliedros persistem por muito tempo (Adams e McClintock, 1991) e, ao se aderirem à folhas de amoreira, podem ser ingeridos por lagartas sadias. Como a transmissão ocorre por via oral (Berretta et al. 2013), a infecção inicia quando os vírions são liberados do poliedro (*occlusion derived bodies* - ODV) no lúmen do intestino médio, pela ação do pH alcalino e proteínas do suco digestivo, como a serina protease e a vermelho fluorescente. Os ODV fundem-se às células epiteliais, liberando os nucleocapsídeos no citoplasma onde podem iniciar seu ciclo infeccioso, produzindo vírus broto (*budded virus* - BV), responsáveis pela infecção secundária ou sistêmica, de uma célula a outra no corpo do inseto (Rohrmann, 2011; Satadal et al. 2012).

BV brotam na região basal das células epiteliais do intestino médio e alcançam a hemolinfa, importante órgão dispersor da infecção (Barrett et al. 1998), já que esta é constituída de hemócitos, as primeiras células a serem infectadas; dessa forma é possível inferir que hemócitos infectados, circulando na hemolinfa, estão liberando vírus broto, como mostrado por Granados e Lawler (1981).

Entretanto, tecidos de insetos são envoltos por uma matriz extracelular, a lâmina basal, cuja organização e espessura atuam como um filtro seletivo à passagem de macromoléculas em certos tecidos (Passarelli, 2011); e, segundo Reddy e Locke (1990) em lagartas de *Calpodes ethlius* (Lepidoptera: Hesperiiidae), partículas menores que 15 nm atravessam a lâmina basal do corpo gorduroso e epiderme, enquanto que partículas maiores que 6 nm ficam retidas na lâmina basal da glândula da seda, túbulos de Malpighi e músculo. Vírions do BmMNPV apresentam 95 nm de diâmetro e 315 nm de comprimento (Brancahão et al. 2002a), dificultando sua passagem através da lâmina basal de tecidos do inseto.

Torquato et al. (2006a) discutem para *B. mori* a presença da barreira hemolinfa/sistema nervoso, proporcionada por uma lâmina basal espessa, a lamela neural, e abaixo desta, um epitélio de revestimento constituído por células do perineuro, que dificultariam a entrada de vírions provenientes da hemolinfa. Os autores colocam que as ramificações do sistema traqueal romperiam esta barreira, permitindo o acesso dos vírions.

Evidências do papel da traqueia como dispersora de infecção foram obtidas por Kirkpatrick et al. (1994), ao verificarem que a aplicação de BV de AcMNPV, diretamente nos espiráculos, pode iniciar a infecção sistêmica e que a mesma se processa de forma mais rápida que a infecção pela rota oral.

E vários outros autores também atribuem às traqueias, a função de dispersão do vírus (Brancahão et al. 2009, Engelhard et al. 1994, Kirckpatrick et al. 1994, Pereira et al. 2008, Rahman e Gopinathan 2003, 2004, ; Torquato et al. 2006a).

Engelhard et al. (1994) analisaram que em lagartas de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae), infectadas com *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus, as células epidérmicas traqueais estabelecem uma espécie de sistema linfático comum, formado por extensões da membrana plasmática basal, denominadas pés epidérmicos. Tais extensões parecem facilitar a comunicação celular a longas distâncias, tornando mais rápida a dispersão viral entre os tecidos.

Contudo, nas análises *a fresco* da hemolinfa das lagartas de *B. mori* foi verificada a infecção de hemócitos pelo BmMNPV no 2º dpi (não mostrado). Barret et al. (1998) também detectaram a infecção inicial de hemócitos de *T. ni*, por um recombinante de AcMNPV que expressa a proteína fluorescente verde, em 24 horas. Brancahão et al. (2002b) mostraram a infecção de células do tecido adiposo no 4º dpi, tempo igual ao obtido neste estudo para as traqueias. Estes dados sugerem, da mesma forma que o colocado por Flipsen et al. (1995), usando um recombinante de AcNPV na infecção de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae), que a passagem de vírions através da lâmina basal pode não depender exclusivamente da infecção do sistema traqueal.

Nas análises foi possível detectar alterações na lâmina basal da traqueia, que se apresentou desorganizada, com espaços entre suas camadas constituintes, contendo vírions (Fig. 1e). Passarelli (2011) discute que a lâmina basal é uma estrutura dinâmica e, durante os processos de síntese e degradação pode-se criar pequenas aberturas que permitiriam a entrada de vírions. Ainda, o autor analisa a



presença de um fator de crescimento do fibroblasto (*fgf*) no genoma de baculovírus, envolvido no movimento dos vírions através da lâmina basal, e que possibilita a rápida dispersão e morte do hospedeiro. O *fgf* viral, *vfgf*, se apresenta conservado nos AlphaBV, incluindo o BmNPV, e sinalizam uma cascata de eventos que acelera a infecção sistêmica. Quando as células epiteliais do intestino médio são infectadas, o *vfgf* se difunde através da lâmina basal e ativa o receptor para *fgf* nas células traqueais. Os eventos da sinalização levam a ativação de metaloproteases da matriz e, posteriormente, caspases. Estas movem-se extracelularmente e degradam a laminina da lâmina basal; com isso, as células da traqueia ficam susceptíveis ao vírus. Este mecanismo possibilitaria a dispersão viral para outros tecidos.

Amostras controle provenientes de lagartas sadias de 5<sup>o</sup> instar e processadas da mesma forma descrita para as infectadas, não apresentaram poliedros, nem viroplasma, ou quaisquer estruturas ou componentes que indicassem infecção viral, em nenhum dos tempos analisados. Além dos poliedros virais, não foi observada a presença de protozoários, bactérias ou outros patógenos que pudessem estar associados às alterações descritas (Fig. 2b).

Assim, a análise das células traqueais de lagartas de *B. mori*, submetidas a infecção experimental com BmMNPV, isolado geográfico do Paraná, Brasil, revelou aspectos citopatológicos característicos de infecção por AlphaBV. Além disso, foi possível verificar alterações na matriz extracelular da traqueia, a lâmina basal, que sofre um desarranjo na estrutura, o que possibilita a entrada de BV, a partir da hemolinfa do inseto e, desta forma, concorda-se com Brancalhão et al. (2009) que colocam que em *B. mori* tanto a traqueia como a hemolinfa são sistemas que atuam na dispersão da infecção pelo NPV. Da mesma forma, relatam Khurad et al. 2004,

Kirckpatrick et al. 1994, Rahman e Gopinathan 2003, 2004 e Soares e Ribeiro 2005 em outros hospedeiros.

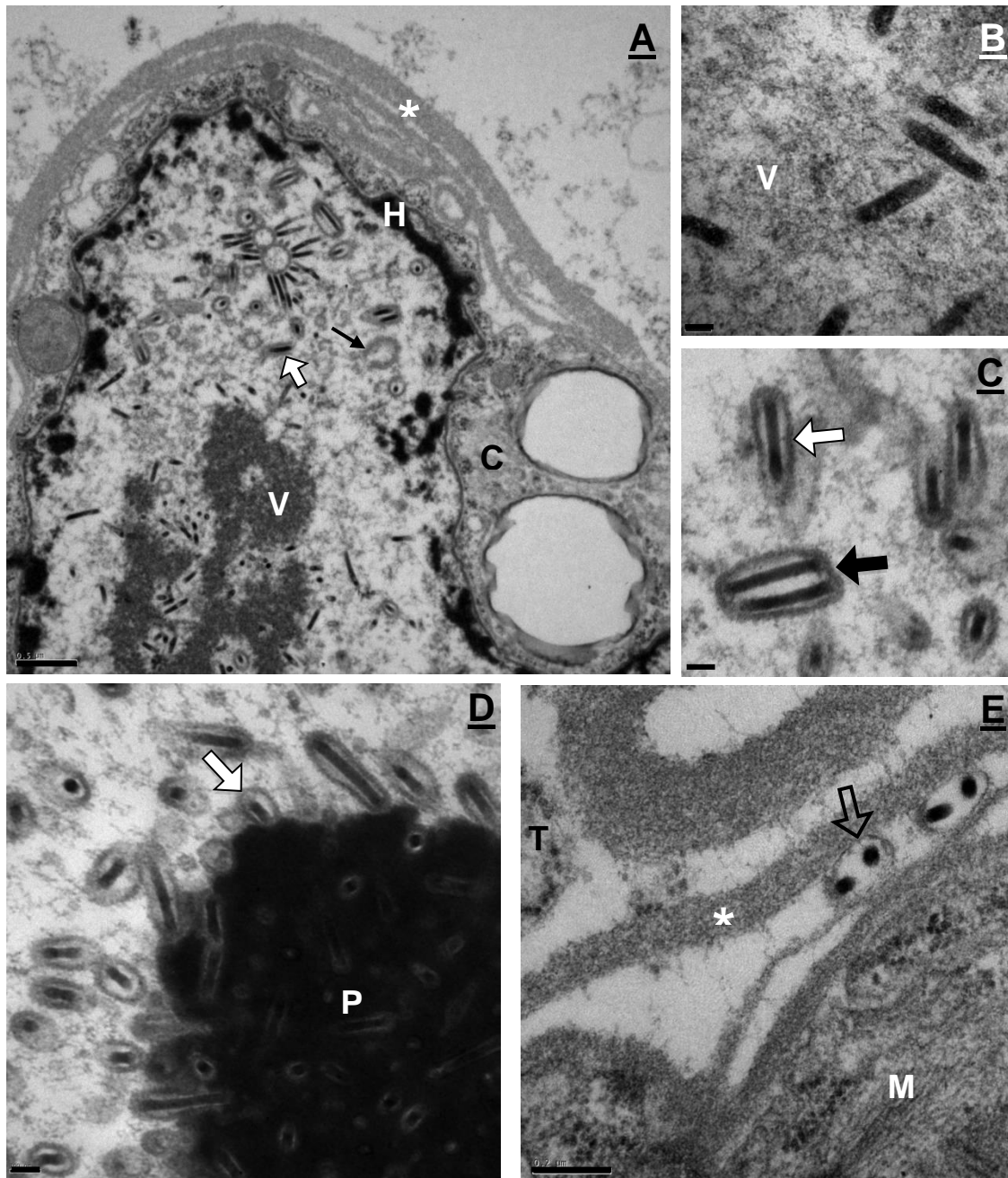


Figura 1 – Eletromicrografias de células traqueais de lagartas híbridas de *B. mori* de 5<sup>o</sup> instar inoculadas com BmMNPV, 4<sup>o</sup> dpi. Em **A**, núcleo hipertrófico com viroplasma (V), nucleocapsídeo (seta branca), heterocromatina periférica (H), citoplasma (C), microvesículas (seta fina) e lâmina basal (\*); 0,5  $\mu$ m. Em **B** e **C**, detalhes dos nucleocapsídeos sem envelope no viroplasma (V) e envelopados com um (seta branca) e dois nucleocapsídeos (seta preta) por envelope, respectivamente; 0,2  $\mu$ m. Em **D**, poliedro em formação no núcleo, notar os nucleocapsídeos envelopados (seta branca) que se agregam na matriz proteica de poliedrina (P); 1  $\mu$ m. Em **E**, vírions (seta vazada) na lâmina basal (\*), traqueia (T) e citoplasma da célula muscular (M); 0,2  $\mu$ m.

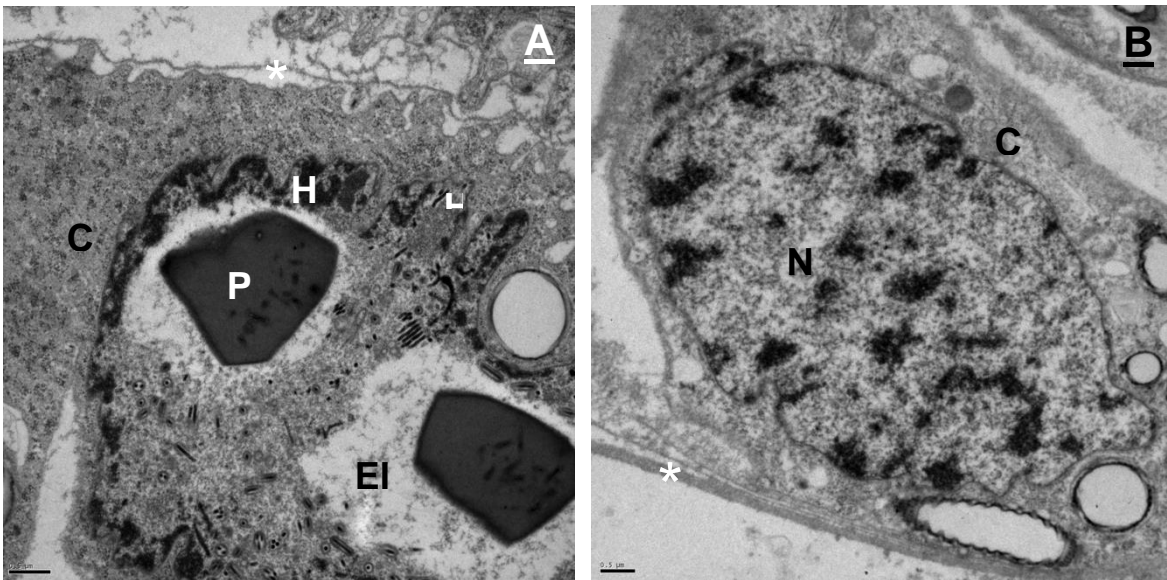


Figura 2 – Eletromicrografias de células traqueais de lagartas híbridas de *B. mori* de 5<sup>o</sup> instar. Em **A**, inoculado com BmMNPV, 7<sup>o</sup> dpi, poliedros maduros (P) no núcleo hipertrófico, heterocromatina periférica (H), citoplasma (C), regiões eletrón-lucentes (EI) e lâmina basal (\*); 0,5 µm. Em **B**, controle para comparação, núcleo (N), heterocromatina (H), citoplasma e lâmina basal (\*); 0,5 µm.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. R and McCLINTOCK, J. T. 1991. Baculoviridae. Nuclear Polyhedrosis Viruses. Part 1. Nuclear Polyhedrosis Viruses of Insects. In: Atlas of Invertebrate Viruses (Adams JR and Bonami JR, eds.). CRC Press, Florida, p. 89-180.
- BAGGIO, M. P, RIBEIRO, L. F, VESSARO-SILVA, S. A and BRANCALHÃO, R. M. 2014. *Bombyx mori* pylorus infection by Alphabaculovirus Genet Mol Res. Apr 3;13(AOP). [Epub ahead of print]
- BARRETT, J. W, BROWNRIGHT, A. J, PRIMAVERA, M. J and PALLI, S. R. 1998. Studies of the nucleopolyhedrovirus infection process in insects by using the green fluorescence protein as a reporter. Jour of Virol. 72: 3377-3382.
- BERRETTA, M. F, FERRELLI, L.M, SALVADOR, R, SCIOCCO, A and ROMANOWSKI, V. 2013. Baculovirus Gene Expression. In: Current Issues in Molecular Virology - Viral Genetics and Biotechnological Applications. Argentina, p. 57-78.
- BRANCALHÃO, R. M. C. 2002. Vírus entomopatogênicos no bicho-da-seda. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. 54-58.
- BRANCALHÃO, R. M. C, TORQUATO, E. F. B and CASTRO, M. E. B. 2002a. Identificação de um isolado de *Bombyx mori* multiple nucleopolyhedrovirus (BmMNPV) no Estado do Paraná, Brasil. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. 6-13.
- BRANCALHÃO, R. M. C, SOUZA, V. B. V and SOARES, M.A.M. 2002b. Infecção causada por Nucleopolyhedrovirus nas células gordurosas de *Bombyx mori* L., 1758 (LEPIDOPTERA: BOMBYCIDAE). Arq. Inst. Biol. 69: 57-63.
- BRANCALHÃO, R. M. C, TORQUATO, E. F. B and FERNANDEZ, M. A. 2009. Cytopathology of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) silk gland caused by multiple nucleopolyhedrovirus. Genet. Mol. Res. 8: 162-172.
- BRANCALHÃO, R. M. C and RIBEIRO, L. F. C. 2003. Cytopathology of BmNPV infection in the integument of *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar. 6: 15-20.
- CARPENTIER, D. C. J, GRIFFITHS, C. M and KING, L. A. 2008. The baculovirus P10 protein of *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus forms two distinct cytoskeletal-like structures and associates with polyhedral occlusion bodies during infection. Virology. 371: 278 – 291.
- CHENG, R. L, XU, Y. P, and ZHANG, C. X. Genome Sequence of a *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus Strain with Cubic Occlusion Bodies. 2012. J. Virol. 86: 10245.
- DAIMON, T, KATSUMA, S, KANG, W, SHIMADA, T 2006. Comparative studies of

*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus chitinase and its host ortholog, BmChi-h. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345: 825-833.

ENGELHARD, E. K, KAM MORGAN, L. N. W, WASHBURN, J. O and VOLKMAN, L. E. 1994. The insect tracheal system: A conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 91: 3224-3227.

FAN, Q, LI, S, WANG, L, ZHANG, B, YE, B and ZHAO, Z. 2007. The genome sequence of the multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus of the Chinese oak silkworm *Antheraea pernyi*. *Virology.* 366: 304-315.

FLIPSEN, J. T. M, MARTENS, J. W. M, VAN OERS, M. M, VLAK, J. M and VAN LENT, J. W. M. 1995. Passage of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus through the Midgut Epithelium of *Spodoptera exigua* Larvae. *Virology.* 208: 328-335.

GONG, C. L and LU, K. M. 1993. Study on the nuclear polyhedrosis virus with tetragonal polyhedron. *Canye Kexue* 19:25–31.

GRANADOS, C. F and LAWLER, K. 1981. A. In vitro pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. *Virology.* 108: 297-308.

GRANADOS, R. R and WILLIAMS, K. A. 1986. In vivo infection and replication of baculovirus. In: GRANADOS, R. R.; FEDERICI, B. A. (Eds.) *The biology of baculoviruses.* Florida: CRC Press. 1: 89-108.

HANADA, Y and WATANABE, J. K. 1986. *Manual de criação do bicho-da-seda.* Curitiba, Cocamar, p. 224.

HONG, H. K, WOO, S. D, CHOI, J. Y, LEE, H. K, KIM, M. H, JE, Y. H and KANG, S. K. 2000. Characterization of four isolates of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Arch. Virol.* 145: 2351-2361.

KARNOVSKY, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27.

KATSUMA, S, NOGUCHI, Y, SHIMADA, T and NAGATA, M. 1999. Molecular characterization of baculovirus *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus polyhedron mutants. *Arch. Virol.* 144: 1275-1285.

KIRKPATRICK, B. A, WASHBURN, J. O, ENGELHARD, E. K and VOLKMAN, L. E. 1994. Primary infection of insect tracheae by *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. *Virology.* 203: 184-186.

KHURAD, A.M, MAHULIKAR, A, RATHOD, M. K, RAI, M. M, KANGINAKURU, S and NAGARAJU, J. 2004. Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in the silkworm, (*Bombyx mori* L.). *J. Invertebr. Pathol.* 87: 8–15.

LIANG, X, LU, Z-L, WEI, B-X, FENG, J-L, QU, D and LUO, T. R. 2013. Phylogenetic

analysis of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus polyhedrin and p10 genes in wild isolates from Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. *Virus Genes*. 46: 140-151.

NAKAZAWA, H, TSUNEISHI, E, PONNUVEL, K. M and FURUKAWA, S 2004. Antiviral activity of a serine protease from the digestive juice of *Bombyx mori* larvae against nucleopolyhedrovirus. *Virology*. 321: 154-162.

NAGARAJU, J. 2000. Recent advances in molecular genetics of the silk moth, *Bombyx mori*. *Curr. Sci*. 78: 151-161.

OHKAWA, T, MAJIMA, K and MAEDA, S.1994. A cysteine protease encoded by the baculovirus *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol*. 68: 6619-6625.

PANUCCI-FILHO, L, CHIAU, A.V and PACHECO, V. 2011. Custo da sericultura: A produção de casulos de Bicho-da-Seda no Paraná. *Rama*. 4: 37-55.

PASSARELLI, A. L. 2011. Barriers to success: how baculoviruses establish efficient systemic infections. *Virology*. 411: 383-392

PEREIRA, E. P, CONTE, H, RIBEIRO, L. F. C, ZANATTA, D. B, BRAVO, J. P, FERNANDEZ, M. A and BRANCALHÃO, R. M. C. 2008. Cytopathological process by multiple Nucleopolyhedrovirus in the testis of *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). *J. Invertebr. Pathol*. 99: 1-7.

PEREIRA, N. C, MUNHOZ, R.E.F, BIGNOTTO, T.S, BESPALHUK, R, GARAY, L.B, SAEZ, C.R.N, FASSINA, V.A, NEMBRI, A and FERNANDEZ, M.A. 2013. Biological and molecular characterization of silkworm strains from the Brazilian germplasm bank of *Bombyx mori*. *Genet. Mol. Res*. 12: 2138-2147.

PONNUVEL, K. M, NAKAZAWA, H, FURUKAWA, S and ASAOKA, A 2003. A lipase isolated from the silkworm *Bombyx mori* shows antiviral activity against nucleopolyhedrovirus. *J. Virol*. 77: 10725-10729.

PORTO, A. J, OKAMOTO, F, CUNHA, E. A and OTSUK, I. P. 2004. Caracterização de oito raças do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.). *Ciência Rural*. 34.

POTRICH, M, ALVES, L. F. A, BRANCALHÃO, R. M. C and DALCIN, G. 2007. Entomopatógenos associados a lagartas de *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) no Estado do Paraná. *Arq. Inst. Biol*. 74: 363-367.

QIN, L, XIA, H, SHI, H, ZHOU, Y, CHEN, L, YAO, Q, LIU, X, FENG, F, YUAN, Y and CHEN, K. 2012. Comparative proteomic analysis reveals that caspase-1 and serine protease may be involved in silkworm resistance to *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J. Proteomics*. 75: 3630-3638.

RAHMAN, M. M and GOPINATHAN, K. P. 2003. *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus based surface display system for recombinant proteins. *J. Gen. Virol*. 84: 2023-31.

RAHMAN, M. M and GOPINATHAN, K. P. 2004. Systemic and in vitro infection

process of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Virus Res.* 101: 109-118.

REDDY, J. T. and LOCKE, M 1990. The size limited penetration of gold particles through insect basal lamina. *J. Insect. Physiol.* 36: 397-407.

REYNOLDS, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17: 208-212.

RIBEIRO, L. F. C, ZANATTA, D. B, BRAVO, J. P, BRANCALHÃO, R. M. C and FERNANDEZ, M. A. 2009a. Molecular markers in commercial *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) hybrids susceptible to multiple nucleopolyhedrovirus. *Genet. Mol. Res.* 8: 144-153.

RIBEIRO, L. F. C, BRANCALHÃO, R. M. C, TORQUATO, E. F. B and FERNANDEZ, M. A. 2009b. Susceptibility of the *Bombyx mori* cardia cells to Nucleopolyhedrovirus, multiple subgroup, BmMNPV. *J. Invert. Pathol.* 100: 195–198.

ROHRMANN, G. F. 2013. *Baculovirus Molecular Biology*. 3 ed. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); NCBI

SABBAG, O. J, NICODEMO, D and OLIVEIRA, J. E. M. 2013. Custos e viabilidade econômica da produção de casulos do bicho-da-seda. *Pesq. Agropec. Trop.*43: 187-194.

SATADAL, C, SUMAN DEB, A. K, SAHA, N, HAZRA, B and BINDROO, B. B. 2012. Dimorphism in nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) (Family: Baculoviridae) causing grasserie disease in silkworm (*Bombyx mori* L.): light and electron microscopy and proteina profile. *Biol. Res.* 14: 176-186.

SENGUPTA, K, KUMAR, P, BAIG, M, and GOVINDAIAH. 1990. *Handbook on pest and disease control of Mulberry and Silkworm*. Bangkok, Thailand: UNESCAP (United Nations Economic and Social Commission for Asia and the Pacific).

SLACK, J and ARIF, B.M. 2007. The baculoviruses occlusion-derived virus: virion structure and function. *Adv Virus Res.* 69: 99–165.

SOARES, J. S and RIBEIRO, B. M.2005. Pathology of *Anticarsia gemmatalis* larvae infected by two recombinant *A. gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedroviruses. *Res. Microbiol.* 156: 263-269.

SPURR, A. R. 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26: 31-43.

TAKAHASHI, R, TAKAHASHI, M.K and TAKAHASHI, L.S. 2009. *Sericultura: uma promissora exploração agropecuária*. Jaboticabal: Funep, 135p.

TORQUATO, E. F. B, MIRANDA-NETO, M. H. M and BRANCALHÃO, R. M. C. 2006a Nucleopolyhedrovirus Infected Central Nervous System Cells of *Bombyx mori* (L.) (Lepidoptera: Bombycidae). *Neotrop. Entomol.* 35: 070-074.



TORQUATO, E. F. B, MIRANDA-NETO, M. H. M, BRANCALHÃO, R. M. C and FRANCO, V. S. 2006b Nucleopolyhedrovirus: técnica de microscopia eletrônica de varredura. Neotrop. Entomol. 35: 787-790.

VAN OERS, M. M and VLAK, J. M. 1997. The baculovirus 10-kDa protein. J Invertebr Pathol, 70: 1-17.

WASHBURN, J.O, TRUDEAU, D, WONG, J.F and VOLKMAN, L.E, 2003. Early pathogenesis of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus and *Helicoverpa zea* single nucleopolyhedrovirus in *Heliothis virescens*: a comparison of the 'M' and 'S' strategies for establishing fatal infection. J. Gen. Virol. 84, 343–351.

YAO, Q, LI, M. W, WANG, Y and WANG, W. B.2003. Screening of molecular markers for NPV resistance in *Bombyx mori* L. (Lep., Bombycidae). J. Appl. Entomol. 127: 134-136.

**ANEXO 1:**

**Normas da Revista Anais da Academia Brasileira de Ciências**

## Instruções aos autores

### Revisadas em dezembro de 2007

A revista ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS encoraja fortemente as submissões online. Uma vez o artigo preparado de acordo com as instruções abaixo, visite o site de submissão online ( <http://aabc.abc.org.br/>).

As instruções devem ser lidas cuidadosamente e seguidas integralmente. Desta forma, a avaliação e publicação de seu artigo poderão ser feitas com mais eficiência e rapidez. Os editores reservam-se o direito de devolver artigos que não estejam de acordo com estas instruções. Os artigos devem ser escritos em inglês claro e conciso.

### Objetivo e Política Editorial

Todos os artigos submetidos devem conter pesquisa original e ainda não publicada ou submetida para publicação. O primeiro critério para aceitação é a qualidade científica. O uso excessivo de abreviaturas ou jargões deve ser evitado, e os artigos devem ser compreensíveis para uma audiência tão vasta quanto possível. Atenção especial deve ser dada ao Abstract, Introdução e Discussão, que devem nitidamente chamar a atenção para a novidade e importância dos dados relatados. A não observância desta recomendação poderá resultar em demora na publicação ou na recusa do artigo.

Os textos podem ser publicados como uma revisão, um artigo ou como uma breve comunicação. A revista é trimestral, sendo publicada nos meses de março, junho, setembro e dezembro.

### Tipos de Artigos

**Revisões:** Revisões são publicadas somente a convite. Entretanto, uma revisão pode ser submetida na forma de breve carta ao Editor a qualquer tempo. A carta deve informar os tópicos e autores da revisão proposta e declarar a razão do interesse particular do assunto para a área.

**Artigos:** Sempre que possível, os artigos devem ser subdivididos nas seguintes partes: 1. Página de rosto; 2. Abstract (escrito em página separada, 200 palavras ou menos, sem abreviações); 3. Introdução; 4. Materiais e Métodos; 5. Resultados; 6. Discussão; 7. Agradecimentos quando necessário; 8. Resumo e palavras-chave (em português - os autores estrangeiros receberão assistência); 9. Referências. Artigos de algumas áreas, como Ciências Matemáticas, devem observar seu formato usual. Em certos casos pode ser aconselhável omitir a parte (4) e reunir as partes (5) e (6). Onde se aplicar, a parte de Materiais e Métodos deve indicar o Comitê de Ética que avaliou os procedimentos para estudos em humanos ou as normas seguidas para a manutenção e os tratamentos experimentais em animais.

**Breves Comunicações:** Breves comunicações devem ser enviadas em espaço duplo. Depois da aprovação não serão permitidas alterações no artigo, a fim de que somente correções de erros tipográficos sejam feitas nas provas.

Os autores devem enviar seus artigos somente em versão eletrônica.

### Preparo dos Artigos

Os artigos devem ser preparados em espaço duplo. Depois de aceitos nenhuma modificação será realizada, para que nas provas haja somente correção de erros tipográficos.

**Tamanho dos artigos:** Embora os artigos possam ter o tamanho necessário para a apresentação concisa e discussão dos dados, artigos sucintos e cuidadosamente preparados têm preferência tanto em termos de impacto quando na sua facilidade de leitura.

**Tabelas e ilustrações:** Somente ilustrações de alta qualidade serão aceitas. Todas as ilustrações serão consideradas como figuras, inclusive desenhos, gráficos, mapas, fotografias e tabelas com mais de 12 colunas ou mais de 24 linhas (máximo de figuras gratuitas: cinco figuras). A localização provável das figuras no artigo deve ser indicada.

**Figuras digitalizadas:** As figuras devem ser enviadas de acordo com as seguintes especificações: 1. Desenhos e ilustrações devem ser em formato .PS/.EPS ou .CDR (Postscript ou Corel Draw) e nunca inseridas no texto; 2. Imagens ou figuras em meio tom devem ser no formato .TIF e nunca inseridas no texto; 3. Cada figura deve ser enviada em arquivo separado; 4. Em princípio, as figuras devem ser submetidas no tamanho em que devem aparecer na revista, i.e., largura de 8 cm (uma coluna) ou 12,6 cm (duas colunas) e com altura máxima para cada figura menor ou igual a 22 cm. As legendas das figuras devem ser enviadas em espaço duplo e em folha separada. Cada dimensão linear das menores letras e símbolos não deve ser menor que 2 mm depois da redução. Somente figuras em preto e branco serão aceitas. 5. Artigos de Matemática, Física ou Química podem ser digitados em

Tex, AMS-TeX ou Latex; 6. Artigos sem fórmulas matemáticas podem ser enviados em .RTF ou em WORD para Windows.

**Página de rosto:** A página de rosto deve conter os seguintes itens: 1. Título do artigo (o título deve ser curto, específico e informativo); 2. Nome (s) completo (s) do (s) autor (es); 3. Endereço profissional de cada autor; 4. Palavras-chave (4 a 6 palavras, em ordem alfabética); 5. Título abreviado (até 50 letras); 6. Seção da Academia na qual se enquadra o artigo; 7. Indicação do nome, endereço, números de fax, telefone e endereço eletrônico do autor a quem deve ser endereçada toda correspondência e prova do artigo.

**Agradecimentos:** Devem ser inseridos no final do texto. Agradecimentos pessoais devem preceder os agradecimentos a instituições ou agências. Notas de rodapé devem ser evitadas; quando necessário, devem ser numeradas. Agradecimentos a auxílios ou bolsas, assim como agradecimentos à colaboração de colegas, bem como menção à origem de um artigo (e.g. teses) devem ser indicados nesta seção.

**Abreviaturas:** As abreviaturas devem ser definidas em sua primeira ocorrência no texto, exceto no caso de abreviaturas padrão e oficial. Unidades e seus símbolos devem estar de acordo com os aprovados pela ABNT ou pelo Bureau International des Poids et Mesures (SI).

**Referências:** Os autores são responsáveis pela exatidão das referências. Artigos publicados e aceitos para publicação (no prelo) podem ser incluídos. Comunicações pessoais devem ser autorizadas por escrito pelas pessoas envolvidas. Referências a teses, abstracts de reuniões, simpósios (não publicados em revistas indexadas) e artigos em preparo ou submetidos mas ainda não aceitos, podem ser citados no texto como (Smith et al. unpublished data) e não devem ser incluídos na lista de referências.

As referências devem ser citadas no texto como, por exemplo, (Smith 2004), (Smith and Wesson 2005) ou, para três ou mais autores, (Smith et al. 2006). Dois ou mais artigos do mesmo autor no mesmo ano devem ser distinguidos por letras, e.g. (Smith 2004a), (Smith 2004b) etc. Artigos com três ou mais autores com o mesmo primeiro autor e ano de publicação também devem ser distinguidos por letras.

As referências devem ser listadas em ordem alfabética do primeiro autor sempre na ordem do sobrenome XY no qual X e Y são as iniciais. Se houver mais de 10 autores, use o primeiro seguido de et al. As referências devem ter o nome do artigo. Os nomes das revistas devem ser abreviados. Para as abreviações corretas, consultar a listagem de base de dados na qual a revista é indexada ou consulte a World List of Scientific Periodicals. A abreviatura para os Anais da Academia Brasileira de Ciências é An Acad Bras Cienc. Os seguintes exemplos são considerados como guia geral para as referências.

#### *Artigos*

Albe-Fessard D, Condes-Lara M, Sanderson P and Levante A . 1984a. Tentative explanation of the special role played by the áreas of paleospinothalamic projection in patients with deafferentation pain syndromes. *Adv Pain Res Ther* 6: 167-182.

Albe-Fessard D, Sanderson P, Condes-Lara M, Delandsheer E, Giuffrida R and Cesaro P. 1984b. Utilisation de la depression envahissante de Leão pour l'étude de relations entre structures centrales. *An Acad Bras Cienc* 56: 371-383.

Knowles RG and Moncada S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298: 249-258.

Pinto ID and Sanguinetti YT. 1984. Mesozoic Ostracode Genus Theriosynoecum Branson, 1936 and validity of related Genera. *An Acad Bras Cienc* 56: 207-215.

#### *Livros e capítulos de livro*

Davies M. 1947. An outline of the development of Science, Athinker's Library, n. 120. London: Watts, 214 p.

Prehn RT . 1964. Role of immunity in biology of cancer. In: National Cancer Conference , 5., Philadelphia Proceedings ....., Philadelphia: J.B. Lippincott, p. 97-104.

Uytenbogaardt W and Burke EAJ . 1971. Tables for microscopic identification of minerals, 2 nd ed., Amsterdam: Elsevier, 430 p.

Woody RW . 1974. Studies of theoretical circular dichroism of Polipeptides: contributions of B-turns. In: Blouts ER et al . (Eds), Peptides, polypeptides and proteins, New York: J Wiley & Sons, New York, USA, p. 338-350.

*Outras publicações*

International Kimberlite Conference , 5, 1991. Araxá, Brazil. Proceedings ... Rio de Janeiro: CPRM, 1994., 495 p.

Siatycki J . 1985. Dynamics of Classical Fields. University of Calgary, Department of Mathematics and Statistics, 19985, 55 p. Preprint n. 600.