

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

MARILUCIA SANTORUM

**INFECÇÃO DE CÉLULAS DA AMPOLA DOS TÚBULOS DE MALPIGHI
DE *Bombyx mori* PELO *ALPHABACULOVIRUS***

CASCAVEL-PR
(FEVEREIRO/2015)

MARILUCIA SANTORUM

**INFECÇÃO DE CÉLULAS DA AMPOLA DOS TÚBULOS DE MALPIGHI
DE *Bombyx mori* PELO ALPHABACULOVIRUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto 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 a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

Área de concentração: Biologia, processo saúde-doença e políticas de saúde

Prof^a. Dr^a. Orientador (a): Rose Meire Costa Brancalhão

Prof^a. Dr^a. Co-orientador (a): Célia Cristina Leme Beu

CASCADEL-PR
(FEVEREIRO/2015)

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S232i

Santorum, Marilucia

Infecção de células da ampola dos túbulos de Malpighi de *Bombyx mori* pelo *Alphabaculovirus*. / Marilucia Santorum. Cascavel, PR: UNIOESTE, 2015.

74 p.

Orientador^a: Prof^a. Dr^a. Rose Meire Costa Brancalhão

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Célia Cristina Leme Beu

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.

1. Bicho-da-seda. 2. BmNPV. 3. Lepidoptera. 4. *Baculoviridae*.
I. Brancalhão, Rose Meire Costa. II. Beu, Célia Cristina Leme. III. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. IV. Título.

CDD 21.ed. 660.6

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio CRB-9^o/965

FOLHA DE APROVAÇÃO

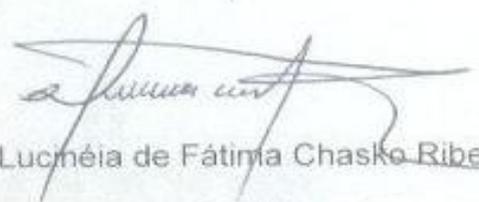
MARILUCIA SANTORUM

**INFECÇÃO DE CÉLULAS DA AMPOLA DOS TÚBULOS DE
MALPIGHI DE *BOMBYX MORI* PELO *ALPHABACULOVIRUS***

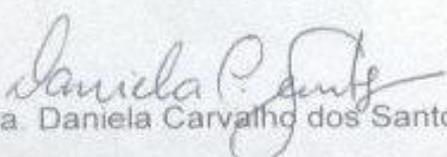
Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.


Orientador: Prof^ª. Dra. Rose Meire Costa Brancalhão

UNIOESTE


Prof^ª. Dra. Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro

UNIOESTE


Prof^ª. Dra. Daniela Carvalho dos Santos

UNESP

CASCADEL-PR

(fevereiro/2015)

Ao meu amado esposo Junior Cesar Luna.

Aos meus pais, Emílio e Lucia Santorum.

Aos meus irmãos Marildo, Mauro e Márcia Santorum.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, o qual nunca me abandonou e sem o qual não teria chego até aqui. Por ouvir minhas orações, apesar de muitas vezes não ser digna de tal amor e misericórdia, me levantado nas horas mais difíceis, me dando condições físicas, psicológicas e espirituais para prosseguir e realizar esse trabalho.

À minha orientadora Profa. Dra. Rose Meire Costa Brancalhão, por me receber no laboratório, me aceitando como orientada, mesmo sem conhecer o meu trabalho. Agradeço seu apoio em todas as etapas da pesquisa, desde a parte experimental até a elaboração da dissertação e artigo. Sou grata pela paciência que teve em repassar seu imenso conhecimento, e pelos sábios conselhos. Só tenho a lhe agradecer, pois, seus ensinamentos enriqueceram muito minha vida acadêmica.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Célia, pelo tempo e paciência que dedicou às nossas leituras de artigos e normas juntas e nas correções da dissertação e artigo.

Às Profas. Dra. Lucinéia e Dra. Ednéia, pesquisadoras do LABEF. À prof Lu pelo apoio nas coletas até mesmo nos feriados, sendo sempre paciente e prestativa em repassar sua experiência, sanando minhas mais variadas dúvidas. E a prof Néia por ter aceitado ser minha supervisora no estágio em docência, com paciência em ajudar-me com os conteúdos.

À UNIOESTE, e ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde pela oportunidade e infraestrutura, a CAPES pelo apoio financeiro para realização do trabalho. À Graselha, aos coordenadores, e aos professores, os quais ministraram disciplinas que contribuiram muito para meu crescimento profissional. Também às instituições UNESP e UEM, pela parceria com a realização de parte do experimento.

Ao meu esposo Junior, por estar sempre ao meu lado, me apoiando nas mais difíceis decisões. Por ter paciência em despender seu tempo, nesta fase tão conturbada a ele também, ouvindo, por horas, meus desabafos. E quando eu pensava não ser mais capaz de continuar, sempre me animava com suas

palavras e abraços confortantes, além das inúmeras orações feitas juntos, as quais foram cruciais para a conquista desse sonho.

Aos meus pais Emílio e Lucia, pelo apoio e força em todas as etapas de minha vida e sem os quais eu não teria conseguido chegar até aqui. Pelas horas no telefone me ouvindo e aliviando minhas preocupações com suas palavras de fé em Deus e pelas valiosas orações feitas diariamente pela minha mãezinha.

A minha irmã e amiga Márcia, por todo o apoio e incentivo. Sempre me aconselhando e me acalmando quando as dificuldades me deixavam angustiada e ansiosa. Incentivando-me a vencer todos os meus medos. Aos meus irmãos, Marildo e Mauro os quais, apesar de muitas vezes longe, também sempre tiveram presentes em todas as etapas de minha vida, mostrando-me que a família é tudo na vida de alguém. Amo vocês.

A todos os amigos e familiares pelas orações e momentos de distração. Em especial Jacinta, Márcia, Maria, Adriana, Claudia, Carla, Angélica, Bruna, Polyana, Lucas, Paulinho e Camila e Jéssica do Laboratório de Botânica.

À Celeste, sempre prestativa a ajudar com o processamento histológico e a rotina do LABEF.

A todos os colegas do LABEF: Re, Jheni, Lizy, Ani, Keli, Alana, Vini, Jéssica, Camila, Ana, Gustavo e as três Julianas. Também agradeço a todos os colegas e amigos que já não estão mais no LABEF, mas que já fizeram parte desta etapa de minha vida e os quais são sempre lembrados com carinho: Sóste, Jé, Thiago, Bruno, Drika, Welington e em especial a Mayarha, amiga que me auxiliou principalmente no começo desse trabalho. Agradeço a todos pelo auxílio ofertado na realização desta pesquisa, conversas e risadas. E como não agradecer de forma especial a Ju Souza, com sua facilidade para desenhos, me auxiliando assim, no esquema do TM. Enfim a ajuda de todos do LABEF foi muito importante.

A todos os incríveis colegas de mestrado que conheci e desenvolvi grande admiração. A amizade formada e que hoje transcende para além da vida de mestrandos e espero que se fortaleça com os anos.

As Profas. Dras. Daniela e Lucinéia por aceitarem participar da banca examinadora do nosso trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento desta etapa importante do meu projeto de vida.

RESUMO GERAL

Bombyx mori nucleopolyhedrovirus (BmNPV) é um vírus entomopatogênico da família *Baculoviridae*, gênero *Alphabaculovirus*, que infecta o bicho-da-seda, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) e causa a doença poliedrose nuclear. Um isolado geográfico viral do BmNPV foi identificado no estado do Paraná, Brasil, e uma série de órgãos e tecidos alvos foram identificados, porém não há informações sobre a infecção dos túbulos de Malpighi (TM). Os TM compõem o sistema excretor de *B. mori*, atuando na eliminação de substâncias tóxicas e na homeostase hidroeletrólítica. Assim, este estudo objetivou analisar o comportamento referente à susceptibilidade e citopatologia dos TM de *B. mori* ao BmNPV. Para tanto, lagartas híbridas de *B. mori*, 5º instar, foram inoculadas experimentalmente com uma suspensão viral de BmNPV. Em diferentes dias pós-inoculação (dpi), do 4º ao 9º dpi, segmentos dos TM foram coletados, subdivididos nas regiões da ampola, proximal, média e distal; seguindo o processamento para as microscopias de luz e eletrônica de transmissão. Material controle seguiu o mesmo processamento que o inoculado. Os resultados demonstraram que os TM de *B. mori*, apresentaram variação na sua morfologia e susceptibilidade ao BmNPV de acordo com a região analisada. Assim, a região da ampola, na sua área de transição com a proximal, se apresentou susceptível ao BmNPV, a partir do 6º dpi, enquanto as demais regiões não evidenciaram indícios de infecção pelo patógeno. A área de transição é uma pequena região que se localiza ao término da ampola e início da região proximal do TM. A morfologia celular do epitélio de revestimento simples apresentou variação contínua de pavimentoso, característico da ampola, a cilíndrico, na sua área de transição; já na continuidade com a região proximal do TM, esta variação morfológica foi abrupta. A citopatologia revelou no núcleo hipertrófico, o viroplasma, contendo os nucleocapsídeos e os poliedros virais. Ao final do ciclo infeccioso foi verificado a citólise de células infectadas, liberando poliedros no meio extracelular, tanto na hemocele como no lúmen do TM, fator que pode favorecer a transmissão da doença. Assim, a infecção da ampola, na sua área de transição com a região proximal, irá contribuir com um maior conhecimento científico dos aspectos citopatológicos e dos alvos de infecção deste isolado geográfico viral, visando o estabelecimento do seu ciclo infeccioso do BmNPV no corpo do inseto.

Palavras-chave: Bicho-da-seda; BmNPV; Lepidoptera; *Baculoviridae*.

GENERAL ABSTRACT

Bombyx mori nucleopolyhedrovirus (BmNPV) is an entomopathogenic virus *Baculoviridae* family, *Alphabaculovirus* genre, which infects the silkworm, *Bombyx mori* and causes nuclear polyhedrosis disease. A viral geographic isolated from BmNPV was identified in the state of Paraná, Brazil, and a number of organs and target tissues were identified, but there is no information about the infection of Malpighian tubules (MT). MT make up the excretory system of *B. mori*, acting in the elimination of toxic substances and electrolyte homeostasis. This study aimed to analyze the behavior on the susceptibility and cytopathology of MT *B. mori* to BmNPV. Therefore, hybrid *B. mori* caterpillars at 5^o instar, were inoculated experimentally with a viral suspension of BmNPV. On different days post-inoculation (dpi), the 4^o to 9^o dpi, MT segments were collected, divided in regions of the ampullae, proximal, medial and distal; following the processing for light and electron microscopy transmission. Material control followed the same process that the inoculated. The results showed that *B. mori* MT showed variations in their morphology and susceptibility to BmNPV according to the analyzed region. Thus, the region of the ampullae in its transition area to the proximal, appeared susceptible to BmNPV, from 6^o dpi, while other regions showed no evidence of infection by the pathogen. The transition area is a small region which is located at the end of the ampullae and the beginning of the proximal region of MT. The cellular morphology of simple lining epithelium showed continuous variation of pavement, characteristic of the ampullae, the cylindrical, in the transition area; already continuous with the proximal region of MT, this morphological change was abruptly. The cytopathology revealed in hypertrophic nucleus, viroplasm containing the nucleocapsid and viral polyhedra. At the end of the infectious cycle was observed cytolysis of infected cells, releasing polyhedra in the extracellular medium, both in hemocele as in MT lumen, a factor that may favor the transmission of the disease. Thus, infection of the ampullae in its transition area to the proximal region, will contribute to greater scientific knowledge of cytopathology aspects and targets of infection from this virus isolated geographical, for the establishment of its infectious cycle of the insect's body BmNPV .

Keywords: Silkworm; BmNPV; Lepidoptera; *Baculoviridae*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 SERICICULTURA:.....	11
2.2 BOMBYX MORI	14
2.3 TÚBULOS DE MALPIGHI	17
2.4 BACULOVÍRUS.....	25
3. REFERÊNCIAS	34
ARTIGO CIENTÍFICO 1	45
APÊNDICES.....	60
APÊNDICE I	60
APÊNDICE II	60
APÊNDICE III	62
ANEXO 1:.....	63

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CICLO DE VIDA DE <i>BOMBYX MORI</i>	15
FIGURA 2. TÚBULOS DE MALPIGHI DE HEMIPTERO, <i>RHODNIUS PROLIXUS</i>	18
FIGURA 3. VISTA LATERAL DO TUBO DIGESTIVO E TÚBULOS DE MALPIGHI DA LARVA <i>DIATRAEA SACCHARALIS</i>	19
FIGURA 4. TÚBULO DE MALPIGHI DE INSETO.	20
FIGURA 5. PRODUÇÃO E MODIFICAÇÃO DA URINA EM UM INSETO TERRESTRE (<i>SCHISTOCERCA</i>).	22
FIGURA 6. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE UM SISTEMA EXCRETOR GENERALIZADO, QUE MOSTRA O CAMINHO DA ELIMINAÇÃO DOS RESÍDUOS.	22
FIGURA 7. SISTEMA CRIPTONEFRIDIAL	24
FIGURA 8. ESQUEMA MOSTRANDO AS RELAÇÕES ANATÔMICAS ENTRE TÚBULOS DE MALPIGHI E O TUBO DIGESTIVO.	24
FIGURA 9. SECÇÃO CORONAL DO COMPLEXO RETAL.	25
FIGURA 10. POLIEDRO DO BMMNPV.	26
FIGURA 11. CICLO DE INFECÇÃO DO BACULOVÍRUS.	30
FIGURA 12. ESQUEMA DO CICLO DE VIDA DE BACULOVÍRUS CAUSANDO INFECÇÃO SISTÊMICA.	30

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C.: antes de Cristo

AlphaBV: *Alphabaculovirus*

AQPs: aquaporinas

BmMNPV: *Bombyx mori multiple nucleopolyhedrovirus*

BmNPV: *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*

BV: “Budded vírus” ou vírus broto

COPs: Corpos de Oclusão Poliédricos

d.C.: depois de Cristo

DNA: Ácido desoxirribonucléico

dpi: Dia pós infecção

ha: Hectare

kb: Kilo base

kg: quilograma

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

ML: Microscopia de luz

mm: Milímetro

MNPV: *multiple nucleopolyhedrovirus*

nm: Nanômetros

NPV: Nucleopolyhedrovirus ou nucleopoliedrovírus

OB: “Occlusion body”

ODV: “Occlusion derived bodies” ou vírus derivado do poliedro

pH: Potencial de hidrogênio

PRONAF: Programa Nacional de Fortalecimento da Agricultura Familiar

SNPV: *single nucleopolyhedrovirus*

t: tonelada

TM: túbulos de Malpighi

µm: Micrômetros

1. INTRODUÇÃO

A sericicultura é uma importante atividade agroindustrial, de caráter interdisciplinar, que envolve diversas áreas do conhecimento humano, pois sua cadeia produtiva abrange o cultivo da amoreira (*Morus* sp.), a produção e o preparo dos ovos, a criação das lagartas do bicho-da-seda, *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae), a industrialização dos fios de seda, a tecelagem e o comércio da seda (WATANABE; YAMAOKA; BARONI, 2000). No Brasil, a atividade se desenvolve em pequenas propriedades rurais e se utiliza da mão de obra familiar proporcionando, aos produtores, um meio de subsistência. Outro aspecto importante da sericicultura é o baixo impacto ao meio ambiente, já que não se utilizam agrotóxicos nas propriedades produtoras, caso contrário, as lagartas de *B. mori* morreriam intoxicadas (BRANCALHÃO, 2002; DOURADO et al., 2011; PANUCCI-FILHO; CHIAU; PACHECO, 2011; TAKAHASHI, R.; TAKAHASHI, K.; TAKAHASHI, L., 2001).

Dessa forma, a atividade sericícola apresenta sua importância econômica e social e, como relatam Panucci-filho; Chiau; Pacheco (2011), tem influenciado na permanência de famílias nas pequenas propriedades rurais e, com isso, vem influenciando diretamente na diminuição da pobreza, minimizando desigualdades sociais, permitindo e assegurando o contato com a “terra” e a aproximação do ser humano em atividades interdisciplinares de inclusão na sociedade.

Neste sentido, a sericicultura é uma atividade sustentável para o país ao gerar ganhos econômicos, diminuir o êxodo rural e apresentar aspectos ecológicos favoráveis. No estado do Paraná, a atividade está inserida no Programa Nacional de Fortalecimento da Agricultura Familiar (PRONAF), o qual visa o financiamento para o manejo da cultura utilizando como critérios: o uso de mão de obra predominantemente familiar; a renda auferida; bem como o tamanho da propriedade (TSUKAMOTO, 2011).

Entretanto, como relata Tsukamoto (2009), a sericicultura paranaense necessita de melhorias na produção e nas condições de trabalho, sendo uma atividade que exige uma grande jornada de trabalho, pois a colheita das folhas de amoreira requer muito esforço, devendo ser feita mesmo em dias chuvosos, o que dificulta o trabalho no campo, uma vez que as lagartas precisam se alimentar de 3 a 4 vezes ao dia, não podendo faltar o alimento nos intervalos.

Aliado a isso ocorrem outros fatores que podem influenciar a cadeia produtiva da seda, como: baixo valor agregado ao produto no Paraná; espera por resultados de pesquisas que envolvam melhoramento genético de *B. mori*; manejo adequado da criação; dispersão de agrotóxicos, a partir de culturas circunvizinhas; limpeza e desinfecção do ambiente de criação das lagartas, com objetivo de reduzir a ocorrência de doenças que podem ser causadas por protozoários, fungos, bactérias e vírus (BRANCALHÃO, 2002; MARGATHO et al., 2012).

Doenças de etiologia viral levam a perdas consideráveis na produção sericícola (POTRICH et al., 2007). É o caso da poliedrose nuclear causada pelo nucleopoliedrovírus (NPV), que pertence a família *Baculoviridae*, gênero *Alphabaculovirus* (AlphaBV) (ROHRMANN, 2013). A infecção viral afeta o desenvolvimento de *B. mori* com consequências negativas na produção de casulos de seda, pois uma vez doentes, as lagartas não se curam e precisam ser eliminadas, de forma a evitar a transmissão horizontal da doença (LIANG et al., 2013; QIN et al., 2012; SENGUPTA et al., 1990).

O AlphaBV compreende NPV específicos de lepidópteros e são constituídos de DNA circular fita dupla, associado a proteínas do capsídeo, constituindo o nucleocapsídeo. Este é envolto por um envelope membranoso formando o nucleocapsídeo envelopado ou vírion, que pode estar sozinho, ou

seja, um nucleocapsídeo por envelope, “single *nucleopolyhedrovirus*” – SNPV, ou pode ter vários, “multiple *nucleopolyhedrovirus*” – MNPV (ROHRMANN, 2013). Vários autores consideram MNPV mais virulentos que os SNPV e é importante destacar que NPV de mesma espécie podem apresentar variabilidade genética de acordo com a região geográfica, fator contribuinte para sua virulência (ADAMS; McCLINTOCK 1991; FAN; WANG; ZHANG, 2007; HONG et al., 2000; LIANG et al., 2013).

Nos AlphaBV vários nucleocapsídeos envelopados são agrupados em um corpo de oclusão protéico ou poliedro, que confere proteção aos vírions, em especial, contra as condições adversas do meio ambiente (IKEDA et al., 2013; JEHLE et al., 2006; LIANG et al., 2013; ROHRMANN, 2013).

O ciclo infeccioso dos AlphaBV tem sido estudado em inúmeros insetos (ADAMS; McCLINTOCK, 1991), tais como *B. mori* (BAGGIO et al., 2014; BRANCALHÃO, 2002; BRANCALHÃO; SOUZA; SOAREZ, 2002; BRANCALHÃO; TORQUATO; FERNANDEZ, 2009; PEREIRA et al., 2008; RIBEIRO et al., 2009; VESSARO-SILVA et al., 2014). No Paraná, um isolado geográfico do vírus *Bombyx mori Multiple Nucleopolyhedrovirus* (BmMNPV) foi obtido de lagartas de *B. mori* (BRANCALHÃO, 2002), contendo tanto nucleocapsídeos envelopados únicos, como múltiplos.

Este vírus é poliorganotrófico e vários são os órgãos e tecidos alvos, tais como o gorduroso (BRANCALHÃO; SOUZA; SOAREZ, 2002), o tegumentar (BRANCALHÃO; RIBEIRO, 2003), o nervoso (TORQUATO; MIRANDA-NETO; BRANCALHÃO, 2006), o sistema reprodutor masculino (PEREIRA et al., 2008), a região da cárdia (RIBEIRO et al., 2009) e as regiões média e posterior da glândula da seda, porém sua porção anterior não apresentou infecção (BRANCALHÃO; TORQUATO; FERNANDEZ, 2009). Em estudo com o piloro, região está que faz transição entre intestino médio e posterior, foi verificado a infecção de uma de suas subdivisões frente ao BmNPV (BAGGIO et al., 2014). Também o intestino posterior apresentou comportamento diferenciado, pois apenas as células do canal anal foram susceptíveis ao vírus (VESSARO-SILVA et al., 2014). Já em um estudo realizado com a glândula salivar não revelou indícios de infecção pelo vírus (DOURADO et al., 2011).

No entanto, no que concerne aos túbulos de Malpighi (TM), responsáveis pela eliminação de substâncias tóxicas e que auxiliam na homeostase hidroeletrólítica da hemolinfa, poucos são os estudos referentes ao seu comportamento mediante infecção por baculovírus. Recentemente, Chakrabarty et al. (2012), demonstraram que células do TM de *B. mori* são infectadas pelo BmNPV. Cordeiro et al. (2008), evidenciaram que o TM de *Anticarsia gemmatalis*, inseto que também pertence à ordem Lepidoptera, sofre degeneração precoce quando infectados por recombinante de baculovírus, porém sem indícios de infecção no núcleo das células. Também outros autores destacam a ocorrência de degeneração precoce do TM, sem vestígios morfológicos da infecção por baculovírus no tecido de insetos (FLIPSEN et al., 1995; SOARES; RIBEIRO, 2005).

Assim, as grandes perdas causadas pela infecção viral reforçam a necessidade do desenvolvimento de pesquisas científicas sobre a patologia viral, bem como estudos moleculares e genéticos que auxiliem na busca por insetos resistentes, conservando a produção animal e a manutenção da cadeia produtiva da seda (FERNANDEZ et al., 2005). Frente a essa realidade, o grupo de pesquisa da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, tem buscado estabelecer o ciclo infeccioso do BmNPV em lagartas de *B. mori* e, neste sentido, considerando que a literatura não apresenta dados da ação deste isolado geográfico viral sobre o principal órgão do sistema excretor dos insetos, o TM, o conhecimento da sua susceptibilidade, bem como sua citopatologia, irá trazer sua contribuição científica, principalmente no estabelecimento do ciclo infeccioso deste importante vírus entomopatogênico.

A presente dissertação originou o artigo científico intitulado: “Infecção de células da ampola dos túbulos de Malpighi de *Bombyx mori* pelo *Alphabaculovirus*” (Artigo 1), submetido à Revista Journal of Invertebrate Pathology, cujas normas são apresentadas no anexo 1.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O presente estudo aborda a infecção causada por vírus entomopatogênico em um inseto de importância econômica e, assim, contempla temas de virologia e entomologia, explorando aspectos sociais e econômicos.

No auxílio à compreensão do assunto, o texto foi organizado em tópicos, apresentados a seguir:

2.1 SERICICULTURA:

A sericicultura é uma importante atividade agroindustrial, sendo uma das mais antigas na história da humanidade. Esta abrange o cultivo da amoreira (*Morus* sp.) e a criação do bicho-da-seda, que se alimenta exclusivamente das folhas dessa planta e produzem os fios de seda que, então, são destinados a indústria têxtil para confecção de diferentes tipos de tecidos. Sendo *B. mori* responsável por 95% da produção comercial total de fios de seda (WATANABE; YAMAOKA; BARONI, 2000; ZANETTI, 2007).

B. mori é originário da China a partir de seu ancestral selvagem *Bombyx mandarina* (DINGLE et al., 2005) e segundo a história, a atividade iniciou-se a aproximadamente 4500 a.C. pela esposa do imperador Hwang-Te, a imperatriz Hsi-Ling-Chi, que proporcionou, aos sábios da época, formas de estudar e controlar o ciclo do bicho-da-seda, matando os adultos antes de emergirem de

seus casulos, tecendo os fios produzidos. O povo chinês dominou a arte da produção de seda por mais de 3000 anos e, tendo consciência da importância econômica da sericicultura ameaçavam com castigos severos, como a pena de morte, a quem tentasse contrabandear o bicho-da-seda, as sementes de amoreira ou revelar os segredos da produção de seda (WATANABE; YAMAOKA; BARONI, 2000; ZANETTI, 2007).

Apenas por volta do ano 1000 a.C., através das relações comerciais da China com outros países e a imigração dos chineses é que a sericicultura começou a se difundir chegando na Coreia, depois na Índia, aproximadamente no ano 400 a.C., logo após no Japão e Tibet. Apenas após o ano 550 d.C. é que a sericicultura atingiu países como a Itália, França e Espanha (ZANETTI, 2007).

No Brasil, a atividade iniciou-se durante o reinado de D. Pedro I, no século XIX, no município de Itaguaí, no Rio de Janeiro. Foi instalada ali a primeira indústria de seda nacional chamada de Companhia Seropédica Fluminense. Em 1912 chega em Barbacena, no estado de Minas Gerais, através da instalação da primeira Estação experimental de Sericicultura e em São Paulo em 1921, na cidade de Campinas com a S/A Indústria de Seda Nacional. Já no estado do Paraná, a atividade teve início em 1932 no município de Cambará, e em 1940 também em São Paulo, no município de Bastos, é criada pelos imigrantes japoneses a Sociedade Colonizadora do Brasil ("Brajiru Takushoku Kumiai"), de onde originou-se a empresa Fiação de Seda BRATAC S.A., qual é atualmente a maior indústria de fiação de seda no Brasil (ZANETTI, 2007).

No cenário atual, vários são os países exportadores da seda, porém a China lidera o mercado internacional de exportação sendo a responsável por aproximadamente 76,7% da produção mundial. Em segundo lugar encontra-se a Índia (GUO-PING; JIE, 2011; RAJU et al., 2012) seguida do Vietnã, Uzbequistão e Tailândia com menos de 5%. O Brasil ocupa o 6º lugar no *ranking* mundial com aproximadamente 0,86% da produção (SANTOS; VIDIGAL; MERLINI, 2011; SEAB, 2010).

A sericicultura nacional é bem desenvolvida no estado do Paraná, o qual tem se destacado nos últimos 10 anos (SEAB, 2013a) como o maior produtor

nacional de casulos verdes¹, apresentando a produção na safra 2012/2013 correspondente à 89% (2.326 t) do total produzido no país. Em menor escala temos os estados de São Paulo com 7,5%, Mato Grosso do Sul que corresponde a 3,4% da produção e Santa Catarina com 0,01% (SEAB, 2013b).

O Paraná conta com 188 municípios produtores, e o clima da região é um fator de relevância para estes altos índices de produção (SEAB, 2013a). Sendo o município de Nova Esperança, o maior produtor do Estado, onde a atividade é exercida por 199 sericultores, o que corresponde a 10% do total do estado, conta com 303 barracões e uma área de 730 há, com cerca de 344 mil kg de casulos verdes produzidos, o que corresponde a 16% do total produzido no estado (SEAB, 2013b).

A indústria sericícola conta com apoio de órgãos governamentais, que aliada aos conhecimentos científicos e tecnológicos, possibilita que a seda produzida no Brasil seja considerada de qualidade superior (GUANZIROLI et al., 2001; PANUCCI-FILHO; CHIAU; PACHECO, 2011; SEAB, 2010).

A atividade tem se desenvolvido em pequenas comunidades rurais, onde há o predomínio do trabalho familiar, o que possibilita um meio de subsistência econômica aos trabalhadores do campo. A abrangência e importância econômica conferem compromissos sociais à sericultura, pois comparada a outras atividades agrícolas, ela necessita de grande quantidade de mão-de-obra, contribuindo com a fixação do homem no campo minimizando problemas como o êxodo rural (GUO-PING; JIE, 2011; PANUCCI-FILHO; CHIAU; PACHECO, 2011). Além disso, propicia ao sericultor, renda quase que mensal, podendo representar até 65% de renda total (KURIN, 2002).

Outro aspecto positivo da sericultura é que ela favorece o desenvolvimento sustentável por se tratar de uma atividade de baixo impacto ao meio ambiente, pois o bicho-da-seda é um inseto sensível às adversidades do meio, por esse motivo, não se devem utilizar agrotóxicos nas plantações de amoreira, fator positivo também a saúde do sericultor (BRANCALHAO, 2002; WATANABE; YAMAOKA; BARONI, 2000). Além de ser uma atividade que proporciona grande número de empregos tanto diretos como indiretos, pois no

¹Casulos verdes são os que apresentam crisálidas vivas no seu interior. Eles são coletados pelo produtor rural, nos barracões de criação do bicho-da-seda, e são encaminhados aos entrepostos de compra das indústrias de fiação; onde serão, posteriormente, desidratados em um secador que mata as crisálidas.

campo gera em torno de 13,9 mil empregos diretos, na indústria mais de 2 mil e no setor de serviços, 3 mil empregos indiretos (ZANETTI, 2007).

Porém, a indústria da seda enfrenta contratempos graves devido à ocorrência de doenças causadas por protozoários, bactérias, fungos e vírus, e que podem atingir o bicho-da-seda em todos os estágios do seu ciclo de vida (DOURADO et al., 2011). As doenças virais são responsáveis por mais de 70% das perdas na sericultura, quando não são tomadas medidas profiláticas adequadas (FONSECA; FONSECA, 1986; POTRICH et al., 2007). Dentre essas doenças, destaca-se a causada pelo vírus BmNPV da família *Baculoviridae*, gênero *Alphabaculovirus* (BRANCALHÃO, 2002; FONSECA; FONSECA, 1986; HANADA; WATANABE, 1986). Tendo em vista o prejuízo que esta doença pode trazer a toda cadeia produtiva de seda, várias pesquisas são desenvolvidas com *B. mori*, visando encontrar raças puras ou híbridas que possam ser mais resistentes ou tolerantes ao BmNPV e também mais produtivas (DAIMON; KATSUMA; SHIMADA, 2007).

2.2 *Bombyx mori*

Inseto de grande importância econômica para o homem, de fácil manuseio e criação, sendo também considerado organismo modelo em estudos científicos (DOURADO et al., 2011), conhecido popularmente como bicho-da-seda da amoreira e sendo o único inseto realmente domesticado pelo homem perdeu suas características selvagens, se tornando assim dependente do ser humano para sua sobrevivência e reprodução (DINGLE et al., 2005). Está disponível apenas nos bancos de germoplasma, os quais através de pesquisas experimentais, buscam híbridos que apresentem características favoráveis à sericultura (PEREIRA et al., 2013).

É um inseto holometábolo, ou seja, sua metamorfose é completa, passando por quatro estágios de desenvolvimento durante seu ciclo de vida. O ovo é o primeiro estágio, de onde eclode a lagarta ou larva (segundo estágio), segue-se o estágio de pupa ou crisálida, momento da metamorfose, e o último estágio é o de mariposa, sendo a forma adulta, que se dedica exclusivamente à reprodução.

formando um fio longo e único, utilizado na construção do casulo (MONDAL; TRIVEDY; KUMAR, 2007). Este possui alto valor comercial, é uma fibra natural, antialérgica e com características únicas, sendo adequada a todos os climas, pois é considerada má condutora de calor e, misturada com outros fios, produz tecidos mais resistentes que as fibras sintéticas de *nylon* e poliéster (FERNANDEZ et al., 2005).

Devido à sua facilidade de criação e à sua morfologia, *B. mori* tem se destacado como organismo modelo entre os lepidópteros podendo ser usado na pesquisa básica, na biotecnologia e na sericicultura, onde tem maior aplicação econômica, pela produção dos fios de seda (GOLDSMITH; SHIMADA; ABE, 2005). Também estudos têm mostrado grande importância das proteínas da seda, fibroína e sericina, com aplicações em biologia celular e molecular, fisiologia, genética, bem como na área médica (KUNDU et al., 2013; QIN et al., 2012).

Estudos demonstram que a fibroína, a qual constitui 65% da seda, possui propriedades importantes na minimização da reação inflamatória. Utilizada também para cultura de células; imobilização de enzimas; como estrutura para engenharia de tecido ósseo; bem como em curativos (KIM et al., 2011; LI et al., 2010; WANG; RAJKHOWA; TSUZUKI, 2010). Já a sericina, tem destaque na composição de cosméticos, e com propriedades antioxidante e anticoagulante, prevenindo o câncer de pele, e assim como a fibroína também utilizada em estudos com cultura de células (CAO; WANG; ZHANG, 2013). Ambas as proteínas da seda podem provocar efeito no aumento da expressão gênica em células de osteoblastos, promover inibição de adipogênese e bloquear a expressão de genes específicos nos adipócitos. Assim, vem ganhando grande destaque em estudos científicos no tratamento à obesidade (JUNG et al., 2011; QIN et al., 2012).

Um estudo de Seo et al. (2011), que avaliaram o efeito de diferentes composições de fibroína e sericina sobre o peso corporal e o metabolismo lipídico em ratos obesos, demonstraram que estas suprimiram significativamente o ganho de peso, apresentando redução no peso corporal, bem como melhora no metabolismo lipídico, diminuição na concentração de colesterol plasmático total e triglicerídeos, havendo aumento de HDL-colesterol o qual está relacionado com redução dos riscos de doenças cardíacas. Sendo o efeito hipolipidêmico, em parte

devido à inibição da lipogênese hepática e regulação dos adipócitos à produção de adipocinas. Os autores afirmaram ainda, que a sericina teve efeito mais eficiente que a fibroína e sugeriram que pode ser um biomaterial útil no desenvolvimento de alimentos funcionais ou como agente terapêutico contra a obesidade e suas doenças associadas.

2.3 TÚBULOS DE MALPIGHI

Um dos maiores obstáculos para a sobrevivência de animais terrestres é o estresse da desidratação, já que a água é fundamental no auxílio aos processos bioquímicos na célula e no meio extracelular. Com isso, a manutenção da homeostase da água é de fundamental importância para a vida, e ocorre através do controle da composição e da pressão osmótica de fluidos corpóreos em resposta à ausência ou à abundância de água no ambiente e nos alimentos ingeridos (AZUMA et al., 2012).

Em insetos a homeostase hidroeletrólítica da hemolinfa, bem como a eliminação de substâncias tóxicas derivadas do metabolismo ou absorvidas na alimentação, são efetuadas pelo sistema excretor. Este remove, inicialmente, de forma não seletiva, substâncias da hemolinfa, formando a urina primária, e posteriormente, reabsorve desta compostos úteis ou adiciona outros, que podem estar em excesso no corpo (CHAPMAN, 1998).

O principal órgão que compõe o sistema excretor de insetos são os túbulos de Malpighi (CHAPMAN, 1998), descritos pela primeira vez por Marcelo Malpighi, em 1668, no bicho-da-seda (KLOWDEN, 2007; LANDIN, 2009). Morfologicamente são tubos longos e finos com extremidade cega, que ficam livres na hemocele (Fig. 2 A). Os TM, no caso de lepidóptera, se unem formando a ampola, próximos à junção do intestino médio com o intestino posterior, na região do piloro (CARDOSO; CONTE; NANYA, 2009, LEVY et al., 2004; MARANHÃO, 1978; RIGONI; TOMATAKE; CONTE, 2004). Snodgrass e Eickwort (1993), colocam que a ampola apresenta células com prolongamentos que se projetam para o lúmen do intestino posterior (Fig. 2 C), e Spring, Parker, Hazelton (1988) atribuem à ampola, a função de fazer o bombeamento da urina para o intestino. O número de TM é altamente variável entre as espécies, de 1 a mais de

150 túbulos. Em alguns insetos, durante o desenvolvimento pós-embrionário, este número pode aumentar e o comprimento também pode variar entre as espécies (SNODGRASS; EICKWORT, 1993).

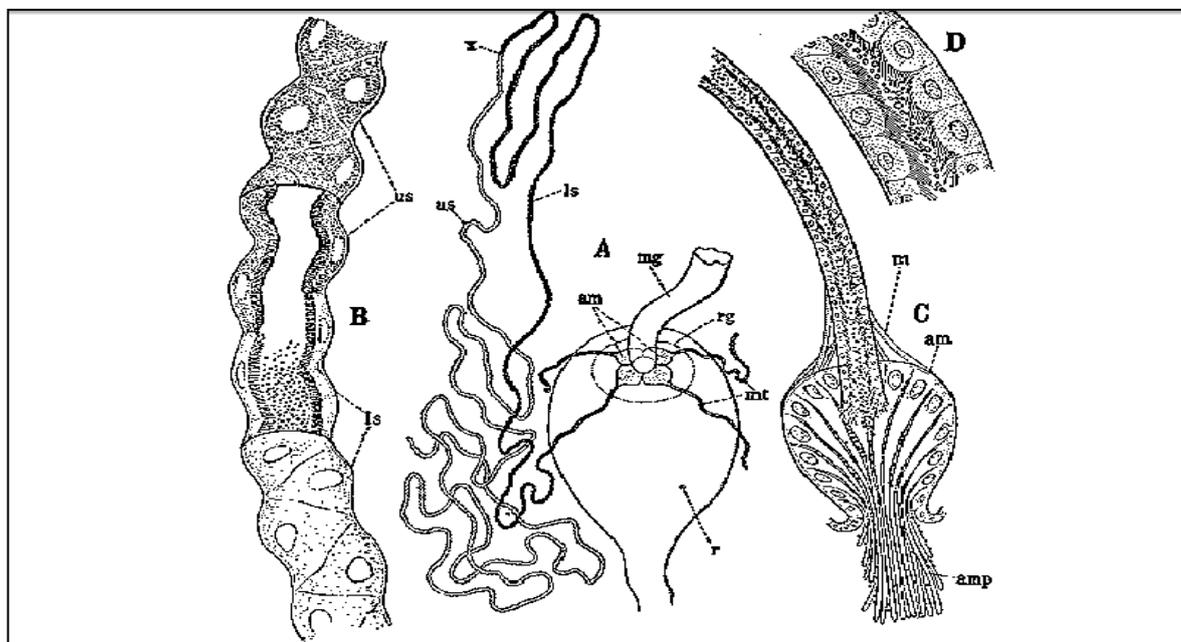


Figura 2. Túbulos de Malpighi de hemiptero, *Rhodnius prolixus*. A. Origem de túbulos de Malpighi (mt), túbulo a partir do intestino. B. Parte do túbulo, junção distal, (us) e proximal, (ls) partes mostradas em secção óptica. C. Base da ampola (am) túbulo com seus processos celulares alongados, (amp) projetando no intestino. D. Detalhes estruturais da parte proximal do túbulo (SNODGRASS; EICKWORT, 1993).

Em *B. mori* (TEIGLER; ARNOTT, 1972), assim como em outros lepidópteros, é comum a presença de 6 TM (CARDOSO; CONTE; NANYA, 2009; CHAPMAN, 1998; LEVY et al., 2004; MARANHÃO, 1978; RANSAY, 1976; RIGONI; TOMATAKE; CONTE, 2004; SNODGRASS; EICKWORT, 1993), os quais são divididos em três regiões: a proximal, a média e a distal (CARDOSO; CONTE; NANYA, 2009; FERMINO; CONTE; FALCO, 2010; RIGONI; TOMATAKE; CONTE, 2004) (Fig. 3). Um conjunto de músculos longitudinais e circulares circundam o TM. Sua contração auxilia na manutenção do gradiente de concentração no TM e, provavelmente, são também responsáveis pelo movimento dos fluidos no seu lúmen (CHAPMAN, 1998). Snodgrass e Eickwort (1993) descreveram que estes músculos realizam o peristaltismo e expõem dessa forma os produtos de excreção e destacam ainda a presença de uma rica aeração proporcionada pelo sistema traqueal (Fig. 4 C).

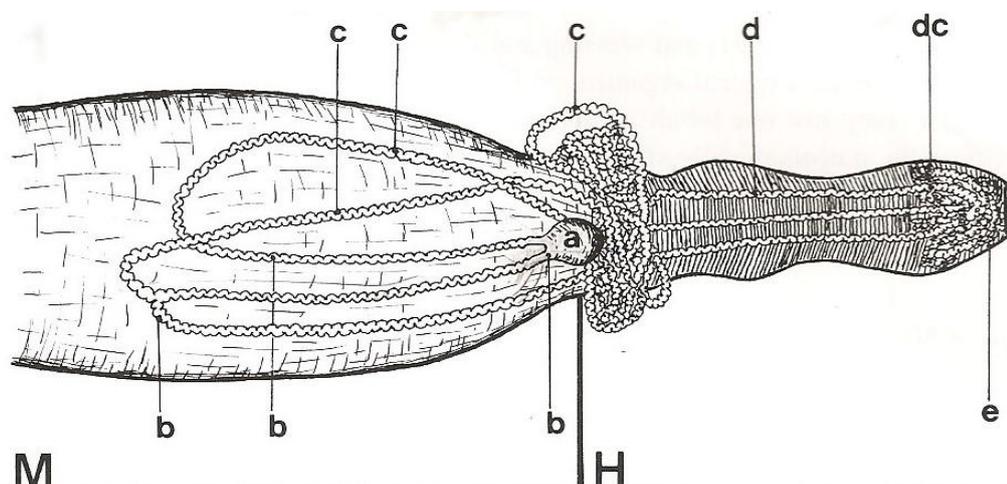


Figura 3. Vista lateral do tubo digestivo e túbulos de Malpighi da larva *Diatraea saccharalis*: intestino médio (M), intestino grosso (H), ampola (a), região proximal (b), região média (c), região distal (d), sistema criptonefridial (dc) e reto (e). (bar=1 mm) (RIGONI; TOMATAKE; CONTE, 2004).

A parede epitelial do TM de lepidópteros é constituído de epitélio simples com dois tipos celulares: as células principais de Malpighi, tipo predominante; e as células reabsortivas ou estreladas. Este epitélio se apóia sobre uma lâmina basal (Fig. 4 B), estrutura acelular presente em vários tecidos de insetos. A organização e espessura da lâmina basal parecem influenciar a passagem de macromoléculas, sendo capaz de atuar como uma barreira semipermeável (MARTOJA; BALLAN-DUFRANÇAIS, 1984; PASSARELLI, 2011; RAHMAN; GOPINATHAN, 2004; SNODGRASS; EICKWORT, 1993).

A região apical das células principais apresenta uma “borda estriada” distinta, constituída por microvilosidades justapostas, que se projetam para o lúmen, podendo frequentemente obstruí-lo. Na região basal ocorrem invaginações da membrana plasmática, associadas geralmente a função de secreção de fluidos e processos de estocagem (Fig. 4 A, B) (SNODGRASS; EICKWORT, 1993).

As células estreladas atuam, juntamente com as principais, na reabsorção de compostos tóxicos da hemolinfa. Sua morfologia, quantidade, localização e organização das microvilosidades, bem como as invaginações na superfície basal, parecem variar ao longo das regiões do TM. Porém, pouco se sabe a respeito desse tipo celular (CHAPMAN, 1998). Klowden (2007) coloca que os dois

tipos celulares podem ser ainda subdivididos em populações celulares distintas, que podem ser encontradas em diferentes áreas do epitélio do TM.

Nas células principais é comum a presença de cristais intracelulares, compostos principalmente por minerais como cálcio, magnésio e fosfato, além de outras substâncias como ácido úrico. Acredita-se que tenham como função a estocagem de excretas. Estes cristais também podem estar acumulados no lúmen do TM, como ocorre em lagartas de *B. mori*, que apresentam cristais de oxalato de cálcio preenchendo o espaço luminal (MARTOJA; BALLAN-DUFRANÇAIS, 1984; TEIGLER; ARNOTT, 1972). Essas células ainda contam com a presença, ao longo das suas microvilosidades, de numerosas mitocôndrias (Fig. 4 B) (KLOWDEN, 2007).

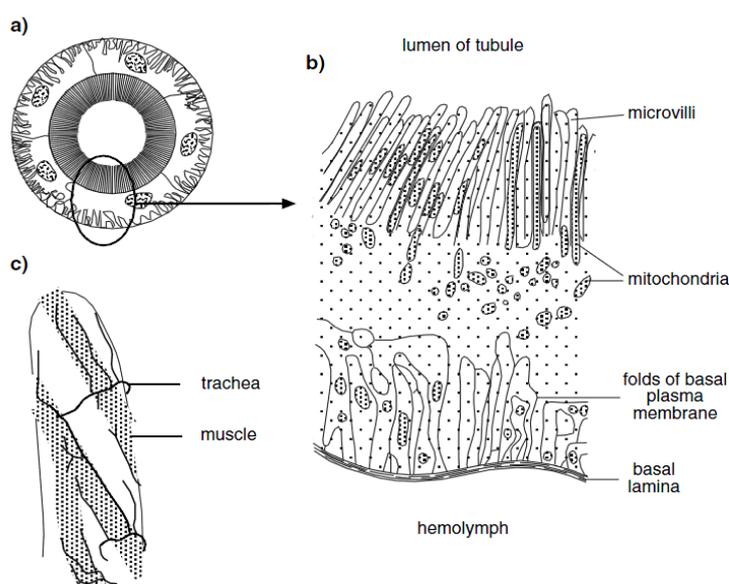


Figura 4 Túbulo de Malpighi de inseto. (A) Secção transversal de um túbulo. (B) Detalhe da parte de uma célula principal. (C) Extremidade de um túbulo de Malpighi com músculo e traquéia (CHAPMAN, 1998).

Em estudo de Cordeiro et al. (2008), com o TM de *Anticarsia gemmatilis*, a popular lagarta-da-soja, descrevem a presença das células principais, as quais apresentavam as invaginações basais e as microvilosidades na região apical, ambas contendo mitocôndrias, além de espaços citoplasmáticos serem visualizados ocupando a região basal das células.

Funcionalmente as células principais atuam no carreamento de íons e transporte de fluidos formando uma excreta primária (urina primária). Uma ATPase, presente na membrana plasmática apical, realiza o transporte do H^+ para o lúmen dos túbulos, posteriormente, este é co-transportado com o K^+ (cátion predominante, mas que pode variar conforme o hábito alimentar do inseto) ou Na^+ . Os íons Cl^- seguem o gradiente eletroquímico em direção ao lúmen, e a água move-se passivamente na mesma direção. Na medida em que, esse fluido é produzido no interior do TM, solutos diversos (ácido úrico, alcalóides, aminoácidos, toxinas) presentes na hemolinfa, também se movem para seu interior, por difusão passiva ou, em alguns casos, por transporte ativo. Assim, a produção da urina primária é dependente de movimento ativo de cátions (K^+ ou Na^+) para o interior do TM, seguido da entrada passiva de ânions, principalmente o Cl^- , restaurando o equilíbrio iônico e tornando o filtrado isosmótico com relação à hemolinfa (Figs. 5 e 6) (CHAPMAN, 1998).

A urina primária então passa pelo reto, sendo modificada por reabsorção contínua, dando origem a uma urina secundária, a qual é expelida pelo ânus (KLOWDEN, 2007). Essa modificação na urina primária é necessária para a recuperação de íons, uma condição essencial para a vida dos insetos, que não suportam grandes perdas de íons a partir da hemolinfa (CHAPMAN, 1998).

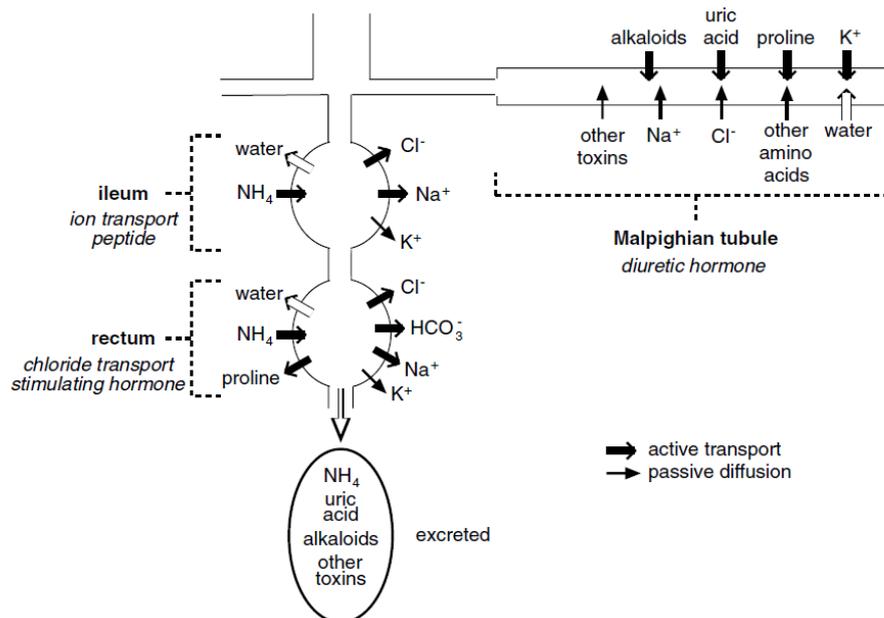


Figura 5. Produção e modificação da urina em um inseto terrestre (*Schistocerca*). O transporte ativo de K^+ nos túbulos de Malpighi leva ao movimento osmótico de água e outros solutos que seguem passivamente. Muitos solutos são recuperados conforme a urina se move ao longo do intestino grosso, mas a amônia é ativamente secretado na luz intestinal. Os hormônios reguladores são mostrados em itálico (CHAPMAN, 1998).

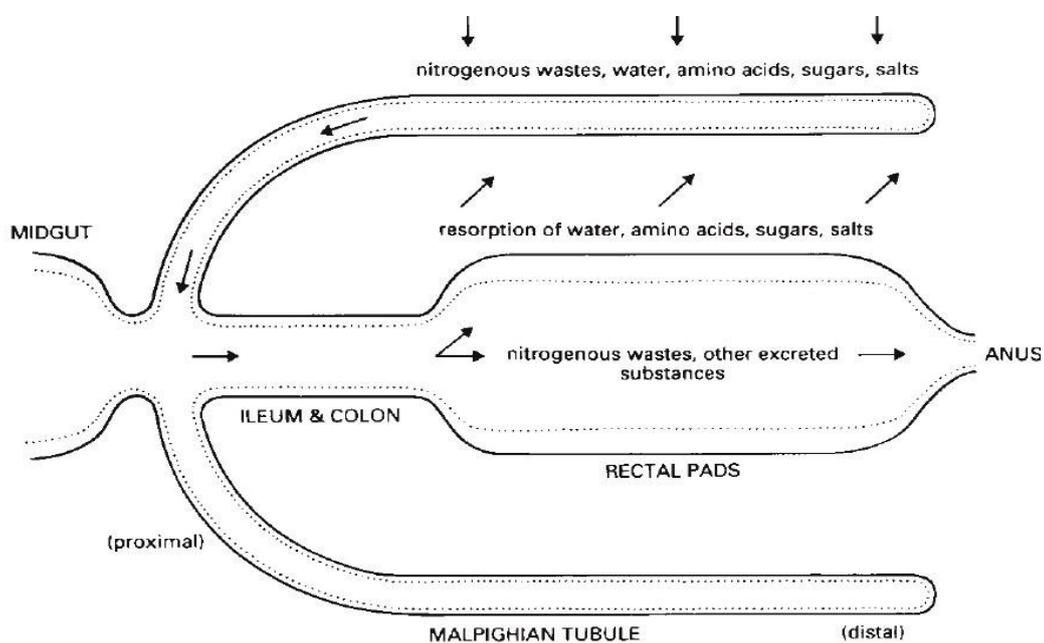


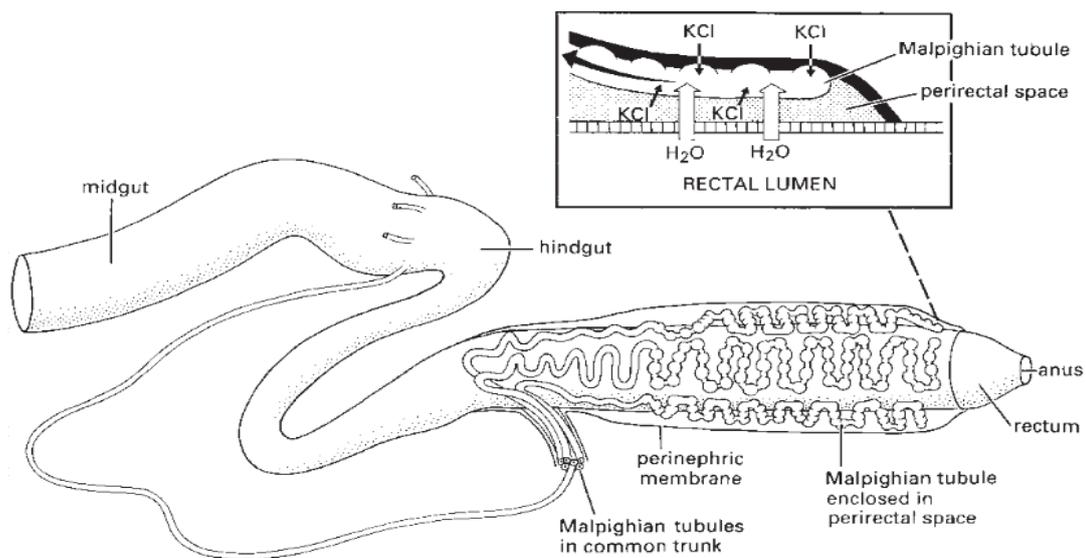
Figura. 6 Diagrama esquemático de um sistema excretor generalizado, que mostra o caminho da eliminação dos resíduos (GULLAN; CRANSTON, 2010).

A reabsorção de água, íons, açúcares, aminoácidos e outras substâncias, ocorre no intestino posterior e, no caso de lepidópteros, especialmente no reto, pelo sistema criptonefridial (Figs. 7 e 8). Este complexo sistema é constituído: pelo segmento do reto anterior, formado pelo epitélio criptonéfrico retal e íntima associada, que se apresenta desprendida, criando o espaço subcuticular (Fig. 9); pela região distal do TM, que se organiza de forma convoluta ao redor do reto anterior; pela membrana perinéfrica, camada de células achatadas, que envolve toda a região do reto anterior e TM, criando o espaço perinéfrico; e ramos do sistema traqueal, que penetram no espaço perinéfrico (CHAPMAN, 1998; KLOWDEN, 2007; RANSAY, 1976).

A membrana perinéfrica conta ainda com a presença de musculatura longitudinal associada (VESSARO-SILVA, 2013). Este complexo sistema proporciona a reutilização da água e íons, que são absorvidos a partir do lúmen intestinal para a hemolinfa ou interior do TM (AZUMA et al., 2012).

Zhong et al., (2013) identificaram no TM de *B. mori* 1.367 proteínas envolvidas no metabolismo, processos de desintoxicação, mecanismo de defesa, bem como no transporte de água e íons.

Klowden (2007) coloca que o movimento de água, bem como de alguns solutos, ocorre através do gradiente de concentração, sendo independente de energia, mas por outro lado necessitam da presença de canais seletivos de água, as aquaporinas (AQPs). Estas pertencem a uma vasta família de proteínas que funcionam como canais aquosos, encontrados em microorganismos, plantas, invertebrados e mamíferos. Nestes últimos, já foram caracterizadas treze tipos de AQPs (AGRE, 2006; ZARDOYA, 2005), já em insetos onze membros da família AQPs foram encontrados sendo funcionalmente expressas (KATAOKA; MIYAKE; AZUMA, 2009; PIETRANTONIO et al., 2000) e defeitos nos seus genes têm sido associados a defeitos na homeostase da água no organismo. A diversidade das AQPs pode influenciar na capacidade de transportar glicerol, cátions e ânions (KLOWDEN, 2007).



*After Grimstone et al. 1968; Bradley 1985.

Figura 7. Sistema criptonefridial, as extremidades distais dos túbulos de Malpighi se mantêm em contato com a parede retal pela membrana perinéfrica (GULLAN; CRANSTON, 2010).

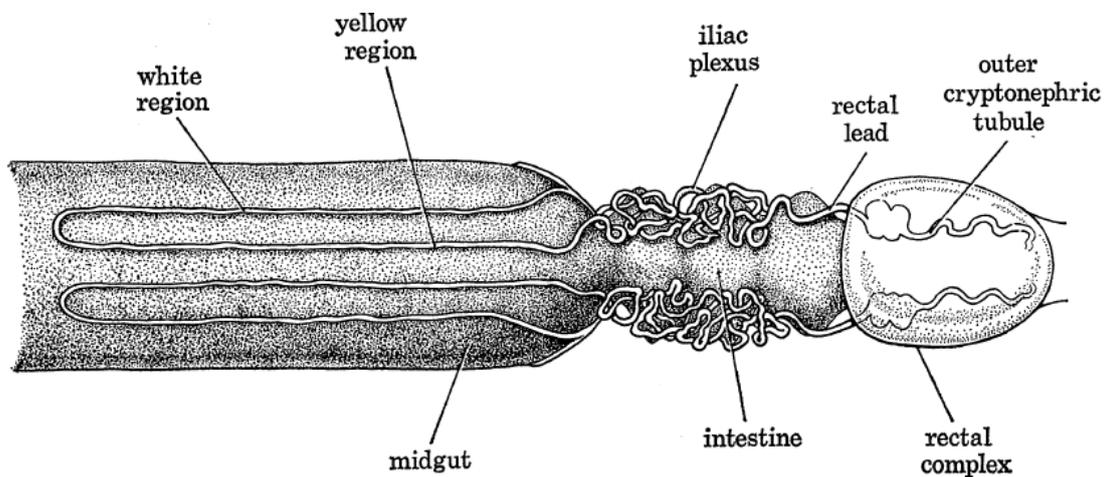


Figura 8. Esquema mostrando as relações anatômicas entre os túbulos de Malpighi e o tubo digestivo. Não mostrando os túbulos internos (RANSAY, 1976).

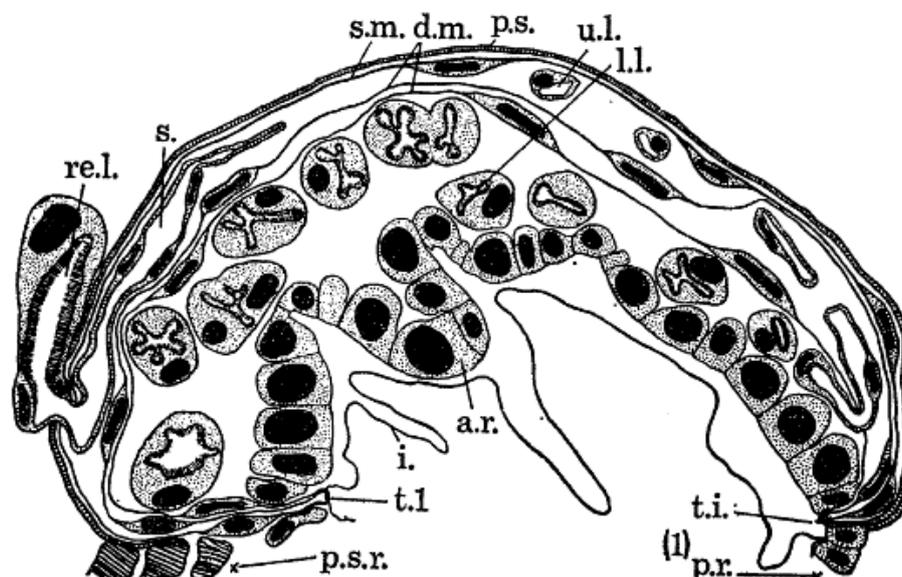


Figura 9. Secção coronal do Complexo Retal. a.r., epitélio criptonefridial retal; d.m., membrana perinéfrica interna; i., cutícula desprendida; l.l., túbulo interno; p.r., canal anal; p.s., camada muscular, recobrendo a membrana perinefrica externa; p.s.r., esfíncter entre intestino e reto; re.l., almofada retal; s., dilatação do túbulo exterior; s.m., membrana perinéfrica externa; t.i., espessamento da cutícula na área de junção da membrana perinéfrica; u.l., túbulo externo (RANSAY, 1976).

2.4 BACULOVÍRUS

Os baculovírus compõem o maior grupo de vírus patogênicos a insetos (FEDERECI, 1997), membros da família *Baculoviridae*, que são capazes de infectar mais de 700 espécies de artrópodes de muitas ordens como, Lepidoptera, Himenoptera, Diptera, Coleoptera, Orthoptera, Neuroptera, Siphonaptera, Trichoptera, além de aracnídeos e crustáceos. Porém a maioria dos vírus conhecidos foi isolado de membros da ordem Lepidoptera (O'REILLY; MILLER; LUCKOW, 1992; WANG et al., 2008). Este vírus é constituído por DNA circular de fita dupla, com tamanho entre 80 a 180 kb, capaz de codificar de 100 a 200 proteínas (THEILMANN et al., 2005). O DNA se associa a proteínas do capsídeo formando os nucleocapsídeos, que são envolvidos por um envelope membranoso, originado a partir de microvesículas provenientes da membrana nuclear interna,

constituindo assim, o nucleocapsídeo envelopado ou vírion, que se agrupam em um corpo de oclusão protéico ou poliedro (OB - *occlusion body*), constituído pela proteína poliedrina. O poliedro tem tamanho variado entre 0,6 a 15 μm de diâmetro, e confere aos vírions proteção contra as condições do meio ambiente, possibilitando por tempo indeterminado a viabilidade viral (Fig. 10) (ROHRMANN, 2013)

Taxonomicamente dividia-se os baculovírus em dois gêneros, os *nucleopolyhedrovirus* (NPVs) e *granulovirus* (GVs) (BILIMORIA, 1991; MURPHY et al., 1995). Porém baseada na análise filogenética comparativa de 29 genomas de baculovírus, uma nova classificação foi proposta e a família foi dividida em quatro gêneros: *Betabaculovirus*, *Gammabaculovirus*, *Deltabaculovirus* e *Alphabaculovirus* (AlphaBV). Este último compreende os NPVs específicos de lepidópteros com 25 espécies (ROHRMANN, 2013).

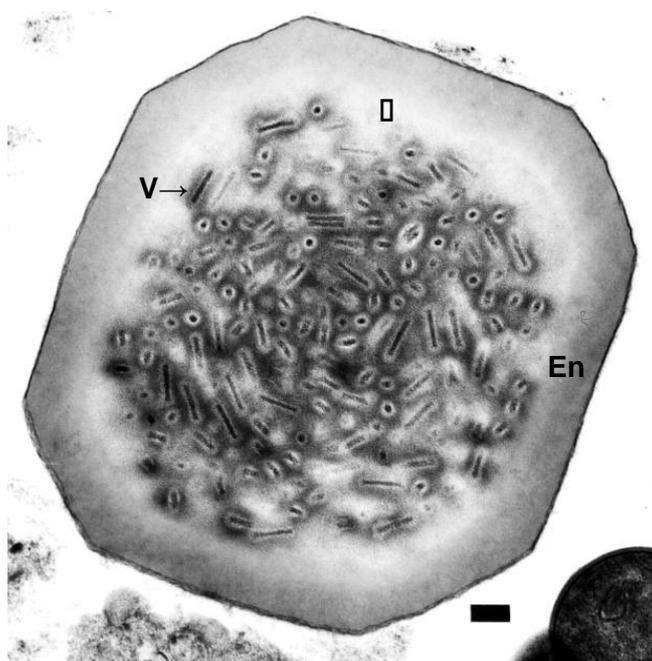


Figura 10. Eletromicrografia de transmissão mostrando poliedro do BmMNPV, obtido de inoculação experimental em lagarta de *B. mori*. Envelope do poliedro (En), matriz proteica (□) e vírions ocluídos (V), (barra: 1 μm) (BRANCALHÃO, 2002).

Os AlphaBV podem ainda possuir apenas um nucleocapsídeo por envelope, sendo denominado de “*single nucleopolyhedrovirus*”- SNPV, ou vários nucleocapsídeos por envelope, caracterizando assim os “*multiple nucleopolyhedrovirus*”- MNPV, que podem apresentar até 19 nucleocapsídeos por envelope. Porém a base genética para o entendimento do envelopamento de um ou mais nucleocapsídeos ainda é desconhecida (ROHRMANN, 2013). Sendo os MNPV considerados mais virulentos que os SNPV, uma vez que é maior o número de nucleocapsídeos por envelope e estudos mostram a existência de variabilidade geográfica para NPVs da mesma espécie, fato que também pode afetar sua virulência (FAN; WANG; ZHANG, 2007).

Dados históricos apontam a descoberta dos baculovírus relacionada ao desenvolvimento da atividade sericícola, a qual se desenvolveu com a cultura de lagartas do bicho-da-seda, utilizadas na produção de fios (ROHRMANN, 2013). E foi no século XVI, que surgiram os primeiros relatos sobre infecção causada pelo baculovírus, quando os criadores do bicho-da-seda evidenciavam a liquefação das suas lagartas (ARIF, 2005).

Séculos mais tarde, com o surgimento da microscopia eletrônica, foi possível através do isolamento de partículas virais, perceber que estes eram os causadores dessa liquefação que acometia as lagartas do bicho-da-seda (STENHAUS; RICHARDS, 1963), podendo trazer sérios prejuízos a sericicultura, causando a doença fatal poliedrose nuclear (IKUNO et al., 2004).

Porém, os baculovírus tem sido também conhecidos por sua versatilidade e utilidade como vetores de expressão gênica até mesmo em células de mamíferos, bem como com capacidade bioinseticidas (SZEWCZYK et al., 2006), atuando como agente no controle biológico de diversas pragas agrícolas (DOURADO et al., 2011; RODRÍGUEZ et al., 2002).

No Brasil, a infecção por NPV em lagartas *B. mori*, foi detectada em 1976 no estado de São Paulo. No estado do Paraná, maior produtor de seda do Brasil, Brancalhão, Torquato e Castro (2002) identificaram um isolado geográfico do NPV com a presença de muitos vírions por poliedro, caracterizando os MNPV.

Diferente da maioria dos vírus, o ciclo infeccioso dos AlphaBV apresenta 2 formas virais fenotipicamente distintas, com a formação de duas partículas geneticamente idênticas e estruturalmente distintas: o “*budded virus*” ou vírus

broto (BV); e o “*occlusion derived bodies*” ou vírus derivado do poliedro (ODV). BV compreendem vírions com um envelope lipoprotéico e que não se encontram ocluídos, e é responsável pela infecção sistêmica ou secundária (transmissão célula-a-célula). Já o fenótipo ODV apresenta um ou vários nucleocapsídeos envelopados, presente no corpo de oclusão (OB). O ODV age no final da infecção e é o responsável pela transmissão horizontal da doença, de um inseto para o outro, atuando também na infecção primária das células do epitélio do intestino médio (ROHRMANN, 2013). Baseado em estudos filogenéticos NPV pode ser organizado em grupo I ou II (KATSUMA et al., 2011). O grupo I utiliza uma proteína denominada GP64 para se fundir com a membrana plasmática das células do epitélio do intestino médio; já no grupo II, a proteína F é que está envolvida neste processo, também chamada de proteína de fusão (ROHRMANN, 2013).

O ciclo infeccioso do AlphaBV se inicia através da ingestão do alimento contaminado com os poliedros virais, que no caso de *B. mori* são as folhas de amoreira. Os vírus, na forma de poliedros, alcançam o intestino médio onde são degradados em função do pH alcalino em torno de 9,5 a 11,5 e de proteínas do suco digestivo que digerem a poliedrina e liberam assim os ODVs no lúmen intestinal (LIANG et al., 2013). Como consequência os ODVs, atravessam a matriz peritrófica presente no intestino médio e penetram nas células colunares, através de fusão de membranas, mediada por receptores específicos, podendo se instalar no núcleo celular por filamentos de actina, atravessando os poros nucleares, para reprodução, ou podem penetrar pela membrana basolateral e brotar, na forma de BV, provocando infecção de células subjacentes (LIMA, 2013). Para isso a proteína GP64 presente na membrana do BV é reconhecida por receptores celulares, então através de endocitose e transferência para o endossoma, o envelope do nucleocapsídeo se funde com a membrana do endossoma, ocorrendo à liberação dos nucleocapsídeos no citoplasma celular, os quais atravessam os poros nucleares e alcançam o núcleo, onde se inserem no genoma da célula, possibilitando assim, a transcrição de genes e replicação do DNA viral no estroma virogênico acarretando em hipertrofia nuclear. O retículo endoplasmático e o complexo de Golgi por sua vez fazem a síntese de proteínas que compõe o nucleocapsídeo, e que se inserem na membrana plasmática,

formando o envelope do BV no brotamento. Assim, o BV sai da célula caracterizando o processo secundário de infecção, quando os BV se distribuem para outros tecidos do corpo do inseto, através da hemolinfa ou do sistema traqueal (ROHRMANN, 2013).

Paralelamente ocorre a produção das proteínas virais poliedrina e P10, a poliedrina se acumula no núcleo da célula hospedeira, entre o viroplasma e o envoltório nuclear, e os vírions se agrupam concentricamente ao seu redor, dando origem aos poliedros virais, que através da citólise pela ação da P10 presente no citoplasma celular são liberados no meio extracelular, atingindo a hemocele (Figs 11, 12) (LIANG et al., 2013; ROHRMANN, 2013).

O ciclo infeccioso dos AlphaBV tem sido estudado em diversos insetos (ADAMS; McCLINTOCK, 1991; ROHRMANN, 2013) e em *B. mori* foi realizada a análise da infecção causada por um isolado geográfico do BmNPV no Estado do Paraná, Brasil, sendo a espécie viral identificada como *Bombyx mori multiple nucleopolyhedrovirus*, por apresentar poliedros contendo tanto nucleocapsídeos envelopados únicos, como múltiplos (BRANCALHÃO; TORQUATO; CASTRO, 2002).

Com a infecção frequente de lagartas de *B. mori* pelo BmNPV, o grupo de pesquisa da UNIOESTE, Campus Cascavel se interessou em estudar órgãos e tecidos susceptíveis a ação viral, e suas possíveis alterações citopatológicas e histopatológicas.

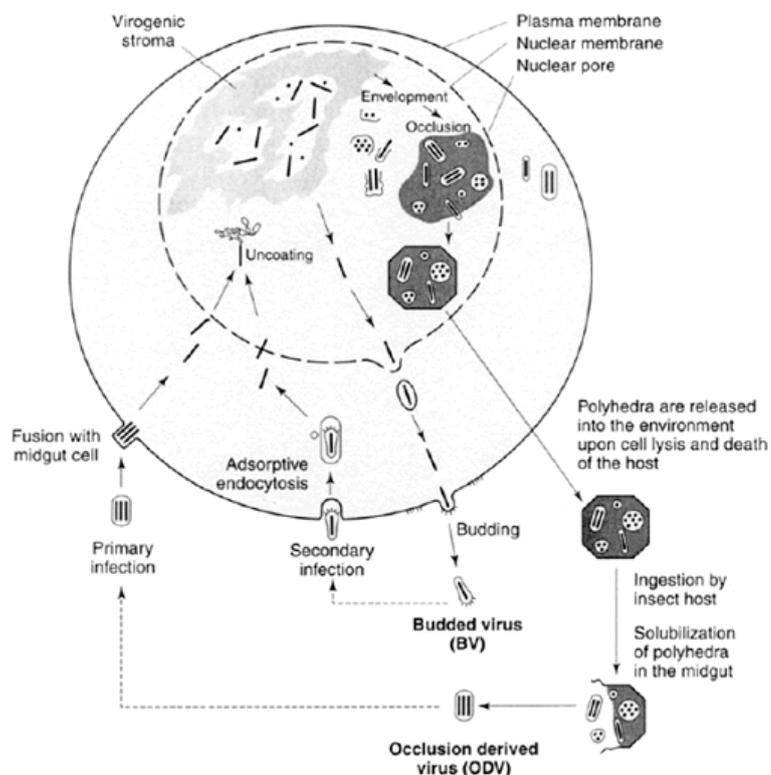


Figura 11. Ciclo de infecção do Baculovírus em uma célula de inseto, mostrando a produção de BV, ODV e poliedros. Disponível em: <http://web.aibn.uq.edu.au/cssb/Projects/Baculo.html>. Acesso em: 10 jul. 2014.

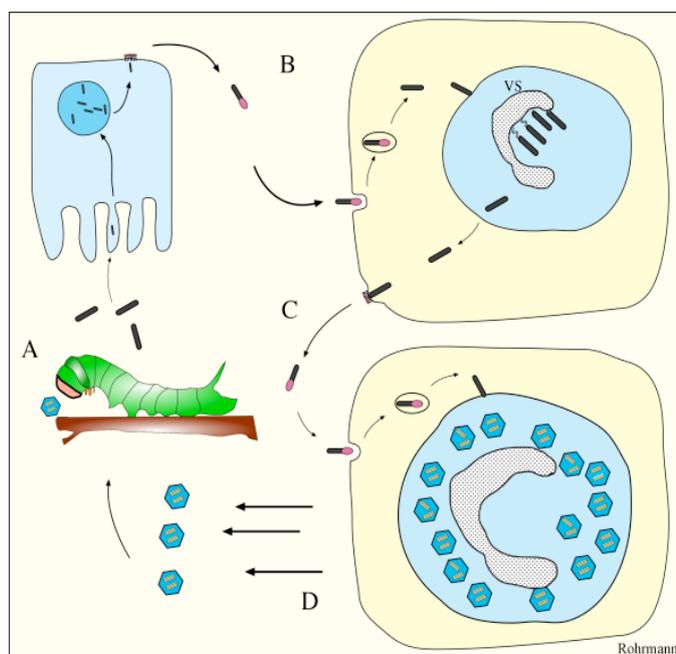


Figura 12. Esquema do ciclo de vida um baculovírus causando infecção sistêmica. A- Ingestão de poliedros, que entram nas células epiteliais. B- São produzidos mais BV e a infecção se espalha ao longo do inseto. C- No final da infecção são produzidos os vírions, e a célula morre, libertando os corpos de oclusão. D- Estroma virogênico então sai da célula (ROHRMANN, 2013).

Assim, diversos trabalhos já foram realizados para o conhecimento do ciclo infeccioso do BmNPV em lagartas de *B. mori*, com publicações de infecções nos diferentes tecidos. Como estudos realizados por Brancalhão, Souza, Soares (2002), que evidenciaram a infecção pelo BmNPV em células gordurosas do bicho-da-seda, as quais são responsáveis por realizar a síntese de proteínas e o armazenamento de metabólitos, a infecção ocorreu no 4º dia pós infecção (dpi) das lagartas. Estes autores relataram ainda que esse vírus possui comportamento de replicação assincrônica.

Já em trabalhos com o tegumento de lagartas de *B. mori*, os indícios de infecção por BmNPV foram observados no 5ºdpi. As células deste tecido apresentaram núcleo hipertrófico, pela formação do viroplasma ou estroma virogênico, local onde os nucleocapsídeos envelopados ou vírions são produzidos, os quais se agrupam em uma matriz protéica, constituída de poliedrina e desenvolvendo os poliedros virais, havendo ainda a ruptura do tegumento o que acarreta extravasamento da hemolinfa para o ambiente sendo este um importante meio da dispersão viral (BRANCALHÃO; RIBEIRO, 2003).

Analisando o sistema nervoso central, Torquato, Miranda-Neto, Brancalhão (2006), evidenciaram sua infecção frente ao BmNPV, a partir do 5º dpi. Entretanto não verificaram a lise das células nervosas infectadas, porém havia a presença de poliedros maduros em espaços nos gânglios e conectivos nervosos, provavelmente provenientes da infecção da traqueia, a qual penetra o tecido e é alvo conhecido do vírus. Assim os autores discutem o papel desta na dispersão da infecção neste tecido.

Pereira et al. (2008), analisaram a susceptibilidade do sistema reprodutor masculino de *B. mori* frente ao BmNPV e comprovaram através de microscopia de luz e eletrônica de transmissão, a patologia do órgão pela formação de estroma virogênico, presente no núcleo das células infectadas.

Em 2009 Brancalhão, Torquato, Fernandez analisaram a glândula da seda de *B. mori*, a qual se apresenta dividida em regiões anterior, média e posterior, e evidenciaram que a região anterior não se apresentou susceptível ao BmNPV, porém, as regiões média e posterior são infectadas no 4ºdpi. Os autores discutem também que o sistema traqueal tem um importante papel funcional na disseminação viral.

Estudos com as células da cárdia, uma pequena região que faz transição entre os intestinos anterior e médio, detectaram sua susceptibilidade ao BmNPV, sendo a infecção secundária, a partir do 6ºdpi, onde evidenciaram desorganização da lâmina basal presente neste tecido e presença de poliedros liberados no lúmen intestinal (RIBEIRO et al., 2009).

No 5º dpi Vessaro-Silva et al. (2014) verificaram um comportamento diferenciado das células do reto quanto a infecção ao BmNPV. As células do epitélio criptonéfrico na região anterior não revelaram indícios de infecção, porém nas células da região posterior ou canal anal, foi verificado a presença dos poliedros virais. A infecção desta região e de outros tecidos circunvizinhos levou a uma desorganização tecidual com acúmulo de poliedros no espaço perinéfrico, compartimento do sistema criptonefridial, promovendo modificações nos pellets fecais, indicando alterações na fisiologia do órgão.

Em estudos com o piloro, região esta que faz transição entre o intestino médio e posterior, responsável pelo controle da passagem do alimento, o qual se apresenta subdividido em anel intersticial posterior (com região anterior e posterior); cone pilórico e válvula pilórica, foi verificado que a região anterior do anel intersticial posterior é susceptível ao vírus a partir do 5º dpi, comprometendo assim a passagem do bolo alimentar ao íleo, para formação dos pellets fecais (BAGGIO et al., 2014).

Já um trabalho realizado com a glândula salivar deste inseto, submetido à exposição por BmNPV, mostrou que seu epitélio apresentou resistência a infecção viral. Este tecido conta com a presença da lâmina basal, a qual pode ser uma barreira que dificulta a passagem do vírus. Acredita-se que a infecção não ocorra pelo fato de que o sistema traqueal que penetra nos tecidos atravessando também dessa forma a lâmina basal, encontra-se distribuído apenas na periferia da glândula salivar (DOURADO et al., 2011).

Assim, nota-se através da literatura específica que diversos tecidos de *B. mori* são susceptíveis ao BmNPV, isolado geográfico do Paraná, Brasil, acarretando desequilíbrio metabólico no inseto, prejudicando dessa forma a homeostase, resultando em comprometimento na produção de casulos de qualidade.

Entretanto, a literatura não traz informação sobre a infecção por esse isolado geográfico no TM de *B. mori*. Cordeiro et al. (2008) observaram que o TM de *Anticarsia gmmatalis* infectadas com baculovírus AgMNPV recombinantes, sofreram degeneração precoce, com desorganização das microvilosidades, alterações nos espaços citoplasmáticos e invaginações basais bem como nas mitocôndrias, além de deformações na lâmina basal. No entanto, não foi evidenciado nenhum indício de infecção nas células do TM. Outros autores também obtiveram resultados semelhantes, estudando a infecção por baculovírus no tecido de insetos, verificaram a ocorrência de degeneração precoce do TM, porém sem vestígios morfológicos da infecção nas suas células (FLIPSEN et al., 1995; SOARES; RIBEIRO, 2005). Entretanto, em um estudo realizado na Índia com lagartas de *B. mori* infectadas com BmNPV, foi observado a infecção do TM das lagartas de *B. mori*, com presença de OB e BV na superfície apical das células e alterações no tecido, que se apresentou fragmentado e frágil (CHAKRABARTY et al., 2012)

3. REFERÊNCIAS

ADAMS, J.R.; MCCLINTOCK, J.T. Baculoviridae. Nuclear polyhedrosisviruses Part 1. Nuclear polyhedrosis viruses of insects. In: **Atlas of Invertebrate Viruses**. CRC Press, Florida, p. 89–180, 1991.

AGRE, P. The aquaporin water channels. **American Thoracic Society**, v. 3, n. 1, p. 5-13, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2658677/pdf/PROCATS315.pdf>. Acesso: 05 ago. 2014.

ARIF, B. M. A brief journey with insect viruses with emphasis on baculoviruses. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 89, n. 1, p. 39-45, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências - elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AZUMA, M.; NAGAE, T.; MARUYAMA, M.; KATAOKA, N.; MIYAKE, S. Two water-specific aquaporins at the apical and basal plasma membranes of insect epithelia: Molecular basis for water recycling through the cryptonephric rectal complex of lepidopteran larvae. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, p.523-533, 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**, v. 1, p. 1-8, 2014. Disponível em: <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2014/vol13-AOP/pdf/gmr3513.pdf>. Acesso em: 22 jul. 2014.

BILIMORIA, S. L. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. In: **KURSTAK, E. Viruses of invertebrates**. New York: Marcel Dekker, p. 1. 1991.

BRANCALHÃO, R. M. C. Vírus entomopatogênicos no bicho-da-seda. **Biociência**, v. 24, p. 54-58, jan/fev, 2002.

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. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, ISSN 1676 – 1340, Brasília, 2002.

BRANCALHÃO, R. M. C.; SOUZA, V. B. B.; 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, 2002.

BRANCALHÃO, R. M. C.; RIBEIRO, L. F. C. Citopatologia da infecção causada pelo BmNPV no tegumento de *Bombyx mori* L. 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, Umuarama, v. 6, n. 1, p.15–20, 2003.

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.

CARDOSO, A.; CONTE, H.; NANYA, S. Observação de cristais em Túbulos de Malpighi de *Dione Juno Juno* cramer, 1779 (Lepidoptera: Nymphalidae). In: **VI EPCC (Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar)**, 2009, Paraná. CESUMAR – Centro Universitário de Maringá, 2009.

CAO, T-T.; WANG, Y-J.; ZHANG, Y-Q. Effect of Strongly alkaline electrolyzed water on silk degumming and the physical properties of the fibroin fiber. **Plos one**, v. 8, n. 6, p. 65654, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3688822/pdf/pone.0065654.pdf>. Acesso em: 06 ago. 2013.

CHAKRABARTY, S.; DEB, S.; SAHA, A. K.; MANNA, B.; BINDROO, B. B. Dimorphism in nuclear polyhedrosis virus (*BmNPV*) (Family: Baculoviridae) causing 'grasserie' disease in silkworm (*Bombyx mori* L.): light and electron microscopy and protein profile. **Applied Biological Research**, v.14, n. 2, p. 176-186, 2012.

CHAPMAN, R. F. **The Insects: Structure and Function**. 4th Cambridge. Cambridge University Press, v. 3, p. 478-501, 1998.

CORDEIRO, B. A.; TIBÚRCIO, V. H. S.; HALLWASS, M.; PAES, H. C.; RIBEIRO, B. M.; BÁO, S. N. Structural and ultrastructural alterations of Malpighian tubules Of *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae infected with different *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) recombinant viruses. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, p. 7–19, 2008.

DAIMON, T.; KATSUMA, S.; SHIMADA, T. Mutational analysis of active site residues of chitinase from *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. **Virus Research**, v. 1, p. 168-175, 2007.

DINGLE, J. G.; HASSAN, E.; GUPTA, M.; GEORGE, D.; ANOTA, L.; BEGUM, H. Silk production in Australia. **Rural industries research and Development Corporation**, p.113, 2005.

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, 2011.

FAN, Q.; LI, S.; WANG, L.; ZHANG, B. The genome sequence of the multicapsid nucleopolyhedrovirus of the Chinese oak silkworm *Antheraea pernyi*. **Virology**. v.366, p.304-315, 2007.

FEDERICI, B. A. *Baculovirus pathogenesis*. In: **The baculoviruses**. MILLER, L. K. (Ed.). New York: Plenum, p. 33-59, 1997.

FERMINO, F.; CONTE, H.; FALCO, J. R. P. Analysis of Nucleus Activity in Malpighian Tubules of *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) Larvae by Critical Electrolyte Concentration. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 4, p. 568-571, 2010.

FERNANDEZ, M. A.; CIFERRI, R. R.; PATUSSI, E. V.; PEREIRA, M. F. A utilização da biotecnologia na sericultura brasileira. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.35, p. 52-57, 2005.

FLIPSEN, J.T.M., MAN, R.M.W., KLEEFSMAN, A.W.F., KNEBEL-MORSDORF, K., VLAK, J.M. Deletion of the baculovirus ecdysteroid UDPglucosyltransferase gene induces early degeneration of Malpighian tubules in infected insects. **Journal of Virology**. v. 69, n. 7, p. 4529–4532, 1995.

FONSECA, A. S.; FONSECA, T. C. Cultura da amoreira e criação do bicho-da-seda. São Paulo: **Nobel**, p.182-191. 1986.

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.

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.

GULLAN, P.J & CRANSTON, P.S. 2010. **The insects an outline of entomology**. 4th edition. Wiley-Blackwell, Malaysia.

GUO-PING, K.; JIE, X. G. Overview of silkworm pathology in China. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 79, p. 18046-18056, dez, 2011.

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

HONG, H. K.; WOO, S. D.; CHOI, J.Y.; LEE, H.K. Characterization of four isolates of *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*. **Archives of Virology**, v. 145, n. 11, p. 2351-2361, 2000.

IKEDA, M.; YAMADA, H.; HAMAJIMA, R.; KOBAYASHI, M. Baculovirus genes modulating intracellular innate antiviral immunity of lepidopteran insect cells. **Virology**, v. 435, p. 1-13, 2013.

IKUNO, A. A.; MARGATHO, L.F.F.; HARAKAVA, R.; AKAMATSU, M.A.; MARTINS, E.M.F.; PORTO, A.J.; FERREIRA, V.C.A. Direct application of the new PCR protocol for evaluation and monitoring of *Bombyx mori* infection by *Nucleopolyhedrovirus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, p.309-315, 2004.

JEHLE, J. A.; BLISSARD, G. W.; BONNING, B. C.; CORY, J. S.; HERNIOU, E. A.; ROHRMANN, G. F.; THEILMANN, D. A.; THIEM, S. M.; VLAK, J. M. On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. **Archives of Virology**, Áustria, v.151, n. 1, p.1.257-66, 2006.

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: 06 ago. 2013.

KATAOKA, N.; MIYAKE, S.; AZUMA, M. Aquaporin and aquaglyceroporin en silkworms, differently expressed in the hindgut and midgut of *Bombyx mori*. **Insect Molecular Biology**, v. 18, n. 3, p. 303-314, 2009.

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.

KLOWDEN, M. J. **Physiological systems in insects**. 2° ed. Estados Unidos da América: Elsevier, 2007.

KIM, D. W.; HWANG, H. S.; KIM, D. S.; SHEEN, S. H.; HEO, D. H.; HWANG, G.; KANG, S. H.; KWEON, H.; JO, Y. Y.; KANG, S. W.; LEE, K. G.; PARK, K. W.; HAN, K. H.; PARK, J.; EUM, S. W.; CHO, Y. J.; CHOI, H. C.; CHOI, S.Y. Effect of silk fibroin peptide derived from silkworm *Bombyx mori* on the anti-inflammatory effect of Tat-SOD in a miceedema model. **BMB reports**, v. 44, n. 12, p. 787-792, 2011. Disponível em:
<http://www.bmbreports.org/jbmb/pdf.php?data=MTMwODEzMDVAcGRmX3JhaW50cmFjZV9sZWV5c0AINUI0NC0xMiU1RDExMTlyMzE0NTRfJTI4Nzg3LTc5MiUyOUJNqjExLTE2MC5wZGY=>. Acesso em: 06 ago. 2013.

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.

LANDIM, C. C. **Abelhas: Morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Editora UNESP, Cap. 14, 2009.

LEVY, S. M.; FALLEIROS, A. M. F.; MOSCARDI, F.; GREGÓRIO, E. A.; TOLEDO, L. A. Morphological study of the hindgut in larvae of *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 4, July-August, 2004.

LI, B.; WANG, Y.; LIU, H.; XU, Y.; WEI, Z.; CHEN, Y.; SHEN, W. Resistance comparison of domesticated silkworm (*Bombyx mori* L.) and wild silkworm

(*Bombyx mandarina* M.) to phoxim insecticide. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 1771-1775, 2010. Disponível em: <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/78363/68726>. Acesso em: 06 ago. 2013.

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, p.140-151, 2013.

LIMA, A. A. **O papel das enzimas quitinase e catepsina na patologia viral de baculovírus**. Universidade de Brasília, Tese de Doutorado, 2013.

MARGATHO, L. F. F., OKAMOTO, F., ALMEIDA, A. M., SANTOS, C. A. J. P. Avaliação quantitativa da contaminação por micro-organismos no ambiente de criação do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) na fase de chocadeira. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 79, n. 2, p. 233-238, abr-jun, 2012.

MARTOJA, R.; BALLAN-DUFRANÇAIS, C. Digestive and excretory organs ultrastructure. In: **KING, R. C.; AKAI, H. Insect ultrastructure**, New York: Plenum Press, v. 2, p. 119-268, 1984.

MARANHÃO, Z. C. Morfologia geral interna. In: **Morfologia geral dos insetos**. Nobel, São Paulo, SP, p. 204-217, 1978.

MONDAL, M.; TRIVEDY, K.; KUMAR, S. N. The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn. **Caspian Journal of Environmental Sciences**, v. 5, p. 63-76, 2007.

MURPHY, F. A.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; GHABRIAL, S. A.; JARVIS, A. W.; MARTELLI, G. P.; MAYO, M. A.; SUMMERS, M. D. Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses. **Archives of Virology**, v.140, 1995.

O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. Baculovirus expression vectors: A laboratory manual. **Salt lake City**, 1992.

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

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:05 ago. 2014.

PEREIRA, E. P.; CONTE, H.; RIBEIRO, L. F. C.; ZANATTA, D. B.; BRAVO, J. P.; FERNANDEZ, M. A.; BRANCAHÃO, 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.

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.geneticsmr.com//year2013/vol12-2/pdf/gmr2328_abstract.pdf. Acesso em: 15 jun. 2014.

PIETRANTONIO, P.V.; JAGGE, C.; KEELEY, L.L.; ROSS, L.S. Cloning of an aquaporin-like cDNA and *in situ* hybridization in adults of the mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Insect Molecular Biology**, v. 9, n. 4, p. 407-418, ago, 2000. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2583.2000.00201.x/abstract;jsessionid=7BBD10C933A304BA42A353E3F4B35C8D.f01t03> Acesso em: 15 jun. 2014.

POTRICH, M.; ALVES, L. F. A.; BRANCAHÃO, R. 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.

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**, p. 3630-3638, 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.

RANSAY, J. A. The Rectal Complex in The Larvae of Lepidoptera. **Philosophical Transactions of The Royal Society**, v. 274, p. 203-226, 1976.

RAHMAN, M. M.; GOPINATHAM, K. P.; Systemic and *in vitro* infection process of *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*. **Virus Research**, v. 101, n. 2, p. 109–118, maio, 2004.

RIBEIRO, L. F. C.; BRANCAALHÃO, R. M. C.; TORQUATO, E. F. B.; 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.

RIGONI, G. M.; TOMATAKE, M. E. M.; CONTE, H. Morphology of Malpighian Tubules of *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) at Final Larval Development. **Cytologia**, v. 69, n.1, p. 1-6, 2004.

RODRÍGUEZ, J. L.; ROSA, J. C. CL.; PINEDO, E.; PINTO, D.; ZEDDAM, JL. Caracterización y utilización de un Nucleopoliedrovirus patógeno a *Spodoptera eridania* y *S. ochrea*. **Manejo Integrado de Plagas**, Costa Rica, n. 63, p. 39-45, 2002.

ROHRMANN, G. F. **Baculovirus Molecular Biology**. 3° ed. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); NCBI; 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114593/>. Acesso em: 21 nov. 2014.

SANTOS, S. A.; VIDIGAL, P. G.; MERLINI, L. S. A criação do *Bombyx mori* (Bicho-da-seda) e as principais doenças. **Arquivo Ciências Veterinária Zoológica**, UNIPAR, v. 14, n. 1, p. 57-64, jan-jun, 2011.

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

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

SECRETARIA DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO DO PARANÁ-SEAB.
Relatório Takii: Sericicultura no Estado do Paraná: Safras 2010/11 e 2011/12.
Curitiba, fev., 2013a.

SECRETARIA DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO DO PARANÁ-SEAB.
Relatório Takii: Sericicultura no Estado do Paraná: Safras 2011/12. Curitiba,
out. 2013b.

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 ago. 2013.

SNODGRASS, R. E.; EICKWORT, G. C. **Principles of Insect Morphology.**
Cornell University Press, New York. Cap. XIV, 1993.

SOARES, J.S., RIBEIRO, B.M. Pathology of *Anticarsia gemmatalis* larvae infected by two recombinant *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedroviruses. **Research in Microbiology**. v.156, p. 263–269, 2005.

SPRING, J. H.; PARKER, S. W.; HAZELTON, S. R. Excretion In The House Cricket (*Acheta Domesticus*): Ultrastructure Of The Ampulla And Ureter. **Tissue & Cell**, v. 20, n. 3, p. 431-442, fev, 1988.

STENHAUS, E. A.; RICHARDS, A. G. Insect pathology. **An advanced treatise: Academic Press**, 1963.

SZEWCZYK, B.; HOYOS-CARVAJAL, L.; PALUSZEK, M.; SKRZECA I.; SOUZA, L. M. Baculoviruses - re-emerging biopesticides. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 143–160, 2006.

TAKAHASHI, R.; TAKAHASHI, K.; TAKAHASHI, L. **Sericicultura: Uma promissora exploração agropecuária.** Jaboticabal: Funep, p. 140, 2001.

TAKEDA, I. K.; **Obtenção de sequências expressas em túbulos de Malpighi de híbridos de bicho-da-seda infectados pelo “*Bombyx mori*” nucleopoliedrovírus múltiplo, BmMNPV.** 2009. Dissertação (Pós-Graduação em Genética e Melhoramento)-Universidade Estadual de Maringá, PR, 2009.

TEIGLER, D. J., ARNOTT, H. J. Crystal Development In The Malpighian Tubules Of *Bombyx Mori* (L.). **Tissue & Cell**, v. 4, n. 1, p. 173-185, 1972.

THEILMANN, D. A.; BLISSARD, G.W.; BONNING, B.; JEHLE, J.; O'REILLY, D.R.; ROHRMANN, G.F.; THIEM, S.; VLAK, J.M. *Family Baculoviridae*. In: **Virus Taxonomy: Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses** (FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. Ed), p. 177-185, 2005.

TORQUATO, E. F. B.; MIRANDA-NETO, M. H. M.; BRANCALHÃO, R. M. C. Systematics, morphology and physiology nucleopolihedrovirus infected central nervous system cells of *Bombyx mori* (L.) (Lepidoptera: Bombycidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 1, p. 70-74, jan-fev, 2006.

TSUKAMOTO, R. Y. **Assentamentos rurais e a sericicultura como alternativa de renda: uma reflexão**. In: XIX ENCONTRO NACIONAL DE GEOGRAFIA AGRÁRIA, São Paulo, 2009, p. 1-16. Disponível em: <http://www.geografia.fflch.usp.br/inferior/laboratorios/agraria/Anais%20XIXENGA/artigos/Tsukamoto_RY.pdf>. Acesso em: 13 jun. 2014.

TSUKAMOTO, R. Y. Políticas públicas para a agricultura familiar: o norte do Paraná em foco. **Revista Geográfica de América Central**, Costa Rica, p. 1-19, 2011.

VESSARO-SILVA, S. A. **DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DO INTESTINO POSTERIOR E COMPORTAMENTO DIFERENCIAL DO RETO DE *Bombyx mori* FRENTE AO AlfaBV**. 2013. Dissertação (Pós-Graduação em Biociências e Saúde) -Universidade Estadual do Oeste do Paraná, PR, 2013.

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**, v. 13, n. 3, p. 6885-6891, 2014.

WATANABE, J. K.; YAMAOKA, R. S.; BARONI, S. A. **Cadeia produtiva da seda: diagnósticos e demandas atuais**. Londrina/PR: IAPAR, p. 30-33, period, 2000.

WANG, Y.; CHOI, J. Y.; ROH, J. Y.; WOO, S. D.; JIN, B. R.; JE, Y. H. Molecular and phylogenetic characterization of *Spodoptera litura* granulovirus. **Journal of Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 704-708, 2008.

WANG, X.; RAJKHOWA, R.; TSUZUKI, T. Recent Innovations in silk biomaterials. **Journal of Fiber Bioengineering and Informatics**, v. 2, p. 202-207, 2010.

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: 21 nov. 2012.

ZARDOYA, R. Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family. *Biology of the Cell*, v. 97, p. 397-414, 2005.

ZHONG, XW.; ZOU, Y.; LIU, SP.; YI, QV.; HU, CM.; WANG, C.; XIA, QY.; ZHAO, P. Proteomic-Based Insight into Malpighian Tubules of Silkworm *Bombyx mori*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1-7, set, 2013. Disponível em:

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0075731>. Acesso em: 15 jun. 2014.

ARTIGO CIENTÍFICO 1

INFECÇÃO DE CÉLULAS DA AMPOLA DOS TÚBULOS DE MALPIGHI DE *Bombyx mori* PELO *ALPHABACULOVIRUS*

Submetido à Revista Journal Invertebrate Pathology².

<http://www.journals.elsevier.com/journal-of-invertebrate-pathology/>

² Comprovante de envio e normas da Revista no anexo 1.

Infecção de células da ampola dos túbulos de Malpighi de *Bombyx mori* pelo *Alphabaculovirus*

Marilucia Santorum ^a, Célia Cristina Leme Beu ^a, Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro ^a, Juliana Souza dos Santos ^b, Rose Meire Costa Brancalhão ^a

^a Programa de Pós Graduação em Biociências e Saúde (PPGBS), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 85819-110 Cascavel, Paraná, Brasil

^b Iniciação Científica, Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 85819-110 Cascavel, Paraná, Brasil

Autor Correspondente: Rose Meire Costa Brancalhão (rosecb@gmail.com)

RESUMO

Alphabaculovirus é um gênero de vírus entomopatogênico, cuja espécie *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV) infecta o bicho-da-seda, *Bombyx mori*, inseto importante na indústria sericícola. Um isolado geográfico do BmNPV foi identificado no estado do Paraná, Brasil, infectando lagartas de *B. mori* e vários órgãos e tecidos alvos foram identificados; entretanto, não há informações sobre a infecção do túbulo de Malpighi (TM). O TM compõe o sistema excretor de *B. mori*, atuando na eliminação de substâncias tóxicas e na homeostase hidroeletrólítica. Assim, o presente estudo, analisou a susceptibilidade e a citopatologia do TM de *B. mori* ao BmNPV. Para tanto, lagartas híbridas de 5º instar foram inoculadas com uma suspensão viral e em diferentes dias pós-inoculação (dpi), segmentos do TM foram coletados e subdivididos nas regiões da ampola, proximal, média e distal; sendo processados para análises em microscopias de luz e eletrônica de transmissão. As regiões do TM revelaram diferenças na susceptibilidade ao BmNPV e a ampola, na sua área de transição, foi infectada a partir do 6º dpi, já as demais regiões não revelaram quaisquer indícios de infecção. A área de transição da ampola, ainda não havia sido descrita em lepidópteros e sua citopatologia revelou núcleo hipertrófico com viroplasma, seguido da formação e desenvolvimento dos poliedros virais, características comuns das infecções pelo *Alphabaculovirus*. Assim, a infecção da ampola do TM de *B. mori* ao BmNPV, somada a de outros alvos conhecidos, compromete o equilíbrio metabólico do inseto, com consequências na produção de seda e prejuízos ao setor sericícola.

Palavras-chave: Bicho-da-seda; Sistema excretor; Lepidoptera; Baculovírus; Citopatologia; Ciclo infeccioso.

1. Introdução

Baculoviridae é uma família de vírus que infectam invertebrados, principalmente insetos da ordem lepidóptera (Bilimoria, 1991), e que tem sido amplamente utilizado como bioinseticida, atuando no controle biológico de pragas agrícolas (Dourado et al., 2011; Moscardi, 1999; Rodríguez et al., 2002). Porém, quando infecta *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae), inseto de relevância econômica, como no caso do *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV), gênero *Alphabaculovirus* (AlphaBV), desencadeia a doença poliedrose nuclear, que resulta em prejuízos à indústria sericícola (Brancahão, 2002; Liang et al., 2013).

Os nucleopoliedrovírus (NPV) são constituídos de DNA circular fita dupla associado a proteínas do capsídeo, constituindo o nucleocapsídeo. Este é envolto por um envelope membranoso formando o nucleocapsídeo envelopado ou vírion, que pode apresentar um nucleocapsídeo por envelope, “single nucleopolyhedrovirus” – SNPV, ou vários, “multiple nucleopolyhedrovirus” – MNPV (Rohrmann, 2013), considerado mais virulento. Além disso, verifica-se que NPV de mesma espécie podem apresentar variabilidade genética de acordo com a região geográfica, o que afeta sua virulência (Adams and McClintock, 1991; Fan et al., 2007; Liang et al., 2013).

O ciclo infeccioso do NPV apresenta duas formas fenotípicas: o *budded* vírus (BV), que não se encontra ocluído e é responsável pela infecção sistêmica ou secundária (transmissão célula-a-célula); e o *occlusion derived bodies* (ODV), com um ou vários nucleocapsídeos envelopados, ocluídos no corpo de oclusão (OB) e responsável pela transmissão horizontal da doença, de um inseto para o outro, atuando na infecção primária de células epiteliais do intestino médio (Rohrmann, 2013).

Um isolado geográfico viral do BmNPV foi identificado no estado do Paraná, Brasil, infectando lagartas de *B. mori* e vários órgãos e tecidos alvos foram identificados como gorduroso (Brancahão et al., 2002), tegumento (Brancahão e Ribeiro, 2003), nervoso (Torquato et al., 2006), testículo (Pereira et al., 2008), cárdia (Ribeiro et al., 2009), regiões média e posterior da glândula da seda (Brancahão et al., 2009), região anterior do anel intersticial posterior do piloro (Baggio et al., 2014), bem como as células do canal anal (Vessaro-Silva et al., 2014). No entanto, não há informações na literatura da ação deste isolado geográfico viral no túbulo de Malpighi (TM) de *B. mori*.

O TM compõe o principal órgão do sistema excretor dos insetos, responsável pela eliminação de substâncias tóxicas e por auxiliar na homeostase hidroeletrolítica da hemolinfa

(Chapman, 1998). Em *B. mori*, assim como em outros lepidópteros, o TM é constituído por seis túbulos, três de cada lado do corpo do inseto, os quais se unem formando uma estrutura saculiforme, a ampola, na região da válvula pilórica, local de junção dos intestinos médio e posterior (Teigler e Arnott, 1972; Maranhão, 1978; Rigoni et al., 2004; Levy et al., 2004, 2008;). Os túbulos podem ainda serem subdivididos em três regiões a partir da ampola: a proximal, que se estende até a porção média do intestino médio; a média, com túbulos que retornam até a válvula pilórica (Apêndice I); e a distal, com túbulos que se continuam até o reto, onde compõe o sistema criptonefridial (Rigoni et al., 2004; Fermino et al., 2010). Funcionalmente, as regiões proximal e média atuam na absorção de íons e transporte de fluidos, formando a urina (Chapman, 1998; Gullan e Cranston, 2010); já a distal, realiza a reabsorção da água e a recuperação de íons, condição essencial para vida de insetos, que não suportam grandes perdas de íons a partir da hemolinfa (Chapman, 1998). No caso da ampola, Spring et al. (1988) atribuem a função de bombear a urina em direção ao intestino.

Morfologicamente, o TM é constituído de um epitélio de revestimento simples, apoiado na lâmina basal (Martoja e Ballan-Dufrançais, 1984; Snodgrass e Eickwort, 1993; Rahman e Gopinathan, 2004), e uma extensa rede de traqueias, que atuam na sua aeração (Chapman, 1998; Snodgrass e Eickwort, 1993).

Tendo em vista o papel do TM no equilíbrio metabólico do inseto, e que a osmorregulação influencia no desenvolvimento da glândula da seda, (Kataoka et al., 2009) e no funcionamento dos demais órgãos do inseto, o presente analisou a susceptibilidade do TM de *B. mori* ao BmNPV, isolado geográfico do Paraná, Brasil, de forma a contribuir com o estabelecimento do seu ciclo infeccioso.

2. Material e métodos

2.1. Insetos e inoculação

Lagartas híbridas de *B. mori*, no 4^o instar, foram obtidas de empresa de fiação de seda que produz lagartas para fins comerciais no Estado do Paraná, Brasil, e acondicionadas em caixas de criação de polietileno (28 x 20,5 x 10 cm), mantidas em sala de criação, alimentadas com folhas frescas de amoreira (*Morus* sp.) três vezes ao dia.

O inóculo viral do BmNPV, isolado geográfico do Paraná, Brasil, (GenBank número de acesso EU251694.1) foi obtido a partir de lagartas previamente infectadas e mantido em

temperatura de -4°C (Brancahão et al., 2002). A suspensão viral foi quantificada em câmara de Neubauer, concentração de $2,8 \times 10^7$ COPs/mL (COPs = Corpos de Oclusão Poliédricos).

A inoculação viral foi realizada em 50 lagartas mantidas em jejum por 24 horas, após a ecdise do 4º para o 5º instar. A escolha deste estágio do desenvolvimento ocorreu devido ao metabolismo elevado, voltado ao acúmulo de reservas energéticas necessárias à metamorfose e a construção do casulo. Além disso, o tamanho do inseto foi adequado à dissecação. Discos foliares de amoreira, com 2 cm^3 de diâmetro, foram previamente pulverizados com 10 μL da suspensão viral. No controle, um número igual de lagartas foi alimentado com discos foliares contendo somente água.

Após a ingestão dos discos foliares as lagartas, inoculada e controle, foram acondicionadas nas caixas de polietileno, recebendo a alimentação de rotina, isenta do vírus.

2.2. Microscopia de luz

Lagartas foram aleatoriamente selecionadas, do 4º ao 9º dia pós-inoculação (dpi), anestesiadas em freezer, por cerca de 5 minutos e, posteriormente, com éter etílico e então disseçadas. O TM foi removido e segmentado nas regiões da ampola, proximal, média e distal, sendo acondicionadas em frascos individualizados, contendo o fixador DuBosq Brasil (Beçak e Paulete, 1976), por 24 horas, à 4°C .

Na sequência, foram submetidas à rotina histológica para inclusão em parafina (Brancahão et al., 2009), realizando-se cortes seriados em micrótomo Olympus CUT4055, na espessura de 7 μm , e as lâminas, assim obtidas, foram submetidas às técnicas de coloração pela hematoxilina e eosina (HE) (Junqueira e Junqueira, 1983) para análise da morfologia e Azan modificado para corpos de oclusão virais (Hamm, 1966), para análise citopatológica. Lâminas controle foram submetidas às mesmas preparações utilizadas para o material inoculado. Após análises, as imagens foram obtidas em fotomicroscópio Olympus BX60. A representação esquemática da área de transição da ampola foi realizada no programa Paint Tool SAI.

2.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para a microscopia eletrônica de transmissão, as regiões do TM foram seccionadas e colocadas em frascos individualizados, previamente identificados, contendo o fixador Karnovsky modificado, sendo fixadas em glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% em tampão fostato 0,1M

pH 7,3 (Karnovsky 1965). Na sequência, foram lavadas três vezes em solução de tampão fosfato 0,1M pH 7,3 em intervalos de 5 minutos cada. A pós-fixação foi efetuada com tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão, por 2 horas. Os segmentos foram lavados três vezes em água destilada, por 5 minutos cada, e imersos em acetato de uranila 0,5% por 2 horas.

A desidratação foi realizada em soluções de acetona 50% e 70%, duas vezes por 10 minutos cada, e três vezes de 15 minutos para as concentrações de 90% e 100%. As regiões foram incluídas em mistura de resina (Araldite®) e acetona 100% (1:1) a temperatura ambiente e em resina pura com polimerização em estufa a 60°C por 48 horas. Secções de 60-80 nm foram contrastadas com solução alcoólica (50%) saturada de acetato de uranila por 20 minutos e citrato de chumbo por 10 minutos.

O exame e a documentação fotográfica do material foi realizado por microscópio eletrônico de transmissão CM100 da Philips, no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu-SP e com equipamento EM900 Zeiss do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa da Universidade Estadual de Maringá, PR.

3. Resultados e discussão

As análises citopatológicas das regiões do TM de *B. mori* revelaram diferenças na susceptibilidade ao BmNPV. Assim, nas regiões proximal, média e distal não foram observados quaisquer indícios de infecção viral (Apêndice II), em nenhum dos tempos analisados, enquanto que a ampola, na sua área de transição com a região proximal, foi verificada a infecção de suas células a partir do 6° dpi (Fig. 1).

A área de transição é uma pequena região, localizada ao término da ampola e início da região proximal do túbulo (Apêndice III), cuja morfologia celular apresentou variação contínua de pavimentosa, característica da ampola, à cilíndrica, na continuidade com a região proximal. Já a distinção entre área de transição e região proximal do túbulo foi facilmente identificada devido à variação abrupta na morfologia celular, conforme apontado na figura 1. Ampola e sua área de transição se apresentaram recobertas, na superfície apical, pela íntima e apoiadas na lâmina basal.

A presença desta área de transição na ampola do TM, ainda não havia sido descrita em *B. mori*, bem como em outros lepidópteros e, da mesma forma que outras áreas de transição presentes no corpo do inseto, é alvo do BmNPV. Ribeiro et al. (2009) relataram a infecção da cárdia, área de transição entre os intestinos anterior e médio de *B. mori*, a partir do 6° dpi. Baggio et al. (2014),

verificaram a infecção da área anterior do anel intersticial posterior do piloro, que marca a transição entre intestino médio e posterior, a partir do 5º dpi. A ocorrência de infecções por microorganismos patogênicos em epitélios de transição também tem sido relatada em humanos. Leopold and Koss (1987) analisaram a infecção da zona de transição na junção escamo-colunar do colo uterino, cujo epitélio varia de colunar a pavimentoso, ao papilomavírus, e justificam sua propensão à infecção devido às rápidas divisões celulares que ocorrem na área.

A infecção da área de transição da ampola do TM de *B. mori* é ocasionada pelos BV, que alcançam o órgão via sistema traqueal e hemolinfa, considerados importantes dispersores da infecção por AlphaBV no corpo do inseto (Soares e Ribeiro, 2005; Brancalhão et al., 2009). A presença de um sistema linfático comum nas traqueias possibilitaria um canal de passagem de vírions aos diversos tecidos, tornando mais rápida a dispersão viral (Engelhard et al., 1994).

No caso da infecção via hemolinfa, os BV devem atravessar a lâmina basal, considerada por muitos autores uma barreira semipermeável e que atua como filtro seletivo à passagem de macromoléculas (Means e Passarelli, 2010; Rahman e Gopinathan, 2004; Snodgrass e Eickwort, 1993), bem como patógenos como por exemplo os vírions (Dourado et al., 2011; Passarelli, 2011). Estudos recentes têm demonstrado que a lâmina basal é uma estrutura dinâmica e que durante as etapas de sua síntese e degradação, surgem pequenos poros, os quais permitiriam a entrada de vírions (Passarelli, 2011).

Passarelli 2011, discute ainda, que baculovírus codificam um fator de crescimento do fibroblasto viral (vFGF), conservado nos AlphaBV e envolvido na passagem de vírions pela lâmina basal. No caso da infecção de células do intestino médio, o vFGF se difunde através da lâmina basal, ativando o receptor para FGF nas células traqueais. Os eventos desta sinalização levam à ativação de caspases, que se movem para o meio extracelular e degradam a laminina da lâmina basal. Este evento possibilita a passagem de BV, acarretando na infecção das células traqueais que fazem a aeração do órgão. Este mesmo mecanismo poderia permitir a dispersão de BV para outros tecidos no corpo do inseto, como no caso da área de transição da ampola do TM.

A análise citopatológica da área de transição da ampola mostrou núcleos hipertróficos em diferentes fases do ciclo infeccioso (Fig. 2A-E), caracterizando a replicação assincrônica do vírus (Brancalhão, 2002; Rohrmann, 2013). Inicialmente foi possível identificar formação do viroplasma ou estroma virogênico, local de síntese do DNA viral e montagem do capsídeo, originando assim os nucleocapsídeos, seguido de seu envelopamento, constituindo os nucleocapsídeos envelopados ou vírions (Adams e MacClintok, 1991). Este processo de envelopamento viral ocorre a partir de microvesículas oriundas da membrana nuclear interna, modificada pela presença de proteínas virais

(Rohrmann, 2013). Vírions com um ou mais nucleocapsídeos por envelope foram visualizados no núcleo infectado (Fig. 2B), a exemplo do que foi relatado por Brancalhão et al. (2009) que observaram até 11 nucleocapsídeos por envelope.

Após a formação dos vírions ocorreu o desenvolvimento dos poliedros, entre o viroplasma e o envoltório nuclear (Fig. 2C), através da agregação dos vírions em torno da matriz protéica de poliedrina, que se cristaliza (Rohrmann, 2013). Poliedros de pequeno tamanho, sem forma geométrica definida e não envelopados foram visíveis nos núcleos susceptíveis, enquanto outros apresentaram poliedros maiores, com envelope e forma geométrica definida (Fig. 2A, C e D). Brancalhão et al. (2009) classificaram estes poliedros como imaturos e maduros, respectivamente, onde a forma geométrica é conferida pelo envelope. O envelope ou “calyx” atua na proteção dos vírions, evitando sua perda para o meio externo (Gross et al., 1994), e impede a agregação dos poliedros (Liang et al., 2013).

Variações no tamanho e na quantidade dos poliedros foram verificados nos núcleos infectados. Torquato et al. (2006) mediram os poliedros de BmNPV, cujo diâmetro variou de 2,5 a 4,5 μm , e descreveram sua forma geométrica característica de octaedro truncado, porém discutiram a presença de outras formas como a triangular, tetraédrica e hexaédrica. Hong et al. (2000) afirmam que a geometria do poliedro do BmNPV é resultado de variação genética e, ainda, conforme Cheng et al. (2012) e Katsuma et al. (1999) pode estar relacionada à ocorrência de mutações na poliedrina. Torquato et al. (2006) acrescentaram que as posições do poliedro nas preparações microscópicas, conferem angulações diferenciadas, o que amplia esta variação.

Nos núcleos infectados foram identificadas estruturas membranosas elétron-densas (Fig. 2C), que parecem ser as precursoras do envelope poliédrico (Williams et al., 1989), e regiões elétron-lucentes (Fig. 2D), ligadas a desintegração do nucleoplasma (Van Oers e Vlak, 1997). Segundo Carpentier et al. (2008) ambos os eventos estão associados à ação da proteína multifuncional, p10, que atua na montagem dos poliedros, desintegração do envoltório nuclear e lise celular.

Ao final do ciclo infeccioso, ocorreu a citólise de células infectadas liberando poliedros maduros no meio extracelular, hemocele e lúmen da ampola do TM (não mostrado). A lise celular é uma característica das infecções do BmNPV (Ribeiro et al., 2009; Baggio et al., 2014; Vessaro-Silva et al., 2014) e, devido a continuidade luminal, os poliedros do TM alcançam facilmente o intestino. Conforme Vessaro-Silva et al. (2014), um dos sinais característicos da infecção pelo BmNPV é a liberação dos vírus no meio ambiente através do ânus, possibilitando a transmissão horizontal da doença. Neste sentido, Potrich et al. (2007) e Liang et al. (2013) alertam para a

importância de medidas de controle da doença, onde, ao identificar lagartas com sinais da poliedrose nuclear, os produtores sericícolas devem eliminá-las, limitando ou evitando a dispersão do patógeno; além de realizar a desinfecção do ambiente.

Neste estudo, como já reportado, foi possível verificar a ausência de infecção nas regiões proximal (Fig. 1), assim como média e distal do TM pelo BmNPV, o que pode estar relacionado a mecanismos de defesa cujas bases genéticas ainda são pouco conhecidas (Qin et al., 2012; Fan et al., 2013). Adams e McClintock (1991) destacaram que a ausência de infecção em algumas células é devido à expressão diferencial de genes virais inseridos no genoma das células hospedeiras, uma vez que, os NPV apresentam replicação assíncrona. Já Rhormann (2013) atribui a resistência de tipos celulares específicos à expressão das proteínas, beta-N-acetylglucosaminidase-2 e aminoacylase, que influenciam na atividade da proteína de fusão do envelope viral, GP64, alterando a capacidade infectiva dos BV.

Cordeiro et al. (2008) também relataram a ausência de infecção nas células do TM de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae), infectadas com baculovírus recombinantes de AgMNPV. Porém, descreveram a degeneração precoce do TM, com alterações morfológicas no seu epitélio, que ocorre possivelmente devido à apoptose resultante do comprometimento da oxigenação e transporte de nutrientes para o TM. Este comprometimento foi devido à infecção da traqueia e hemócitos, que afeta especialmente tecidos e órgãos com alta atividade metabólica. A degeneração precoce do TM também foi verificada por outros autores (Flipsen et al, 1995; Soares e Ribeiro, 2005), o que pode estar relacionado a replicação assíncrona dos baculovírus (Brancahã et al., 2002).

Entretanto, Chakrabarty et al. (2012) mostraram a infecção do TM de *B. mori* ao BmNPV, com alterações no epitélio tecidual e a presença do vírus, OB e BV, na superfície apical das células. A resposta diferenciada à infecção do TM, em relação a este estudo, pode estar relacionada ao isolado geográfico viral utilizado, pois de acordo com Adams e McClintock (1991), Fan et al. (2007) e Liang et al. (2013), isolados geográficos podem apresentar variação genética, o que afeta sua virulência. Ainda, a raça e a linhagem de *B. mori* utilizadas são fatores a serem considerados, e que contribuem na resposta diferenciada à infecção (Yao et al., 2003).

Assim, a infecção de áreas de transição, como a da ampola do TM de *B. mori* ao BmNPV, somada a de outros alvos conhecidos, prejudica a homeostase hidroeletrólítica da hemolinfa e a eliminação das substâncias tóxicas, comprometendo o equilíbrio metabólico do inseto, com consequências na produção de seda e prejuízos ao setor sericícola.

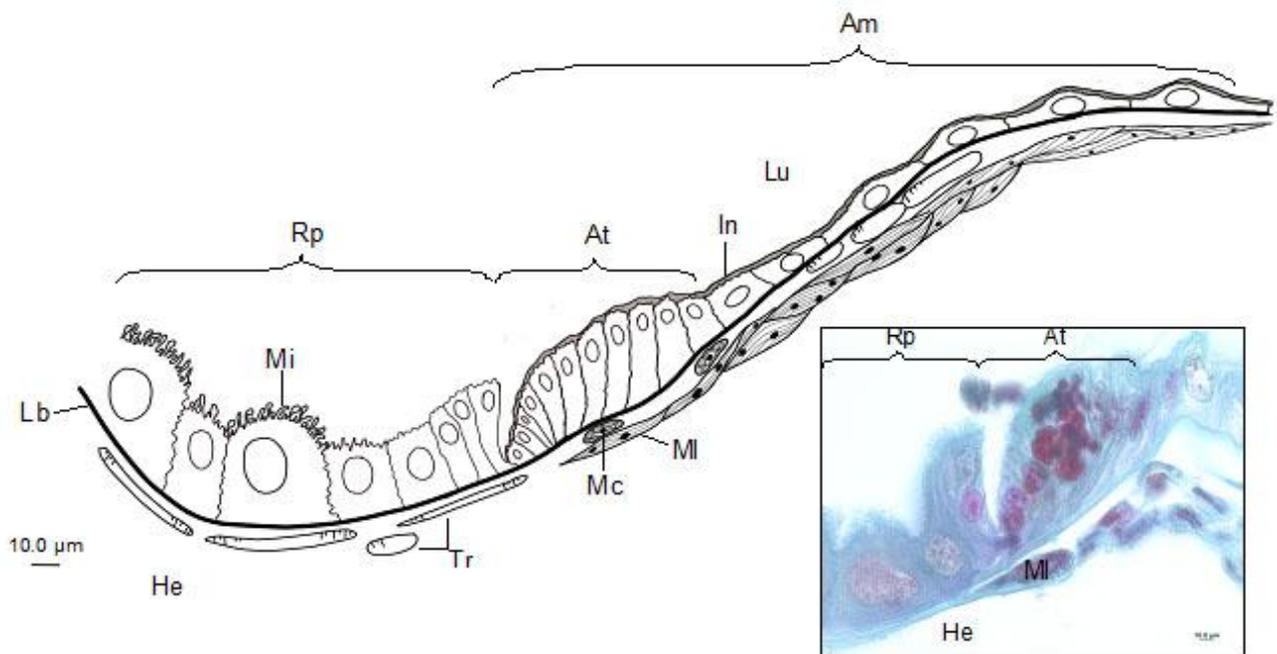


Figura 1. Representação esquemática da área de transição (At), ao término da ampola (Am) e início da região proximal (Rp) do túbulo de Malpighi de lagartas de *B. mori*, 5^o instar. Hemocele (He), lúmen do túbulo (Lu), núcleo (Nu), citoplasma (Ci), microvilosidades (Mi), íntima (In), lâmina basal (Lb), traqueia (Tr), músculo circular (Mc) e longitudinal (MI). No detalhe, eletromicrografia da área de transição da ampola com poliedros virais (em vermelho) no núcleo das células. Coloração Azan modificado.

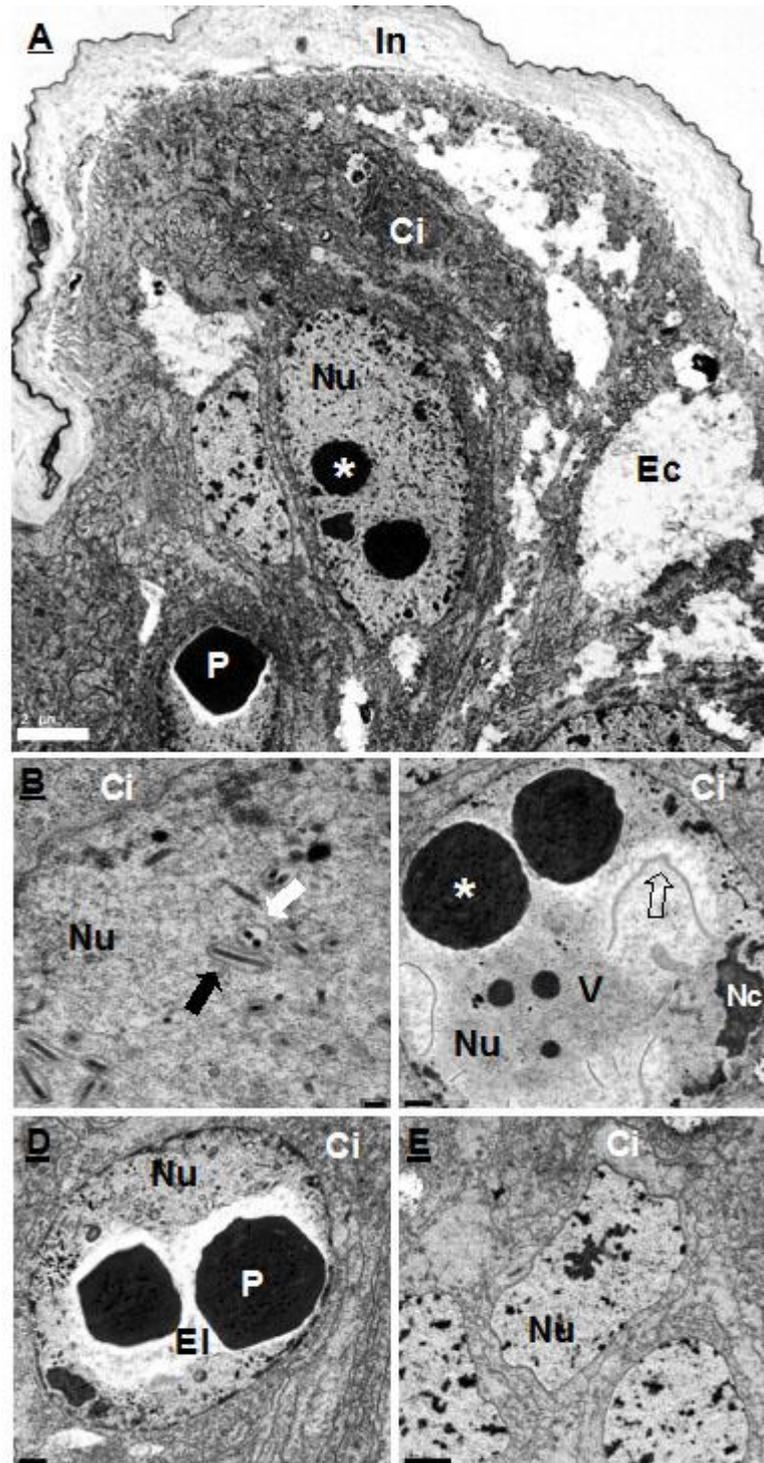


Figure 2. Electron micrographs of epithelial cells of the transition area of ampulla and the proximal region of the Malpighian tubules of fifth instar *B. mori* larvae inoculated with BmNPV, sixth dpi (A-E). In **A**, nuclei (Nu) infected with polyhedra at different stages of development, immature (*) and mature (P), cytoplasm (Cy), cytoplasmic spaces (Cs) and intima (In), 2 μ m. In **B**, nucleus with single enveloped nucleocapsid (black arrow) and multiple nucleocapsids (white arrow), 0.2 μ m. In **C**, nucleus containing viroplasm (V), immature polyhedra (*), the presence of membranous structures (hollow arrow) and nucleolus (Nc), 0.5 μ m. In **D**, mature polyhedra (P) and electron-lucent regions (EI), 0.5 μ m. In **E**, control material for comparison, cytoplasm (Cy) and nucleus (Nu), 1 μ m.

Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade da bolsa, a UNIOESTE, Mestrado de Biociências e Saúde e ao Centro de Microscopia Eletrônica UNESP-Botucatu e UEM pela infraestrutura concedida.

Referências

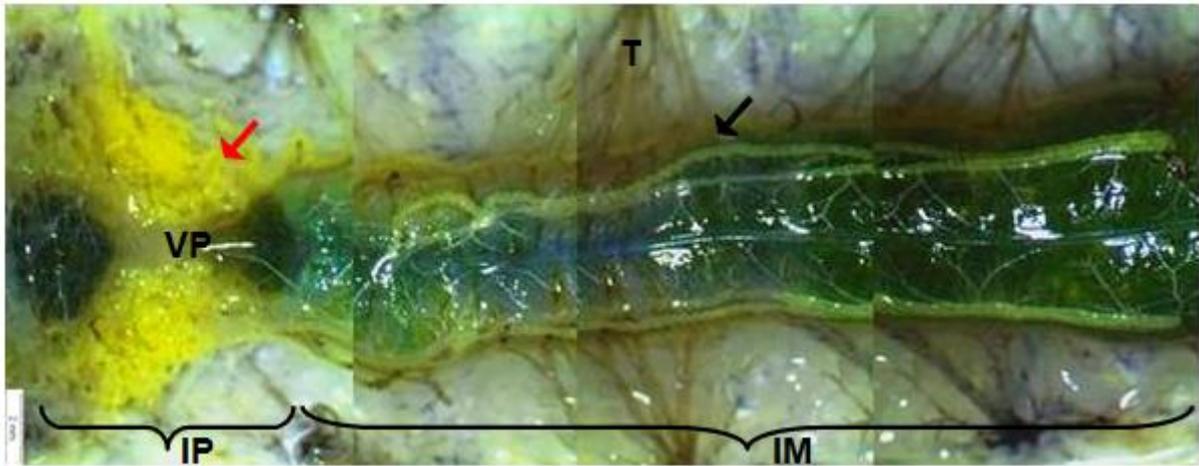
- Adams, J. R., McClintock, J. T., 1991. Baculoviridae. Nuclear Polyhedrosis Viruses. Part 1. Nuclear Polyhedrosis Viruses of Insects. In: Adams, J. R., Bonami, J. R. (Eds.), Atlas of Invertebrate Viruses. CRC Press, Florida, pp. 89-180.
- Baggio, M. P., Ribeiro, L. F., Vessaro-Silva, S. A., Brancalhão, R. M., 2014. *Bombyx mori* pylorus infection by *Alphabaculovirus*. Genet. Mol. Res. 3, 1-8.
- Beçak, W., Paulete, J. (Eds.), 1976. Técnicas de citologia e histologia, vol. I. Técnicas de citologia e histologia, Rio de Janeiro.
- Bilimoria, S. L., 1991. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. In: Kurstak, E., Viruses of invertebrates. New York:Marcel Dekker, p.1.
- Brancalhão, R. M. C., 2002. Vírus entomopatogênicos no bicho-da-seda. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. 24, 54-58.
- Brancalhão, R. M. C., Souza, V. B. V., Soares, M. A. M., 2002. Infecção causada por nucleopolyhedrovirus nas células gordurosas de *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). Arq. Inst. Biol. 69, 57-63.
- Brancalhão, R. M. C., Ribeiro, L. F. C., 2003. Citopatologia da infecção causada pelo BmNPV no tegumento de *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). Arq. Ciênc. Vet. Zool. 6, 15-20.
- Brancalhão, R. M. C., Torquato, E. F., Fernandez, M. A., 2009. Cytopathology of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) silk gland caused by multiple *nucleopolyhedrovirus*. Genet. Mol. Res. 8, 162-172.
- Carpentier, D. C. J., Griffiths, C. M., 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.
- Chakrabarty, S., Deb, S., Saha, A. K., Manna, B., 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 protein profile. Biol. Res. 14, 176-186.
- Chapman, R. F., 1998. The Insect Structure and Function. American Elsevier Publishing Company, New York.
- Cheng, R. L., Xu, Y. P., Zhang, C. X., 2012. Genome Sequence of a *Bombyx mori* *Nucleopolyhedrovirus* Strain with Cubic Occlusion Bodies. J. Virol. 86, 10245.
- Cordeiro, B. A., Tibúrcio, V. H. S., Hallwass, M., Paes, H. C., Ribeiro, B. M., Bão, S. N., 2008. Structural and ultrastructural alterations of Malpighian tubules Of *Anticarsia gemmatalis* (Hubner)

- (Lepidoptera: Noctuidae) larvae infected with different *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) recombinant viruses. *J. Invertebr. Pathol.* 98, 7–19.
- Dourado, L. A., Ribeiro, L. F. C., Brancalhão, R. M. C., Tavares, J., Borges, A. R., Fernandez, M. A., 2011. Silkworm salivary glands are not susceptible to *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *Genet. Mol. Res.* 10, 335-339.
- Engelhard, E. K., Kam Morgan, L. N. W., Washburn, J. O., 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.* 9, 3224-3227.
- Fan, Q., Li, S., Wang, L., Zhang, B., Ye, B., Zhao, Z., 2007. The genome sequence of the multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus of the Chinese oak silkworm *Antheraea pernyi*. *Virology.* 366, 304-315.
- Fermino, F., Conte, H., Falco, J. R. P., 2010. Analysis of Nucleus Activity in Malpighian Tubules of *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) Larvae by Critical Electrolyte Concentration. *Neotrop. Entomol.* 39, 568-571.
- Flipsen, J. T. M., Man, R. M. W., Kleefsman, A. W. F., Knebel-Morsdorf, K., Vlak, J. M., 1995. Deletion of the baculovirus ecdysteroid UDPglucosyltransferase gene induces early degeneration of Malpighian tubules in infected insects. *J. Virol.* 69, 4529–4532.
- Gross, C.H., Russell, R. L., Rohrmann, G. F., 1994. *Orgyia pseudotsugata* baculovirus p10 and polyhedron envelope protein genes: analysis of their relative expression levels and role in polyhedron structure. *J. Gen. Virol.* 75, 1115-1123.
- Gullan, P. J., Cranston, P. S., 2010. Internal anatomy and physiology. In: Gullan, P. J., Cranston, P. S. (Eds.), *The insects an outline of entomology.* fourth ed. Wiley-Blackwell, Malaysia, pp. 590.
- Hamm, J. J., 1966. A modified Azan staining technique for inclusion body viruses. *J. Invertebr. Pathol.* 8, 125-126.
- Hong, H. K., Woo, S. D., Choi, J. Y., Lee, H. K., Kim, Y. H. Je., Kang, S. K., 2000. Characterization of four isolates of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Arch. Virol.* 145, 2351-2361.
- Junqueira, L. C., Junqueira, L. M. M. S., 1983. *Técnicas Básicas de Citologia e Histologia.* São Paulo, Santos, pp. 123.
- Karnovsky, M. J., 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology,* Boston, 27.
- Kataoka, N., Miyake, S., Azuma, M., 2009. Aquaporin and aquaglyceroporin en silkworms, differently expressed in the hindgut and midgut of *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology,* 18, 303-314.
- Katsuma, S., Noguchi, Y., Shimada, T., Nagata, M., Kobayashi, M., Maeda, S., 1999. Molecular characterization of baculovirus *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus polyhedron mutants. *Arch. Virol.* 144, 1275-1285.
- Leopold, G., Koss, M. D., 1987. Cytologic and Histologic Manifestations of Human Papillomavirus Infection of the Female Genital Tract and Their Clinical Significance. *Cancer,* 60, 1942-1950.

- Levy, S. M., Falleiros, A. M. F., Moscardi, F., Gregório, E. A., Toledo, L. A., 2004. Morphological study of the hindgut in larvae of *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotrop. Entomol.* 33, 427-431.
- Levy, S. M., Falleiros, A. M. F., Moscardi, F., Gregório, E. A., Toledo, L. A., 2008. Ultramorphology of digestive tract of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) at final larval development. *Semina: Ciênc. Agrar.* 29, 313-322.
- Liang, X., Lu, Z. L., Wei, B. X., Feng, J. L., Qu, D., 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.
- Maranhão, Z. C., 1978. Morfologia geral interna. In: *Morfologia geral dos insetos*. Nobel, São Paulo, SP, pp. 204-217.
- Martoja, R., Ballan-Dufrançais, C., 1984. Digestive and excretory organs ultrastructure, In: King, R. C., Akai, H., *Insect ultrastructure*. New York: Plenum Press, pp. 119-268.
- Means, J. C., Passarelli, A. L., 2010. Viralfibroblast growth factor, matrix metalloproteases, and caspases are associated with enhancing systemic infection by baculoviruses. *PNAS.* 107, 9825-9830.
- Moscardi, F., 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 44, 257-289.
- 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., Zanatta, D. B., Bravo, J. P., Fernandez, M. A., 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.
- Potrich, M., Alves, L. F. A., Brancalhão, R. M. C., 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., 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., Gopinathan, K. P., 2004. Systemic and in vitro infection process of *Bombyx mori* *nucleopolyhedrovirus*. *Virus Res.* 101, 109-118.
- Ribeiro, L. F. C., Brancalhão, R. M. C., Torquato, E. F. B., Fernandez, M. A., 2009. Susceptibility of the *Bombyx mori* cardia cells to *Nucleopolyhedrovirus*, multiple subgroup, BmMNPV. *J. Invertebr. Pathol.* 100, 195- 198.
- Rigoni, G. M., Tomatake, M. E. M., Conte, H., 2004. Morphology of Malpighian Tubules of *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) at Final Larval Development. *Cytologia.* 69, 1-6.
- Rodríguez, J. L., Rosa, J. C. CL., Pinedo, E., Pinto, D., Zeddám, JL., 2002. Caracterización y utilización de un Nucleopoliedrovirus patógeno a *Spodoptera eridania* y *S. ochrea*. *Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica*, 63, 39-45.
- Rohrmann, G. F., 2013. *Baculovirus Molecular Biology*, third ed. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), NCBI.

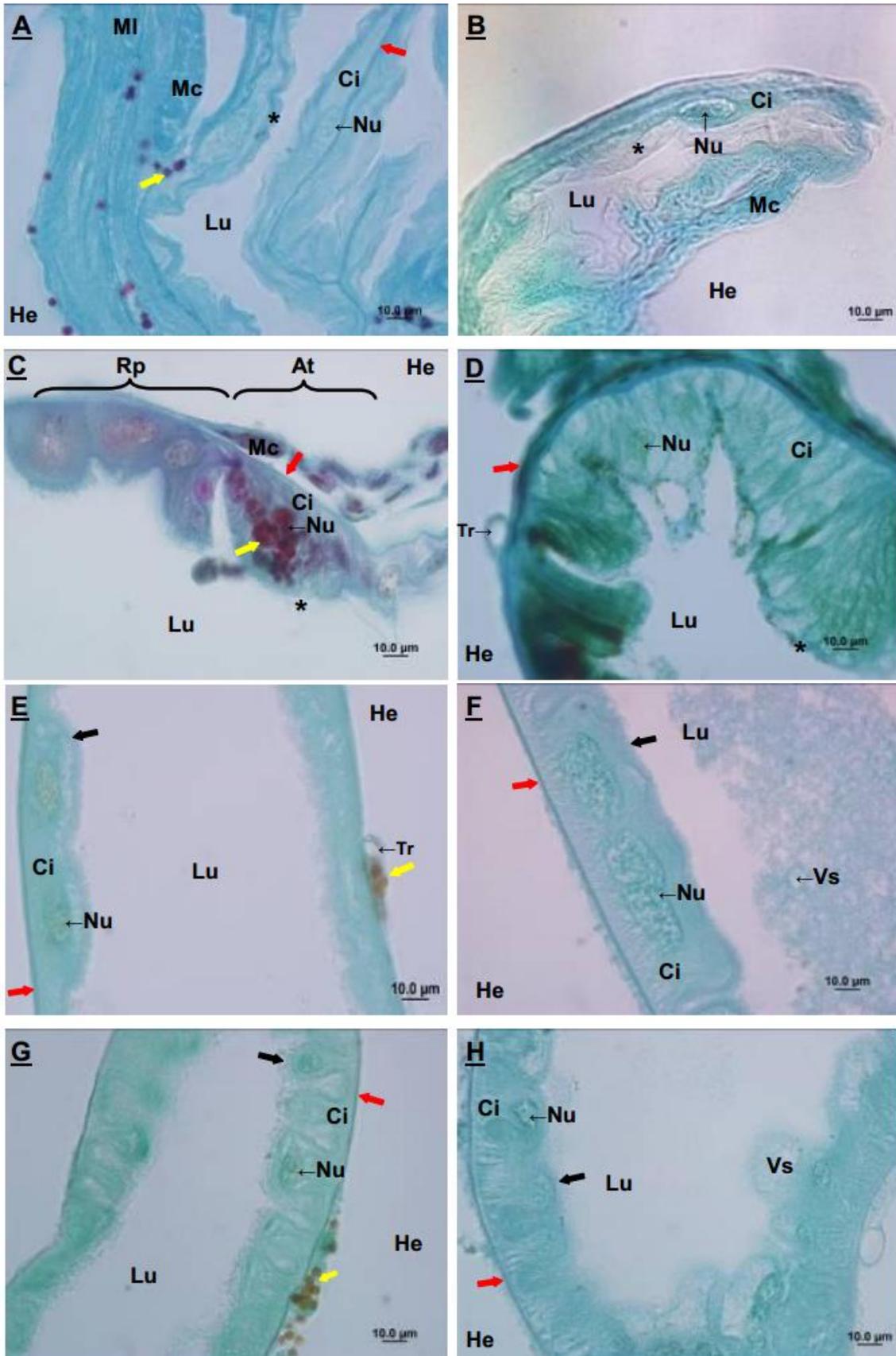
- Snodgrass, R. E., Eickwort, G. C., 1993. Principles of Insect Morphology. Cornell University Press, New York. pp. 349–356.
- Soares, J. S., Ribeiro, B. M., 2005. Pathology of *Anticarsia gemmatalis* larvae infected by two recombinant *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedroviruses. Res. Microbiol. 156, 263–269.
- Spring, J. H., Parker, S. W., Hazelton, S. R., 1988. Excretion in the house cricket (*Acheta domesticus*): ultrastructure of the ampulla and ureter. Tissue & Cell. 20, 431-442.
- Teigler, D. J., Arnott, H. J., 1972. Crystal development in the Malpighian tubules of *Bombyx mori* (L.). Tissue & Cell. 4, 173-185.
- Torquato, E. F. B., Miranda Neto, M. H., Brancalhão, R. M. C., 2006. Nucleopolyhedrovirus infected central nervous system cells of *Bombyx mori* (L.) (Lepidoptera: Bombycidae). Neotrop. Entomol. 35, 70-74.
- Van Oers, M. M., Vlak, J. M., 1997. The baculovirus 10-kDa protein. J. Invertebr. Pathol. 70, 1-17.
- Vessaro-Silva, S. A., Brancalhão, R. M. C., Baggio, M. P. D., Ribeiro, L. F. C., 2014. Differential behavior of the rectum of *Bombyx mori* in relation to experimental inoculation with *Alphabaculovirus*. Genet. Mol. Res. 13, 6885-6891.
- Yao, Q., Li, M. W., Wang, Y., Wang, W. B., 2003. Screening of molecular markers for NPV resistance in *Bombyx mori* L. (Lep., Bombycidae). J. Appl. Entomol. 127, 134-136.
- Williams, G. V., Rohel, D. Z., Kuzio, J., Faulkner, P., 1989. A Cytopathological Investigation of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus p10 Gene Function Using Insertion/Deletion Mutants. J. Gen. Virol. 70, 187-202.

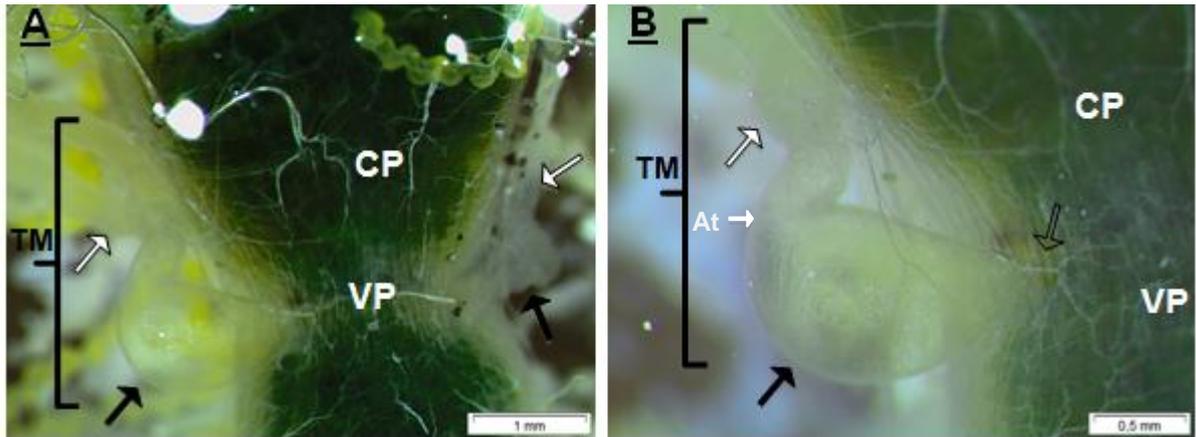
APÊNDICES:



Apêndice I: Imagem, obtida por montagem, da organização anatômica do túbulo de Malpighi: Região proximal (seta preta), Região média (seta vermelha) de lagartas de *B. mori*, 5° instar. Intestino médio (IM), parte do intestino posterior (IP) com a válvula pilórica (VP), traqueia (T).

Apêndice II: Fotomicrografias dos túbulos de Malpighi (TM) de lagartas de *B. mori*, 5° instar, grupo inoculado com BmNPV, 6° dpi (A, C, E, G e I) e controle (B, D, F, H, J), coloração Azan modificado. Hemocele (He), lúmen do TM (Lu), núcleo (Nu), citoplasma (Ci) e microvilosidades (seta preta) das células epiteliais do TM, íntima (*), lâmina basal (seta vermelha), traquéia (Tr), músculo circular (Mc) e longitudinal (MI). Em A, epitélio da ampola mostrando poliedros maduros (seta amarela) no meio extracelular, e em B, mesma região do TM para comparação. Em C, epitélio na área de transição (At) entre ampola e região proximal (Rp) do TM, com poliedros maduros no núcleo da célula epitelial, imagem em D da mesma região para comparação. Em E, epitélio da região proximal do TM, notar poliedros maduros na traquéia, e em F, mesma região para comparação, com vesículas (Vs) no lúmen do TM. Em G e I, epitélio das regiões média e distal do TM, respectivamente, com poliedros maduros no meio extracelular, H e J apresentam as mesmas regiões, respectivas, para comparação, notar vesículas brotando do ápice da célula.





Apêndice III: Imagens da área de inserção do túbulo de Malpighi (TM) de lagartas de *B. mori*, 5º instar, na válvula pilórica (VP); cone pilórico (CP), ampola (seta preta), região inicial do TM (seta branca) Em A, visão panorâmica e em B, detalhe da inserção da ampola (seta vazada) e da Área de transição ao término da ampola e início da região proximal do TM (At).

ANEXO 1:
Comprovante de envio a revista

Dear Dr. Marilucia Santorum,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Journal of Invertebrate Pathology

Corresponding Author: Rose Meire Brancalhão

Co-Authors: Marilucia Santorum, Master; Célia Beu , Doctor; Lucinéia Ribeiro, Doctor; Juliana Santos , Undergraduate;

Title: Ampullae Infection of the Malpighian tubules of Bombyx mori by Alphabaculovirus

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at rosecb@gmail.com; do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<http://ees.elsevier.com/jip/l.asp?i=29613&l=QMHNX9RO>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable authors and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,

Journal of Invertebrate Pathology

Normas da Revista Journal Invertebrate Pathology



JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

ISSN: 0022-2011

•	Description	p.1
•	Audience	p.1
•	Impact Factor	p.1
•	Abstracting and Indexing	p.1
•	Editorial Board	p.1
•	Guide for Authors	p.3

DESCRIPTION

The Journal of Invertebrate Pathology presents original research articles and notes on the induction and pathogenesis of diseases of invertebrates, including the suppression of diseases in beneficial species, and the use of diseases in controlling undesirable species. In addition, the journal publishes the results of physiological, morphological, genetic, immunological and ecological studies as related to the etiologic agents of diseases of invertebrates.

The Journal of Invertebrate Pathology is the adopted journal of the Society for Invertebrate Pathology, and is available to SIP members at a special reduced price. For more details, please visit the SIP homepage <http://www.sipweb.org/>

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our author services. Please see our Guide for Authors for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://support.elsevier.com>

AUDIENCE

Invertebrate pathologists, entomologists, pest control scientists

IMPACT FACTOR

2013: 2.601 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2014

ABSTRACTING AND INDEXING

Scopus
EMBiology

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief: L. Solter, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, Illinois, USA.

Reviews and Special Content Editor:

G. Stentiford, CEFAS, Dorset, UK

Associate Editors:

R.S. Anderson, University of Maryland, Solomons, Maryland, USA

K.S. Bateman, CEFAS, Weymouth, Dorset, UK
 J.P. Burand, University of Massachusetts, Amherst, Massachusetts, USA
 N. Crickmore, University of Sussex, Falmer, Brighton, England, UK
 S. Ford, Rutgers University, Port Norris, New Jersey, USA
 E. Genersch, Institute for Bee Research, Hohen Neuendorf, Germany
 R. Harrison, U.S. Department of Agriculture (USDA), Beltsville, Maryland, USA
 D.I. Shapiro-Ilan, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Byron, Georgia, USA
 R.J. St. Leger, University of Maryland, College Park, Maryland, USA
 R. Stouthamer, University of California at Riverside, Riverside, California, USA
 J. Vandenberg, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Ithaca, New York, USA

Editorial Board:

C.M. Adema, University of New Mexico, Albuquerque, New Mexico, USA
 B. Allam, Stony Brook University, Stony Brook, New York, USA
 C. Berry, Cardiff University, Cardiff, UK
 S.M. Bower, Fisheries and Oceans Canada, Nanaimo, British Columbia, Canada
 M. Brownbridge, University of Vermont, Burlington, Vermont, USA
 D. Bruck, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Corvallis, Oregon, USA
 J.S. Cory, Simon Fraser University, Burnaby, British Columbia, Canada
 J.R. de Miranda, Sveriges Lantbruks Universitet (SLU), Uppsala, Sweden
 J. Ferré, Universitat de València, Burjassot, Valencia, Spain
 I. Fries, Sveriges Lantbruks Universitet (SLU), Uppsala, Sweden
 C. Hauton, University of Southampton, Southampton, England, UK
 J. Jehle, Agricultural Service Center Pala, Neustadt a.d. Weinstr., Germany
 N.O. Keyhani, University of Florida, Gainesville, Florida, USA
 L.A. Lacey, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Wapato, Washington, USA
 C. Lambert, Institut Universitaire Européen de la Mer, Plouzane, France
 C.-F. Lo, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC
 C.J. Lucarotti, Canadian Forest Service, Fredericton, New Brunswick, Canada
 S. Paskewitz, University of Wisconsin at Madison, Madison, Wisconsin, USA
 J.K. Pell, J.K. Pell Consulting, Luton, Bedfordshire, England, UK
 S. Rehner, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Beltsville, Maryland, USA
 J.-L. Schwartz, Université de Montréal, Montréal, Canada
 J.D. Shields, College of William and Mary, Gloucester Point, Virginia, USA
 H. Small, Virginia Institute of Marine Science, Gloucester Point, Virginia, USA
 I. Söderhäll, Uppsala Universitet, Uppsala, Sweden
 S.N. Thompson, University of California at Riverside, Riverside, California, USA
 N. Waterfield, University of Bath, Claverton Down, Bath, UK

Founding Editor

E.A. Steinhaus
 Editor Emeritus: T.C. Cheng

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

The Journal of Invertebrate Pathology publishes articles on all aspects of original research concerned with the causation and manifestation (including immunologic responses) of infectious and noninfectious diseases of invertebrates, the suppression of such diseases in beneficial species, and the use

of these pathogens in controlling undesirable species such as agricultural pests and vectors of pathogens transmissible to other organisms. In addition, this journal publishes the results of biochemical, physiological, morphological, genetic, and ecological studies related to the etiologic agents of diseases of invertebrates. The journal is particularly dedicated to the publication of contributions of a basic and fundamental nature, although it will accept suitable articles pertaining to the applications of invertebrate pathology. The editor-in-chief and members of the Editorial Board will examine contributions from any qualified worker in any country of the world.

Types of paper

The Journal of Invertebrate Pathology publishes the following types of articles:

Regular Articles. Manuscripts for Regular Articles are full-length papers that report the results of a large and well-defined study. There is no page limit, but this type of article is usually in the range of eight published pages.

Short Communications. Manuscripts for Short Communications should be 1500 or fewer words and contain not more than two illustrations or two tables, or one of each. Manuscripts should contain an abstract of not more than 100 words. References should be kept to a minimum and should be styled according to the guidelines in the section on References.

Minireviews. Manuscripts for Minireviews typically range from four to six published pages and provide a succinct review of important and recent developments in any field of invertebrate pathology.

Forum Articles. Manuscripts for Forum Articles typically range from one to four published pages and focus on a topical issue in invertebrate pathology. It is the intent of Forum Articles to stimulate discussion of controversial or unresolved issues relevant to all aspects of invertebrate pathology.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding

author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, Who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open access and Subscription.

For subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:

Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)

- No open access publication FEE

All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

To provide open access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The open access publication fee for this journal is \$3000, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the Word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source

files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.

- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Illustration services

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing

in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically IF necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

Additional information

(To appear before "Preparation of Supplementary Material")

Identification of Pathogens. Pathogens should be identified using current methods accepted for each pathogen group. Molecular methods should be used to identify pathogens being described for the first time where these methods are standard for the field.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the Publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal Physics Letters B): <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please upload all of your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89/p/8045/.

You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.