

CITOPATOLOGIA DA INFEÇÃO CAUSADA POR BmNPV NO TEGUMENTO DE *Bombyx mori* L., 1758 (LEPIDOPTERA: BOMBYCIDAE)

Rose Meire Costa Brancalhão
Lucinéia Fátima Chasko Ribeiro

BRANCALHÃO¹, R.M.C.; RIBEIRO², L.F.C. Citopatologia da infecção causada por BmNPV no tegumento de *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 6(1): p. 15-20, 2003.

RESUMO: Lagartas de *Bombyx mori* foram infectadas oralmente com uma suspensão de *Nucleopolyhedrovirus* (BmNPV), isolado no Paraná. Em diferentes tempos pós-inoculação, quarenta e oito lagartas foram anestesiadas, dissecadas e o tegumento foi retirado e fixado em DuBosq Brasil. O material seguiu o processamento histológico de rotina, sendo corado pela técnica de Azan modificado. As evidências de infecção do tegumento por BmNPV foram detectadas no 5º dia pós-inoculação e a citopatologia permitiu a análise de diversas etapas do processo infeccioso: o núcleo das células epiteliais se apresentou hipertrofiado com a formação do estroma virogênico ou viroplasma, local onde os vírions são produzidos; posteriormente, os vírions são ocluídos em um cristal protéico, o poliedro; ao final do processo infeccioso ocorre lise celular e liberação dos poliedros na hemolinfa. No 6º dia pós-inoculação, foi verificado, ao longo do tegumento, o desarranjo estrutural da procutícula, havendo a formação de espaços entre as lâminas sobrepostas. Estes espaços eram, por vezes, ocupados pelo vírus. Estas análises se relacionam com as manifestações sintomatológicas de fragilidade e ruptura do tegumento, que ocorrem no mesmo período. O líquido leitoso, conseqüentemente liberado, se constitui de restos de células lisadas e de poliedros (BmNPV). Assim, a ruptura do tegumento auxilia na dispersão da doença no barracão de criação do bicho-da-seda, possibilitando a infecção de outras lagartas na criação. Vinte e quatro lagartas controle, processadas da mesma maneira que o material inoculado com o BmNPV, não apresentaram nenhum sinal de infecção.

PALAVRAS-CHAVE: Lepidoptera, *Bombyx mori*, tegumento, *Nucleopolyhedrovirus*, citopatologia, histopatologia

CYTOPATHOLOGY OF BmNPV INFECTION IN THE INTEGUMENT OF *Bombyx mori* L., 1758 (LEPIDOPTERA: BOMBYCIDAE)

BRANCALHÃO, R.M.C.; RIBEIRO, L.F.C. Cytopathology of BmNPV in the integument of *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 6(1): p. 15-20, 2003.

ABSTRACT: *Nucleopolyhedrovirus* isolated from infected *Bombyx mori* larvae (BmNPV) in State of Paraná, Brasil was used to inoculate healthy fifth-instar larvae. Samples of integument tissue were removed from forty-eight larvae at different times, and processed for light microscopy by routine techniques. The experiment included both inoculated and non-inoculated larvae (control). Azan staining revealed in the inoculated material different stages in the pathology, indicating the asynchronous replication of the BmNPV. The infection of epidermal cells could be detected as early as at the fifth day after inoculation. Initially, it is characterized by nuclear hypertrophy and the presence of virogenic stroma, where the virions are produced. In a second stage, the virions appear occluded into protein crystals, the polyhedra. In a more advanced stage of viral replication, the cells undergo lysis and liberate large numbers of polyhedra into the hemolymph. The control material did not present any signs of infection. Spaces on the procuticle were formed on the sixth day after inoculation and sometimes they were occupied by BmNPV. These spaces affected the structure of cuticle that becomes fragile and easily torn, releasing a milky fluid rich in lysis cells and NPV. Thus, the disruption of the integument spread the disease over the shack of the silkworm culture.

KEY WORDS: *Bombyx mori*, integument tissue, *Nucleopolyhedrovirus*, pathology

CITOPATOLOGIA DE LA INFECCIÓN CAUSADA POR BmNPV EN EL TEGUMENTO DE *Bombyx mori* L., 1758 (LEPIDOPTERA: BOMBYCIDAE)

BRANCALHÃO, R.M.C.; RIBEIRO, L.F.C. Citopatologia de la infección causada por BmNPV en el tegumento de *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 6(1): p. 15-20, 2003.

RESUMEN: Larvas de *Bombyx mori* fueron infectadas oralmente con una suspensión de *Nucleopolyhedrovirus* (BmNPV) extraído en el Estado de Paraná. En diferentes tiempos pós-inoculación las larvas fueron anestesiadas, dissecadas, y el tegumento fue retirado y fijado en DuBosq Brasil. El material siguió el procesamiento histológico de rutina, siendo coloreado por la técnica de Azan modificado. Las evidencias de infección del tegumento por BmNPV fueron detectadas en el 5º día pós-inoculación, y

¹ Professora Doutora. Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel, CCBS/Ciências Biológicas. Rua Universitária, 1619 - Jardim Universitário CEP: 85.814-110, Cascavel, PR, Brasil; e-mail: rosebrancalhao@uol.com.br.

² Universidade Estadual de Maringá - mestrandia em Biologia Celular.

la citopatología permitió el análisis de diversas etapas del proceso infeccioso: el núcleo de las células epiteliales se presentó hipertrofiado con la formación del estroma virogénico o viroplasma, local donde los viriones son producidos; posteriormente, los viriones son ocluídos en un cristal proteico, el poliedro; al final del proceso infeccioso ocurre ruptura celular y liberación de los poliedros en la hemolinfa. Al 6º día pós-inoculación fue verificado, a lo largo del tegumento, el desprendimiento estructural de la procutícula, habiendo formación de espacios entre las láminas sobrepuestas. Estos espacios eran, por veces, ocupados por el virus. Estos análisis se relacionan con las manifestaciones sintomatológicas de fragilidad y ruptura del tegumento, que ocurren en el mismo período. El líquido lechoso, consecuentemente liberado, está constituido de células lisadas y de poliedros (BmNPV). Así, la ruptura del tegumento auxilia en la dispersión de la enfermedad en el refugio de creación del gusano de seda, posibilitando la infección de otras larvas en la creación. Larvas control, procesadas de la misma manera que el material inoculado con el BmNPV, no presentaron ninguna señal de infección.

PALABRAS-CLAVE: Lepidoptera, *Bombyx mori*, tegumento, *Nucleopolyhedrovirus*, citopatología, histopatología

Revisão de Literatura

No Brasil, a sericicultura é uma importante atividade agro-industrial. O País é o quarto produtor mundial de casulos verdes¹ e de fios de seda. A cadeia produtiva da seda apresenta um faturamento bruto anual da ordem de US\$ 129 milhões, a maior parte na forma de divisas auferidas com exportações, uma vez que 97% da produção de fios de seda é destinada a este mercado. O Paraná é o principal Estado produtor, concentrando 83,59% da produção nacional. Atualmente, 241 municípios paranaenses são produtores de casulos verdes, havendo 7.634 criadores nesses municípios, os quais exploram uma área de 34 mil hectares de amoreira, e geram mais de 35.000 empregos diretos na zona rural (WATANABE *et al.*, 2000).

Um sério problema para a atividade sericícola é a incidência de doenças nas criações do bicho-da-seda. Dentre os agentes patogênicos já descritos na literatura científica, citam-se protozoários, vírus, fungos e bactérias. Doenças causadas por estes patógenos ocorrem em quase todas as áreas de criação do mundo. As doenças virais são responsáveis por quase 70% das perdas na sericicultura, quando não tomadas medidas profiláticas apropriadas (FONSECA & FONSECA, 1986; SENGUPTA *et al.*, 1990).

Baculoviridae é uma importante família de vírus entomopatogênicos. Taxonomicamente apresenta-se dividida em dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV). O NPV é constituído por uma molécula de DNA circular de fita dupla, associada com proteínas do capsídeo, formando o nucleocapsídeo (BILIMORIA, 1991; MURPHY *et al.*, 1995; RIBEIRO *et al.*, 1998).

No Brasil, NPV infectando lagartas de *B. mori* foram detectados em 1976, por GATTI *et al.*, e em 1979, por ONGARELLI, ambos no Estado de São Paulo. No Estado do Paraná, maior produtor de seda no Brasil, são poucos os trabalhos científicos sobre o NPV.

BRANCALHÃO, em 1998, realizou uma série de estudos verificando a ocorrência de NPV infectando lagartas de *B. mori*.

Os NPV caracterizam-se por serem poliorganotróficos (GRANADOS & WILLIAMS, 1986; SENGUPTA *et al.*, 1990; BILIMORIA, 1991) e a principal via de entrada é a oral, pela ingestão de alimento contaminado. As folhas da amoreira, alimento do bicho-da-seda, são digeridas e absorvidas no intestino médio (CHAPMAN, 1998) e os vírus, porventura presentes nestas folhas, penetram nas células epiteliais do

tubo digestivo (GRANADOS & LAWLER, 1981), alcançam a hemolinfa e vão contaminar outras células do corpo do inseto (GRANADOS & WILLIAMS, 1986; ADAMS & MCCLINTOCK, 1991; BRANCALHÃO, 1998).

Estudos conduzidos por CIANCIARULLO *et al.* (1977), SENGUPTA *et al.* (1990) e BRANCALHÃO (1998) revelaram que o tegumento é um tecido alvo da infecção pelo BmNPV, que se torna frágil, rompendo-se com frequência. Além disso, o primeiro sinal característico da infecção por baculovírus em lagartas é a alteração na coloração do tegumento, que passa de branco, nas lagartas sadias, para branco-amarelado, nas infectadas (GRANADOS & WILLIAMS, 1986; HANADA & WATANABE, 1986; BRANCALHÃO, 1998). Estas características são úteis no diagnóstico da doença; contudo, não há dados referentes à citopatologia da infecção causada pelo BmNPV no tegumento das lagartas de *B. mori*, bem como sua relação com os sinais manifestados.

Tendo em vista a importância da atividade sericícola para o Brasil, não só em termos econômicos, mas também sociais, uma vez que auxilia na fixação do homem no campo; o presente trabalho teve como objetivos: analisar a citopatologia da infecção causada pelo isolado geográfico do BmNPV no Estado do Paraná e verificar o tempo de infecção nas células do epitélio tegumentar de *B. mori*.

Material e Métodos

Os experimentos foram realizados com lagartas híbridas do bicho-da-seda da amoreira, *Bombyx mori*, obtidas de indústrias sericícolas do Estado do Paraná. Lagartas do segundo estágio de desenvolvimento foram mantidas em sala climatizada, temperatura variando entre 23 e 26 °C e umidade entre 60 e 70%, e alimentadas três vezes ao dia com folhas de amoreira, limpas e isentas de agrotóxicos, obtidas de plantação no campus da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

No quinto estágio, as lagartas foram alimentadas com folhas de amoreira previamente pulverizadas com uma suspensão do vírus BmNPV. A suspensão viral utilizada foi de $2,26 \times 10^6$ COP/ml (COP= corpos de oclusão poliédricos), conforme determinado por contagem em câmara de Neubauer.

Em diferentes tempos pós-inoculação (p.i.), começando no segundo dia até o nono dia, com intervalos de 24 horas, as lagartas foram anestesiadas e mortas com éter etílico e dissecadas sobre placas de Petri com parafina

¹ Casulos verdes- casulos coletados pelo produtor, nos barracões de criação do bicho-da-seda, e encaminhados aos entrepostos de compra das indústrias de fiação. Estes ainda apresentam as crisálidas vivas. No entreposto os casulos verdes são desidratados em um secador, matando as crisálidas.

solidificada. O fixador DuBosq Brasil (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1983) foi gotejado continuamente durante o processo de abertura do tegumento. Segmentos do tegumento foram rapidamente retirados, seccionados transversal e longitudinalmente e colocados em frascos rotulados contendo o líquido fixador, por 24 horas.

Antes de iniciar a desidratação, os segmentos foram deixados por 24 horas em solução 0,5% de amoníaco em álcool etílico a 70%, para a retirada do excesso de ácido pícrico do fixador. Posteriormente, o material foi passado pelas etapas convencionais dos preparados histológicos, com algumas alterações referentes aos tempos: desidratação em série crescente de soluções aquosas de álcool etílico (70%, 80%, 90%, 95% e três vezes em 100%) por 40 minutos cada; diafanização em álcool + xilol (na proporção de 1:1) por 40 minutos e xilol I, II, III por 15 minutos cada; banho em parafina a 60°C, por quatro horas; emblocagem e corte, sendo que os cortes foram feitos na espessura de 4 a 5 µm em micrótomo; desparafinização das lâminas em xilol I, II e III e hidratação na série decrescente de soluções aquosas de álcool etílico (100% por 3 vezes, 95%, 90%, 80% e 70%) por 3 minutos cada; lavagem em água corrente (10 minutos), seguida de duas lavagens em água destilada (10 segundos cada).

As lâminas assim obtidas foram coradas pela técnica de Azan, modificada para corpos de oclusão virais, segundo HAMM (1966). Foram realizadas três repetições do experimento de inoculação, onde foram utilizadas 30 lagartas por repetição, sendo que as lâminas foram confeccionadas a partir de duas lagartas para cada intervalo de tempo estudado, tendo sido produzidas 20 lâminas por intervalo de tempo e 480 lâminas no total.

Lâminas controle, obtidas de lagartas sadias de quinto estágio, foram submetidas às mesmas preparações descritas anteriormente. Neste caso, foi utilizada uma lagarta por intervalo de tempo, a partir da qual foram produzidas duas lâminas, totalizando 480 lâminas controle.

Os sinais manifestados pelas lagartas doentes foram observados diariamente e foram comparados com os sinais da doença causada por *Nucleopolyhedrovirus* descritos em literatura (GRANADOS & WILLIAMS, 1986; HANADA & WATANABE, 1986; FONSECA & FONSECA, 1986; SENGUPTA *et al.*, 1990; ADAMS & MCCLINTOCK, 1991; BRANCALHÃO, 1998).

Resultados e Discussão

As análises citopatológicas permitiram a detecção da infecção causada pelo BmNPV nas células do epitélio tegumentar a partir do quinto dia p.i. Os núcleos das células infectadas apresentavam-se hipertrofiados e em diferentes graus de infecção, indicando uma replicação assíncrona do vírus (ADAMS & MCCLINTOCK, 1991; BRANCALHÃO, 1998). Nestes núcleos, a primeira estrutura viral visível é o viroplasma ou estroma virogênico (EV) (figura 1-a). No EV os nucleocapsídeos são produzidos sem envelope e só posteriormente é que adquirem o envelope, constituindo então os vírions (GRANADOS & LAWLER, 1981; FRASER, 1986; GRANADOS & WILLIAMS, 1986; ADAMS & MCCLINTOCK, 1991; BRANCALHÃO, 1998) não visível na microscopia ótica. O mecanismo preciso de envelopamento

dos nucleocapsídeos não é bem conhecido (BILIMORIA, 1991; HONG *et al.*, 1997).

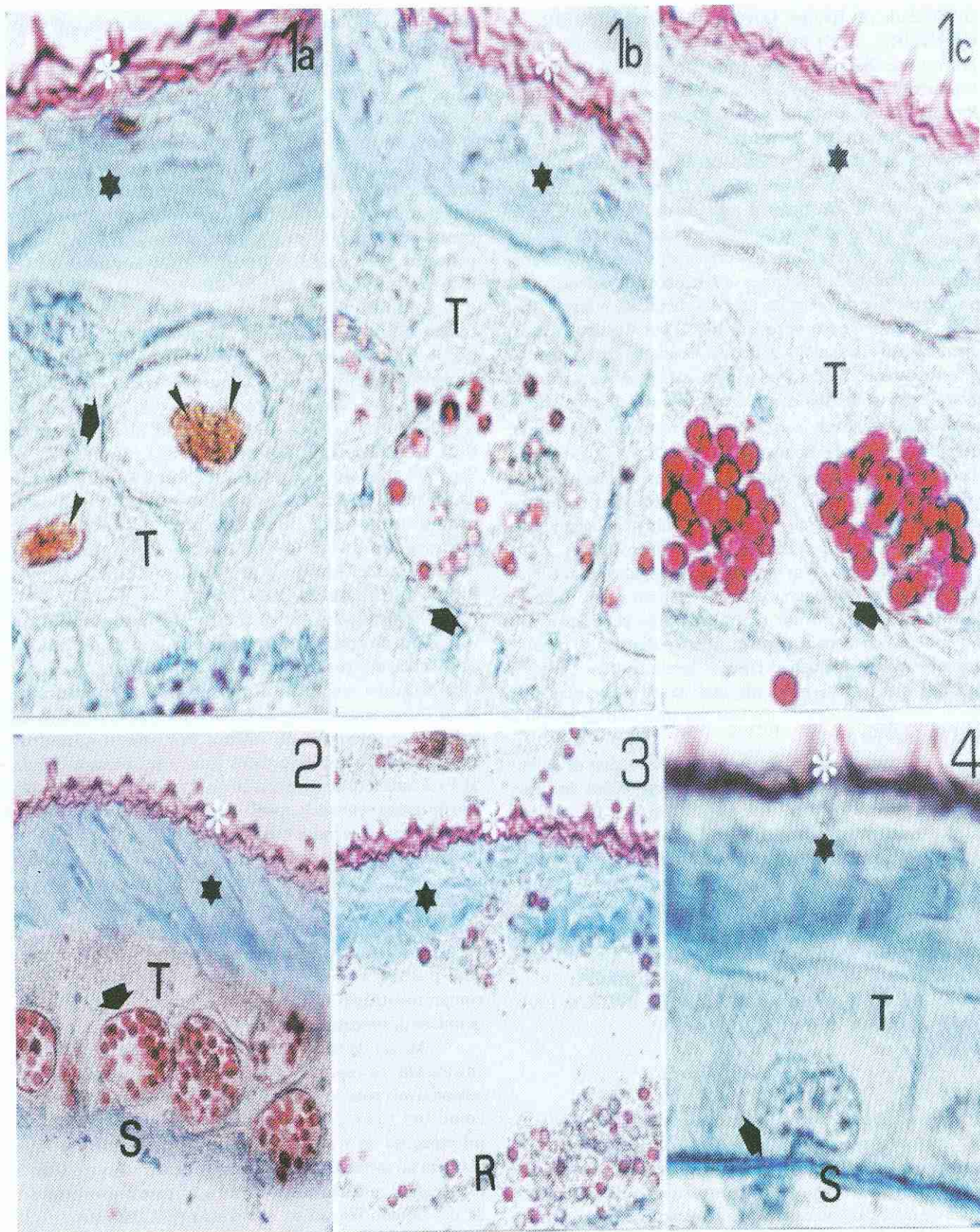
Quando a síntese dos nucleocapsídeos está completa, começa a formação e o desenvolvimento dos poliedros no núcleo das células infectadas. Neste caso, o EV se apresentava envolto por corpos de oclusão de forma poliédrica, ou poliedros, corados em vermelho (figuras 1-b e c). Os poliedros se apresentavam de tamanhos variáveis, indicando diferentes estágios do desenvolvimento da estrutura poliédrica, que cresce pelo acúmulo e cristalização contínuos da proteína poliedrina (BLISSARD & ROHRMANN, 1990; ADAMS & MCCLINTOCK, 1991; BRANCALHÃO & SOARES, 2000).

Ao final do ciclo reprodutivo do BmNPV, o núcleo celular mostrava-se repleto de poliedros maduros (figura 1-c). Quando maduros, os poliedros são maiores, apresentam formato poliédrico e adquirem um envelope. Cada poliedro apresentava-se constituído por muitos vírions (BLISSARD & ROHRMANN, 1990; ADAMS & MCCLINTOCK, 1991; BRANCALHÃO, 1998; BRANCALHÃO & SOARES, 2000). Segue-se a citólise e, conseqüente, liberação dos poliedros na hemolinfa (figura 3). Todas estas etapas são condizentes com os relatos da literatura para a replicação de *Nucleopolyhedrovirus* (GRANADOS & WILLIAMS, 1986; ADAMS & MCCLINTOCK, 1991; BRANCALHÃO, 1998; BRANCALHÃO & SOARES, 2000).

Somando-se a estas alterações citopatológicas foi verificado, no epitélio tegumentar, um desarranjo estrutural da cutícula, que perde a disposição característica de lâminas sobrepostas na região da procutícula (endo e exocutícula). Neste caso, espaços irregulares são observados ao longo do epitélio tegumentar do inseto. Por vezes, poliedros extracelulares foram detectados entre estes espaços (figura 3). Esta característica histopatológica pode ser explicada pelo fato de que as células do epitélio tegumentar são responsáveis pela secreção e manutenção da cutícula. A região da procutícula é constituída pelo sistema proteína-quitina, intimamente ligados formando lâminas horizontais (figura 4) (CHAPMAN, 1998). Na infecção por *Nucleopolyhedrovirus*, o metabolismo destas células encontra-se totalmente alterado e mobilizado para a formação das partículas virais. Como conseqüência, há o comprometimento na síntese e secreção dos constituintes químicos da procutícula, que perde sua integridade estrutural.

Apesar de não se ter observado alterações nítidas na epicutícula, os espaços na procutícula são, provavelmente, responsáveis pela desestabilização da estrutura do tegumento como um todo. Estas análises se relacionam com as informações de fragilidade e ruptura do tegumento, que ocorrem no mesmo período, entre o 6º e o 8º dias p.i. Com a ruptura do tegumento ocorre a liberação, para o meio exterior, de um líquido leitoso ou amarelado (BILIMORIA, 1991; BRANCALHÃO, 1998).

Outra manifestação relacionada ao tegumento é a alteração na sua coloração, que passa de branco para branco-amarelado (GRANADOS & WILLIAMS, 1986; HANADA & WATANABE, 1986; BRANCALHÃO, 1998). Isto ocorre entre o 4º e o 5º dias p.i., sendo o primeiro sinal característico da doença. Este sinal relaciona-se diretamente com a infecção das células gordurosas, que ocorre no mesmo período. A infecção destas células por *Nucleopolyhedrovirus* acarreta



Figuras 1 a 4 - Fotomicrografias do tegumento de lagartas de *B. mori* de 5º estágio, no 7º dia p.i. com BmNPV. Coloração: Azan modificado. Observe várias células em diferentes fases da infecção; os poliedros apresentam-se corados em vermelho no interior das células epidérmicas e no meio extracelular. Figura 1 **a**, núcleos hipertrofiados, a cabeça de seta aponta o estroma virgênico; **b** núcleo hipertrofiado com os poliedros em formação (menores); e **c**- com poliedros maduros (maiores); 1.000 X. Figura 2, núcleos infectados com poliedros maduros; 400 X. Figura 3, aspecto do tegumento após a lise celular, observar os poliedros no meio extracelular e nos espaços da cutícula; 400 X. Figura 4, material controle para comparação; 1.000 X. Envoltório nuclear (seta), estroma virgênico (cabeça de seta), citoplasma (T), restos celulares (R), membrana basal (S), epicutícula (*), endocutícula (-)

em um aumento no conteúdo de fosfolípidios, colesterol e ácidos graxos livres na hemolinfa, que somado à presença dos poliedros torna-se leitosa ou amarelada, conferindo, assim, o aspecto branco-amarelado ao tegumento (ADAMS & MCCLINTOCK, 1991; BRANCALHÃO, 1998). Com o avançar da doença, ocorre a infecção de um maior número de células, inclusive as do epitélio tegumentar, acentuando esta característica.

Os poliedros são estruturas de resistência, que persistem por longo tempo no meio ambiente (DAVID, 1975; LONGWORTH, 1973; CIANCIARULLO *et al.*, 1977; LEWIS & ROLLINSON, 1978; BLISSARD & ROHRMANN, 1990; ADAMS & MCCLINTOCK, 1991; BILIMORIA, 1991). Assim, torna-se essencial, que uma vez detectada a presença deste vírus, as lagartas infectadas sejam imediatamente eliminadas (HANADA & WATANABE, 1986).

Além disso, estas lagartas, enquanto vivas, representam um foco potencial do vírus, eliminando poliedros infectivos através da boca, do ânus (GRANADOS & WILLIAMS, 1986; SENGUPTA *et al.*, 1990; ADAMS & MCCLINTOCK, 1991; BILIMORIA, 1991), e do tegumento rompido. Estes poliedros aderem-se facilmente às folhas da amoreira, possibilitando sua ingestão por lagartas sadias; e uma vez que a via oral é a principal via de entrada dos NPV (LONGWORTH, 1973; SENGUPTA *et al.*, 1990; VASCONCELOS, 1996; BRANCALHÃO, 1998), estes podem reiniciar seu processo infeccioso no novo hospedeiro. Soma-se a isto o deslocamento aleatório e o geotropismo negativo exibido pelas lagartas infectadas, alterações comportamentais comuns nas infecções pelo baculovírus (GRANADOS & WILLIAMS, 1986; HANADA & WATANABE, 1986; BRANCALHÃO, 1998), o que auxilia ainda mais na dispersão da doença dentro dos barracões de criação.

Lâminas controle provenientes de lagartas sadias de 5º estágio e processadas da mesma forma descrita para as infectadas não apresentaram poliedros, nem EV, ou quaisquer estruturas ou componentes que indicassem infecção viral, em nenhum dos tempos analisados (figura 4).

Conclusões

- O BmNPV isolado no Estado do Paraná, Brasil, infecta as células epiteliais do tegumento de *B. mori*.
- As lesões celulares causadas pelo BmNPV apresentam os mesmos aspectos citopatológicos descritos para outros tecidos em *B. mori*.
- A ruptura do tegumento, manifestação característica das infecções pelo BmNPV, relaciona-se com a infecção das células do epitélio tegumentar. Isto forma espaços detectáveis na epicutícula que, possivelmente, desestabilizam a estrutura do tegumento como um todo, que se rompe.

Agradecimentos

À Fundação Banco do Brasil, pelo suporte financeiro, à EMATER - Paraná, à ABRASEDA (Associação Brasileira dos Criadores de Seda), e às empresas de fiação de seda: COCAMAR, KANEBO SILK DO BRASIL S. A. e FIAÇÃO DE SEDA BRATAC S. A., pelo fornecimento das lagartas de *B. mori*.

Referências

ADAMS, J.R.; MCCLINTOCK, J.T. Baculoviridae. Nuclear polyhedrosis viruses. Part 1. Nuclear polyhedrosis viruses of insects.

In: Adams, J.R.; Bonami, J.R. (Eds.) *Atlas of invertebrate viruses*. Florida: CRC Press, 1991. p.89-180.

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

BLISSARD, G.W. & ROHRMANN, G.F. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annu. Rev. Entomol.*, v.35, p.127-355, 1990.

BRANCALHÃO, R.M.C. *Nucleopolyhedrovirus em Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae), no Estado do Paraná. Curitiba, 1998. 99p. [Tese (Doutorado) - Departamento de Zoologia UFPR].

BRANCALHÃO, R.M.C.; SOARES, M.A.M. Ciclo reprodutivo do *Nucleopolyhedrovirus*, isolado de *Bombyx mori*. *Braz. J. morphol. Sci.*, 17 (supl.): 155, 2000.

CHAPMAN, R.F. *The insect structure and function*. New York: American Elsevier Publishing Company, 1998. p.415-438.

CIANCIARULLO, A. M.; ABREU, O. C.; CAMPOS, A. R.; OLIVEIRA, J. M.; JULY, J. R. Flacidez infecciosa, primeira ocorrência em *Bombyx mori* L., no Brasil. *O Biológico XLIII*: 199-202, 1977.

DAVID, W.A.L. The Status of Viruses Pathogenic for Insects and Mites. *Annu. Rev. Entomol.* 20: 97-117, 1975.

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

GATTI, I.M.; SILVA, D.M.; MATYS, J.C.; NOGUEIRA, N.L.; OLIVEIRA, A. R. Constatação ao microscópio eletrônico de poliedros em bicho da seda (*Bombyx mori* L.). V Colóquio Brasileiro de Microscopia Eletrônica. Piracicaba, p.88-89, 1976.

GRANADOS, R.R.; LAWLER, K.A. *In Vitro* pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. *Virology* 108: 297-308, 1981.

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

HAMM, J.J. A modified Azan staining technique for inclusion body viruses. *J. Invertebr. Pathol.* 8: 125-126, 1966.

HANADA, Y.; WATANABE, J.K. *Manual de criação do bicho-da-Seda*. COCAMAR, 1986. 224p.

HONG, T.; SUMMERS, M.D.; BRAUNAGEL, S.C. N-Terminal Sequences from *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Envelope Proteins ODV-E66 and ODV-E25 are Sufficient to Direct Reporter Proteins to the Nuclear Envelope, Intranuclear Microvesicles and the Envelope of Occlusion Derived Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4050-4055, 1997.

JUNQUEIRA, L.C.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. *Técnicas básicas de citologia e histologia*. São Paulo: Santos, 1983. 123p.

LEWIS, F. B.; ROLLINSON, W. D. Effect of storage on the virulence of gypsy moth nucleopolyhedrosis inclusion bodies. *J. Econ. Entomol.* v.71, p.719-722, 1978.

LONGWORTH, J.F. Virus and lepidoptera. Chapter 21. In: Gibbs, A. J. *Viruses and invertebrates*. North-Holland Research Monographs Frontiers of Biology. Amsterdam-London: North-Holland Publishing Company, v.31, 1973.

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*. *Arch. Virol.*, v.140, 1995. Supplement, 10.

ONGARELLI, M. G. Alterações e modo de ação das partículas do vírus da poliedrose nuclear e estudos autoradiográficos em células de *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). São Paulo, 1979. 62p. [Dissertação (Mestrado) ESALQ USP].

RIBEIRO, B.M.; SOUZA, M.L.; KITAJIMA, E.W. *Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus de insetos*. In Alves, S.B. (ed.), Controle Microbiano de Insetos, FEALQ, 2ª edição, p. 481-504, 1998.

SENGUPTA, K.; KUMAR, P.; BAIG, M.; GOVINDAIAH *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.

VASCONCELOS, S.D. Alternative routes for the horizontal transmission of a nucleopolyhedrovirus. *J. Invertebr. Pathol.* 68: 269-274, 1996.

WANG, P.; GRANADOS, R.R. An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 6977-6982, 1997.

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

Recebido para publicação em 10/02/2002.

Received for publication on 10 February 2002.

Recibido para publicación em 10/02/2002.

Aceito para publicação em 09/10/2002.

Accepted for publication on 09 October 2002.

Acepto para publicación en 09/10/2002.