

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

LUCAS COSTA CABRAL

**ANÁLISE MORFO-HISTOPATOLÓGICA E EXPRESSÃO DE ESTERASES EM
*Bombyx mori*L. INFECTADOS COM *Nucleopolyhedrovirus* E SUBMETIDOS AO
FÁRMACO ANTIVIRAL Bm5**

Maringá
2020

LUCAS COSTA CABRAL

ANÁLISE MORFO-HISTOPATOLÓGICA E EXPRESSÃO DE ESTERASES EM *Bombyx mori* L. INFECTADOS COM *Nucleopolyhedrovirus* E SUBMETIDOS AO FÁRMACO ANTIVIRAL Bm5

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração: Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Ana Silvia Lapenta
Co-orientadora: Dra. Maria Aparecida Fernandez

Maringá
2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR, Brasil)

C117a Cabral, Lucas Costa
Análise morfo-histopatológica e expressão de esterases em *Bombyx mori* L. infectados com Nucleopolyhedrovirus e submetidos ao fármaco antiviral Em5 / Lucas Costa Cabral. -- Maringá, PR, 2020.
[39] f.: il. color. figs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Silvia Lapenta.
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Fernandez.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2020.

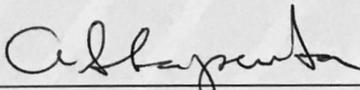
1. Bicho-da-seda. 2. Citopatologia. 3. Baculovirus. 4. Isoenzimas. 5. Catepsina. I. Lapenta, Ana Silvia, orient. II. Fernandez, Maria Aparecida, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular). IV. Título.

LUCAS COSTA CABRAL

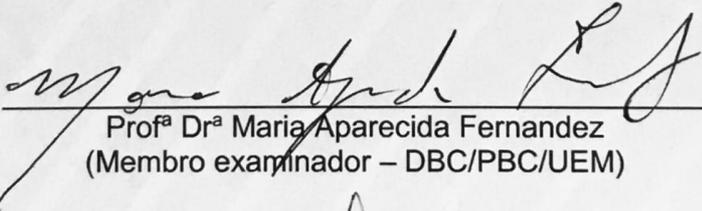
ANÁLISE MORFO-HISTOPATOLÓGICA E EXPRESSÃO DE ESTERASES EM *Bombyx mori*L. INFECTADOS COM *Nucleopolyhedrovirus* E SUBMETIDOS AO FÁRMACO ANTIVIRAL Bm5

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração: Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, sob a apreciação da seguinte banca examinadora:

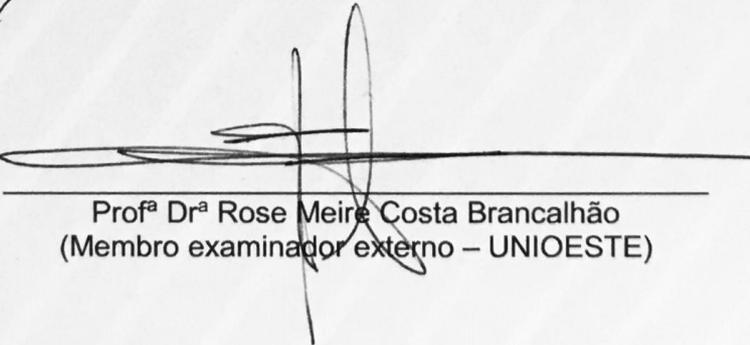
Aprovado em: 16/03/2020



Profª Drª Ana Sílvia Lapenta
(Presidente – Orientadora – DBC/PBC/UEM)



Profª Drª Maria Aparecida Fernandez
(Membro examinador – DBC/PBC/UEM)



Profª Drª Rose Meire Costa Brancalhão
(Membro examinador externo – UNIOESTE)

BIOGRAFIA

Lucas Costa Cabral filho de Cirlene von Wieding Taborda Cabral e José Marcio Costa Cabral, nasceu em Ortigueira/PR no dia 28/09/1996. Iniciou sua formação em Educação Básica em 2003 na Escola Municipal Prefeito Nilson Gorski; concluiu o Ensino Fundamental e Médio no Colégio Estadual Altair Mongruel em 2013 na cidade de Ortigueira. Em 2014 ingressou no curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas na Faculdade de Jandaia do Sul, recebendo o título de licenciado em Ciências Biológicas em 2017. Em 2018 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (com área de concentração em Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá.

Dedico este trabalho aos bravos futuros cientistas que irão consultá-lo, que eles possam se lembrar sempre, que o conhecimento é em si um poder!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas a ela vinculada, pela oportunidade da realização do curso de mestrado;

À fundação CAPES pelo apoio financeiro fornecido durante essa pesquisa;

À minha família que a todo momento da minha vida, proporcionaram-me os conhecimentos da integridade e da perseverança;

À minha orientadora Prof^a Dr^a Ana Silvia Lapenta, por ter me permitido fazer parte de seu laboratório e por todos os seus ensinamentos;

À Prof^a Dr^a Maria Aparecida Fernandez pela nossa parceria na pesquisa com *Bombyx mori* e sua dedicação ao ensino e pesquisa;

À Prof^a Dr^a Adriana Aparecida Sinópolis Gigliolli e à Prof^a Dr^a Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro pelos ensinamentos sobre as técnicas morfológicas de insetos.

Aos meus colegas e professores do Laboratório de Genética Animal, pela convivência e pelo aprendizado;

Agradeço em especial à Jully Jesús de La Cruz Cisneros, pela amizade e auxílio durante a execução desse trabalho;

À empresa de Fiação de Seda BRATAC, pelo fornecimento das lagartas de *B. mori*, tornando possível a realização desse trabalho;

À Central de Microscopia do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da Universidade Estadual de Maringá;

A todos os colegas da Pós-Graduação pelos momentos de aprendizado, descontração e colaboração durante o curso;

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é composta por um artigo científico. O mesmo foi redigido de acordo com a revista *Bulletin of Entomological Research*, fator de impacto 1.81. A revista é classificada no Qualis CAPES CBI como B3.

Análise morfo-histopatológica e expressão de esterases em *Bombyx mori* L. infectados com *Nucleopolyhedrovirus* e submetidos ao fármacoantiviral Bm5.

L. C. Cabral¹, J. De La. C. Cisneros¹, A. A. S. Gigliolli¹, M. A. Fernandez¹, L. F. C. Ribeiro², F. A. V. Seixas³, R. M. Costa², A. S. Lapenta¹.

¹Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 87020-900, Paraná, Brasil.

²Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 85819-110, Paraná, Brasil.

³Departamento de Tecnologia da Universidade Estadual de Maringá, *campus* Umuarama, Umuarama, 87506-370, Paraná, Brasil.

RESUMO GERAL

A espécie *Bombyx mori* (Linnaeus, 1758) conhecida popularmente como bicho-da-seda é um inseto pertencente à ordem Lepidoptera. Este inseto é criado massalmente com fins comerciais, pois o fio de seda que serve como matéria-prima para a confecção de seu casulo é usado amplamente pela indústria têxtil. A sericicultura é uma atividade que abrange o cultivo da amoreira (*Morus* sp.), cujas folhas são o único alimento do bicho-da-seda e, no Brasil, a sua criação se inicia com a obtenção dos ovos pela indústria até o cultivo das lagartas no campo pelos agricultores familiares que retornam os casulos para a indústria. Os maiores problemas que ameaçam a sericicultura no Brasil e no mundo são as doenças causadas por diversos patógenos. De todas as doenças, as de origem viral são as mais graves e representam um sério problema para a sericicultura mundial. O vírus da poliedrose nuclear (NPV), em específico, *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV), um Alphabaculovírus da família Baculoviridae, é um patógeno altamente infectivo que causa uma doença conhecida por amarelidão nesses insetos. Este vírus produz estruturas de resistência chamadas de corpos de oclusão virais – OBs (*Occlusion Bodies*) que são capazes de persistir por um longo período de tempo no meio ambiente. A transmissão ocorre comumente por via oral quando as lagartas ingerem o alimento contaminado com os OBs. Durante a infecção, o inseto fica debilitado, perdendo sua capacidade motora e de alimentação e, conseqüentemente, o desenvolvimento da lagarta é afetado levando a um interrompimento do seu crescimento. Quando a lagarta do inseto infectada pelo vírus morre, seus tecidos internos apresentam liquefação e seu tegumento desintegra-se facilmente, liberando grande quantidade de OBs no meio, servindo de inóculo para infectar outros insetos hospedeiros. Estes processos são facilitados pela interação sinérgica entre os produtos gênicos virais *v-cath* (uma catepsina viral) e *chiA* (uma quitinase viral). O fármaco antiviral Bm5, construído através de modelagem molecular para inibir a catepsina viral de BmNPV, age como um preventivo à infecção viral, pois reduz a proliferação viral do hospedeiro contaminado, evitando assim, perdas drásticas de casulos em propriedades sericícolas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos do fármaco Bm5 diluído em Pluronic F-127 na expressão gênica de esterases do intestino médio e corpo gorduroso, pois estas enzimas desempenham um importante papel no metabolismo de compostos endógenos e exógenos no organismo de insetos. Bem como, analisar a morfologia e a citopatologia da infecção no intestino médio, corpo gorduroso e tegumento. As análises das esterases foram realizadas por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida. Para as análises morfológicas foram realizadas microscopia eletrônica de varredura, bem como, a técnica de histologia com colorações em hematoxina e eosinae, em Azan modificado para corpos de oclusão virais. Não foi observada inibição ou expressão de nenhuma banda esterásica diferente das determinadas no padrão eletroforético, o que indica que a infecção viral ou mesmo o tratamento com o fármaco Bm5 não alteraram o perfil enzimático. As análises morfológicas nos revelaram que alterações mais severas ocorrem nos tecidos de lagartas infectadas com o BmNPV sem o fármaco, indicativo de que o mesmo está agindo minimizando os efeitos da ação viral sobre diferentes tecidos. A análise adequada dos efeitos desse fármaco em nível molecular e morfológico cria a perspectiva de poder aplicar futuramente os resultados deste estudo para o monitoramento dessa doença viral na sericicultura.

Palavras-chave: Bicho-da-seda; Baculovírus; Catepsina; Isoenzimas; Citopatologia.

GENERAL ABSTRACT

The *Bombyx mori* species (Linnaeus, 1758) popularly known as silkworm is an insect belonging to the order Lepidoptera. This insect is created massively for commercial purposes, since the silk thread that serves as raw material for the making of its cocoon is used widely by the textile industry. Sericulture is an activity that covers the cultivation of mulberry (*Morus* sp.), whose leaves are the only food of the silkworm and, in Brazil, their creation begins with the production of eggs by the industry until the cultivation of caterpillars in the field by family farmers who return cocoons to the industry. The biggest problems that threaten sericulture in Brazil and in the world are the diseases caused by several pathogens. Of all diseases, those of viral origin are the most serious and represent a serious problem for sericulture worldwide. The nuclear polyhedrosis virus (NPV), in particular, *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV), an Alphabaculovirus of the Baculoviridae family, is a highly infectious pathogen that causes a disease known for “yellowing” in these insects. This virus produces resistance structures called viral occlusion bodies – OBs that are able to persist for a long period of time in the environment. Transmission commonly occurs orally when caterpillars ingest food contaminated with OBs. During the infection, the insect is weakened, losing its motor and feeding capacity and, consequently, the development of the caterpillar is affected leading to an interruption of its growth. When the caterpillar of the insect infected dies, its internal tissues show liquefaction and its integument disintegrates easily, releasing large numbers of OBs in the environment, serving as an inoculum to infect other host insects. These processes are facilitated by the synergistic interaction between the viral gene products *v-cath* (a viral cathepsin) and *chiA* (a viral chitinase). The antiviral drug Bm5, built through molecular docking to inhibit the viral cathepsin of BmNPV, acts as a preventive to viral infection, as it reduces the viral proliferation of the contaminated host, thus preventing drastic loss of cocoons in sericultural properties. In this context, the objective of this work was to analyze the effects of the drug Bm5 diluted in Pluronic F-127 on the gene expression of esterases of the midgut and fat body, as these enzymes play an important role in the metabolism of endogenous and exogenous compounds in the insect organism. As well as, analyze the morphology and cytopathology of the infection in the midgut, fat body and integument. The esterase analyzes were performed using the polyacrylamide gel electrophoresis technique. For morphological analysis, scanning electron microscopy was performed, as well as the histology technique with hematoxylin and eosin stains and, in modified Azan for viral occlusion bodies. No inhibition or expression of any stereic band other than those determined in the electrophoretic pattern was observed, which indicates that viral infection or even treatment with the drug Bm5 did not alter the enzyme profile. Morphological analysis revealed that more severe changes occur in the tissues of caterpillars infected with BmNPV without the drug, indicating that it is acting to minimize the effects of viral action on different tissues. The proper analysis of the effects of this drug at the molecular and morphological level creates the perspective of being able to apply the results of this study in the future to monitor this viral disease in sericulture.

Keywords: Silkworm; Baculovirus; Cathepsin; Isoenzymes; Cytopathology.

Análise morfo-histopatológica e expressão de esterases em *Bombyx mori* L. infectados com *Nucleopolyhedrovirus* e submetidos ao fármaco antiviral Bm5

L.C. Cabral^{1,*}, J.D.C. Cisneros¹, A.A.S. Giglioli¹, M.A. Fernandez¹, L.F.C. Ribeiro², F.A.V. Seixas³, R. M. Costa² e A.S. Lapenta^{1,*}

¹Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 87020-900, Paraná, Brasil.

²Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 85819-110, Paraná, Brasil.

³Departamento de Tecnologia da Universidade Estadual de Maringá, *campus* Umuarama, Umuarama, 87506-370, Paraná, Brasil.

Resumo

O vírus da poliedrose nuclear de *Bombyx mori* (BmNPV) é um patógeno altamente infectivo que causa uma séria doença na espécie. As lagartas são infectadas após a ingestão de corpos de oclusão virais (OBs) presentes nas folhas de amoreira contaminadas. Após a morte da lagarta infectada, seu tegumento desintegra-se facilmente, liberando grande quantidade de OBs no ambiente, servindo de inóculo para infectar outras lagartas. Este processo é facilitado pela interação sinérgica entre os produtos gênicos virais *v-cath* (uma catepsina viral) e *chia* (uma quitinase viral). O fármaco antiviral Bm5, construído através de modelagem molecular para inibir a catepsina viral de BmNPV, age reduzindo a proliferação viral do hospedeiro contaminado. Como o vírus é poliorganotrófico vários são os tecidos-alvo, como o intestino médio que está relacionado à digestão e absorção dos nutrientes e, também tecidos importantes na defesa do organismo, como o corpo gorduroso e o tegumento. Neste trabalho, foram analisados os efeitos do fármaco Bm5 diluído em Pluronic F-127 na expressão de esterases e, na morfologia citopatológica dos tecidos supracitados de lagartas de *B. mori* infectadas por BmNPV. Não houve alteração na expressão de esterases, o que indica que a infecção viral ou mesmo o tratamento com o fármaco Bm5 não alteraram o perfil enzimático. As análises morfológicas revelaram que alterações mais severas ocorreram nos tecidos de lagartas infectadas com o BmNPV não tratadas com o fármaco, indicativo de que o mesmo agiu minimizando os efeitos da ação viral sobre diferentes tecidos.

Palavras-chave: Bicho-da-seda; Baculovírus; Catepsina; Isoenzimas; Citopatologia.

* Autores para correspondência:

Tel/Fax: +55-42-988061608

E-mail: lucascostacabral1@gmail.com (L.C. CABRAL), aslapenta@uem.br (A.S. Lapenta)

Introdução

Bombyx mori (Linnaeus, 1758) conhecido popularmente como bicho-da-seda é um inseto pertencente à ordem Lepidoptera. Os lepidópteros são insetos holometábolos, ou seja, apresentam metamorfose completa, sendo que o estágio de lagarta dura cerca de 27 dias e caracteriza-se por quatro mudas e cinco ínstars (Hanada et al., 1986; Fujihara et al., 2011; Brancalhão et al., 2013). Este inseto é criado massalmente com fins comerciais, pois o fio de seda que serve como matéria-prima para a confecção do casulo onde ocorrerá a pupação é utilizado amplamente pela indústria têxtil (Fujihara et al., 2011). Além disso, é muito estudado e utilizado como sistema-modelo em lepidópteros devido ao rico repertório de informações genéticas sobre mutações que afetam seu desenvolvimento, morfologia e comportamento (Arunkumaret al., 2006; Xu et al., 2017).

A criação do bicho-da-seda para a produção de casulos destinados à indústria chama-se sericicultura. Os maiores problemas que ameaçam a sericicultura no Brasil e no mundo são as doenças causadas por diversos patógenos. As doenças de origem viral são as mais graves e representam um sério problema para o setor sericícola mundial (Brancalhão, 2002a). O vírus da poliedrose nuclear (NPV), em específico, *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV), um Alphabaculovírus da família Baculoviridae, é um patógeno altamente infectivo que causa uma das mais sérias doenças virais na espécie, conhecida por amarelidão. Este vírus, formado por uma molécula de DNA de fita dupla, produz estruturas de resistência chamadas de corpos de oclusão virais – OBs (*OcclusionBodies*), que são capazes de persistirem por um longo período de tempo no ambiente (Brancalhão, 2002a; Jehle et al., 2006).

A transmissão desse baculovírus ocorre comumente por via oral quando as lagartas ingerem o alimento contaminado com os OBs, que atravessam o intestino anterior e atingem o intestino médio. O pH alcalino do intestino médio provoca a dissolução dos OBs e a liberação dos nucleocapsídeos no lúmen intestinal. Essas partículas virais oclusas liberadas, são, portanto, precisamente definidas como vírus derivados da oclusão – ODVs (*Occlusion-DerivedViruses*) (Terra & Ferreira, 1994; Ahamad et al., 2017). Uma das rotas dos nucleocapsídeos liberados é atravessar a matriz peritrófica, ligarem-se as vilosidades das células epiteliais do intestino médio e migrarem, atravessando o complexo do poro, ao núcleo das células onde ocorrerá sua maturação e posterior replicação. Esta etapa é conhecida como infecção primária. Na infecção secundária, o vírus brotado – BV (*BuddedViruses*) proveniente da citólise das células, circula pela hemolinfa e infecta os demais tecidos do inseto (Engelhard & Volkman, 1995; Au & Panté, 2012; Blissard & Theilmann, 2018).

Vários tecidos de *B. mori* foram detectados susceptíveis ao BmNPV, incluindo o corpo gorduroso (Brancalhão et al., 2002b), o tegumento (Brancalhão & Ribeiro, 2003), a glândula sericígena (Brancalhão et al., 2009), sistema nervoso central (Torquato et al., 2006), células testiculares (Pereira et al., 2008), traquéias (Senem et al., 2016), ampolas dos túbulos de malpighi (Santorium et al., 2017) e intestino médio (Vessaro-Silva et al., 2019).

Durante a infecção, o inseto fica debilitado, perdendo sua capacidade motora e de alimentação e, conseqüentemente, o desenvolvimento da lagarta é afetado, levando ao interrompimento do seu crescimento. Quando a lagarta infectada pelo vírus morre, seu tecidos internos apresentam liquefação e seu tegumento desintegra-se facilmente, liberando grande quantidade de OBs no ambiente, servindo de inóculo para infectar outros insetos hospedeiros

(Volkman&Keddie, 1990; Federici, 1997). Estes processos são facilitados pela interação sinérgica entre os produtos gênicos virais *v-cath* (uma catepsina viral) e *chiA* (uma quitinase viral) (Ohkawa et al., 1994; Slack et al., 1995).

Hawtin(1995) reporta que em larvas de *Anticarsia gemmatalis*, infectadas por baculovírus *Anticarsia gemmatalis* MNPV recombinantes com ausência dos genes *chiA* e *v-cath* no genoma do baculovírus AgMNPV, as larvas não apresentavam características de liquefação do corpo logo após sua morte.

Quando *B. mori* é infectado pelo BmNPV ocorrem significativas perdas na sericicultura, pois não há medicamentos contra esse vírus disponíveis. Desse modo, a estrutura da catepsina viral (*BmNPV-Cath*), foi modelada na presença de um inibidor (MYP) e utilizada como alvo em simulações de varredura virtual, visando a identificação de potenciais moléculas que poderiam ser usadas no tratamento da infecção. A varredura virtual selecionou quatro moléculas melhores ranqueadas em comparação ao MYP, a molécula com maior afinidade a enzima, chamada de Bm5, foi usada em modelos de infecção *in vivo* de lagartas de *B. mori* com BmNPV e os resultados mostraram que o tratamento com uma dose de Bm5 dissolvido em Pluronic F-127 0,02% foi capaz de reduzir a mortalidade das lagartas em 22,6% (Bueno et al., 2018).

De acordo com Bueno et al. (2018), o fármaco antiviral Bm5, construído através de modelagem molecular para inibir a catepsina viral (*v-cath*) de BmNPV, age como um preventivo à infecção viral, pois reduz a proliferação viral do hospedeiro contaminado, evitando assim, perdas drásticas de casulos em propriedades sericícolas. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos do fármaco Bm5 e Pluronic-F127 na expressão gênica de esterases, enzimas estas que desempenham um importante papel no metabolismo de compostos endógenos e exógenos no organismo de insetos e, analisar a morfologia citopatológica do intestino médio, corpo gorduroso e tegumento de lagartas de *B. mori* infectadas com BmNPV.

Materiais e métodos

Insetos

Lagartas híbridas de *Bombyx mori* comercial no 5º ínstar fornecidas pela empresa Fiação de Seda - BRATAC S.A. PR, foram criadas dentro de caixas plásticas em uma sala climatizada (25°C ±1) com fotoperíodo 14h:10h (luz:escuro) e umidade relativa de aproximadamente 70% (±10%), sendo alimentadas três vezes ao dia com folhas frescas de amoreira (*Morus* sp), até o final de seu ciclo de vida. A limpeza das caixas de criação foram executadas uma vez por dia, para retirar todos os resíduos e evitar contaminações. Estes procedimentos foram realizados no Laboratório de Melhoramento Genético de Bicho-da-seda da Universidade Estadual de Maringá – UEM.

Bioensaios:

Determinação da dose letal média do vírus (DL₅₀)

Para a determinação da dose letal média do vírus, foram utilizadas lagartas de *B. mori* no primeiro dia do 5º ínstar, as quais foram infectadas com a suspensão viral do inóculo de

BmNPV (*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*), isolado geográfico do Paraná (Brasil). Quatro grupos de lagartas foram infectados com a suspensão viral de BmNPV em diferentes concentrações: 5×10^7 , 5×10^8 , 8×10^8 , 1.1×10^9 COPs/mL (corpos de oclusão poliédricos por mililitro) quantificadas em câmara de Neubauer. A concentração final escolhida foi 8×10^8 COPs/mL. Um grupo de lagartas foi utilizado como controle (sem infecção do vírus).

Infecção in vivo de lagartas de Bombyx mori

Foram utilizadas lagartas de *B. mori*, no primeiro dia do 5º ínstar. As lagartas foram infectadas com a suspensão viral do inóculo de BmNPV (*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*), isolado geográfico do Paraná (Brasil), a uma concentração de 8×10^8 COPs/mL de acordo com a dose letal média (DL_{50}) determinada. Em seguida, 10 μ L da suspensão viral foram colocados sobre discos foliares de amoreira (4 cm^2 de diâmetro), que foram fornecidos como alimento para as lagartas do grupo inoculado. Durante a alimentação as lagartas permaneceram confinadas individualmente em copos descartáveis, para assegurar a ingestão de toda a suspensão viral.

Tratamento com o fármaco Bm5

As lagartas foram tratadas com o inibidor de protease BmNPV-Cath (fármaco Bm5), adquirido da empresa InterBioScreen (Rússia), imediatamente após a infecção com o vírus. A solução do inibidor foi diluída, seguindo Bueno et al. (2018), na concentração de 10 μ g.mL⁻¹ na presença de Pluronic F-1270,02%, o qual é utilizado para facilitar a solubilização do inibidor e como veículo micelar. Em seguida, 10 μ L da solução foram colocados sobre discos foliares de amoreira (4 cm^2 de diâmetro), como descrito acima.

Grupos experimentais de lagartas

Seis grupos foram montados, cada grupo com três repetições (triplicata) e cada repetição com quatro lagartas, os quais foram:

- C1 - lagartas sem infecção do vírus e tratadas com água mineral (controle branco);
- C2 - lagartas sem infecção do vírus e tratadas apenas com Pluronic (controle + Pluronic);
- C3 - lagartas sem infecção do vírus e tratadas com o fármaco Bm5 diluído em Pluronic (controle + Bm5 + Pluronic);
- V1 - lagartas com infecção do vírus (BmNPV);
- V2 - lagartas com infecção do vírus e tratadas apenas com Pluronic (BmNPV + Pluronic);
- T - lagartas com infecção do vírus e tratadas com o fármaco Bm5 diluído em Pluronic (Tratamento – BmNPV + Bm5 + Pluronic).

Os grupos C2, C3 e V2 foram pensados com o intuito de avaliar se ocorreria alteração enzimática ou morfológica associada ao composto Pluronic F-127 ou ao fármaco Bm5 em si.

Análise das esterases

Para as análises das esterases foram coletadas amostras do intestino médio e do corpo gorduroso das lagartas. Estas foram sacrificadas a frio e dissecadas no 7^a dia pós-infecção (dpi), pois é o momento em que elas começam a sessar sua alimentação para começar o encasulamento. Foram utilizadas umalagarta de cada grupo a cada repetição, totalizando 18 lagartas analisadas.

Após dissecados, os tecidos foram transferidos separadamente para uma solução de β -mercaptoetanol a 1% e glicerol a 10%, sendo acondicionados a -80°C para posterior análise das isoenzimas por meio de eletroforese descontínua em gel vertical de poliacrilamida (PAGE) com gel de visualização a 9% e, gel de empilhamento a 4% seguindo Gigliolli et al. (2015), com modificações.

As amostras foram maceradas individualmente a 0°C em 200 μL de tampão β -mercaptoetanol a 1% com glicerol a 10% e 20 μL de tetracloreto de carbono. Em seguida, foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm em centrífuga refrigerada (Jouan MR 23i) a 4°C . Um volume de 20 μL do sobrenadante de cada amostra foi aplicado no gel. Os géis foram submetidos à eletroforese por 4 horas, a uma voltagem constante de 200 *Volts* a 4°C , em tampão Tris-Glicina 0,1 M pH 8,3.

A coloração foi realizada submetendo-se os géis inicialmente a pré-incubação por 30 minutos em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,2 o qual posteriormente foi substituído pela solução de coloração composta por tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,2, n-propanol, corante Fast Blue RR Salt e os substratos α -naftil acetato e β -naftil acetato, previamente solubilizados em acetona. Após cerca de 10 minutos de incubação no escuro a $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, as esterases foram visualizadas como bandas pretas ou vermelhas, indicativas da presença de α e β -esterases, respectivamente.

Microscopia de luz

Para a análise histológica foram coletadas amostras do intestino médio, do corpo gorduroso e do tegumento, as lagartas foram sacrificadas a frio e dissecadas no 7^a dpi. Foram utilizadas umalagarta de cada grupo a cada repetição, totalizando 18 lagartas analisadas.

As amostras foram fixadas em solução aquosa Bouin (ácido pícrico, formaldeído e ácido acético) por 24 horas a 4°C , e seguiu-se o processamento histológico de rotina: desidratação em série crescente de álcoois, diafanização em xilol e inclusão em parafina (Brancalhão et al., 2009). Em seguida, cortes de 6 μm foram obtidos em micrótomo Leica RM 2250, e as lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE) (Junqueira & Junqueira, 1983), bem como, com Azan modificado para observação dos corpos de oclusão virais (Hamm, 1966). As lâminas foram analisadas em microscópio de luz (Olympus CBA) e as regiões de interesse fotografadas usando câmera digital.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para o MEV, o intestino médio foi dissecado e fixado em solução aquosa Bouin por 24 horas a 4°C , e, então, lavado em tampão fosfato de sódio 0,1 M. Em seguida, as amostras foram desidratadas em série crescente de álcoois (50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%), submetidas

ao ponto crítico (Leica CPD 030) e metalizadas com pó de ouro nometalizador Shimadzu IC-50. As análises foram realizadas usando o Microscópio Eletrônico de Varredura QUANTA 250-FEI da Central de Microscopia do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (CMI-COMCAP) da Universidade Estadual de Maringá – PR.

Resultados

Padrão das esterases do corpo gorduroso e intestino médio

As análises eletroforéticas permitiram identificar 11 bandas esterásicas no intestino médio e seis bandas esterásicas no corpo gorduroso de lagartas híbridas de *B. mori*. Foram classificadas em 14 tipos de esterases denominadas de Est-1 a Est-14. As esterases Est-6, Est-7 e Est-10 foram classificadas como β -esterase com base na sua preferência pela hidrólise de β -naftil acetato, as bandas apresentam-se coradas em vermelho nos géis, as demais foram classificadas como α -esterases e apresentaram-se coradas em preto (Figs. 1 e 2). A mesma migração das bandas esterásicas de ambos os tecidos e a afinidade ao substrato possibilitou identificar uma equivalência entre as α -esterases Est-4, Est-5 e Est-8, já as bandas esterásicas que não possuíram equivalência, Est-1, Est-2, Est-3, Est-6, Est-7, Est-9, Est-10, Est-11, Est-12, Est-13 e Est-14 foram tidas como tecido-específicas (Figs. 1 e 3).

Microscopia de luz e microscopia eletrônica:

Intestino médio e musculatura

A citopatologia da infecção causada pelo BmNPV nas células do epitélio intestinal das lagartas do grupo VI revelou uma grande desestruturação interna do epitélio, com células rompidas e desprendimento da lâmina basal, além de espaçamentos entre o epitélio (Figs. 4B e 5C e D), o que coincide com os eventos causados na musculatura intestinal das lagartas do grupo VI que apresentaram-se frouxas, com dilatação das fibras circulares e deformação das fibras longitudinais, causando um deslocamento da lâmina basal onde o epitélio intestinal se apoia (Fig. 6B e C). Os eventos citopatológicos também mostraram os núcleos das células colunares hipertróficos com a presença de poliedros corados em vermelho pela técnica de Azan modificado (Fig. 5H). Nas lagartas do grupo T, o epitélio intestinal apresentou as mesmas degenerações, porém, de forma regredida em comparação ao epitélio das lagartas do grupo VI (Fig. 5E e F), e a musculatura intestinal menos frouxa (Fig. 6D).

As lagartas dos grupos C1, C2 e C3, não apresentaram modificações estruturais na musculatura e continuaram com o epitélio íntegro, e no núcleo das células não houve presença de poliedros, nem nucleocapsídeos, ou quaisquer estruturas ou componentes indicativos de infecção viral (Figs. 5A, B, G e 6A). Em lagartas do grupo V2 observou-se a mesma modificação estrutural no epitélio e na musculatura de lagartas do grupo VI.

Corpo gorduroso

A citopatologia da infecção causada pelo BmNPV nas células do corpo gorduroso das lagartas do grupo VI e V2 revelou os núcleos das células hipertrofiados e com a presença de vários poliedros, o citoplasma das células apresentou-se totalmente desintegrado (Fig. 7C e

D). Nas lagartas do grupo *T*, não foram observadas diferenças marcantes na estrutura das células gordurosas em comparação as lagartas do grupo *VI* (Fig. 7E e F).

Lagartas dos grupos *C1*, *C2* e *C3* não apresentaram poliedros, nucleocapsídeos, estruturas ou componentes que indicassem infecção viral (Fig. 7A e B).

Tegumento

A citopatologia da infecção causada pelo BmNPV nas células do epitélio tegumentar das lagartas do grupo *VI* e *V2* revelou os núcleos das células hipertrofiados e com grande quantidade de poliedros maduros. Além disso, foi possível identificar um grande desarranjo estrutural na cutícula separando-a das células epidérmicas, formando espaços irregulares ao longo do epitélio tegumentar (Fig. 8C e D). Nas lagartas do grupo *T*, o desarranjo estrutural na cutícula é menos evidente e de forma regredida em comparação com as lagartas do grupo *VI* (Fig. 8E e F).

As lagartas dos grupos *C1*, *C2* e *C3* não apresentaram poliedros no núcleo das células ou estruturas indicativas de infecção viral, e a estrutura tegumentar apresentou-se intacta (Fig. 8A e B).

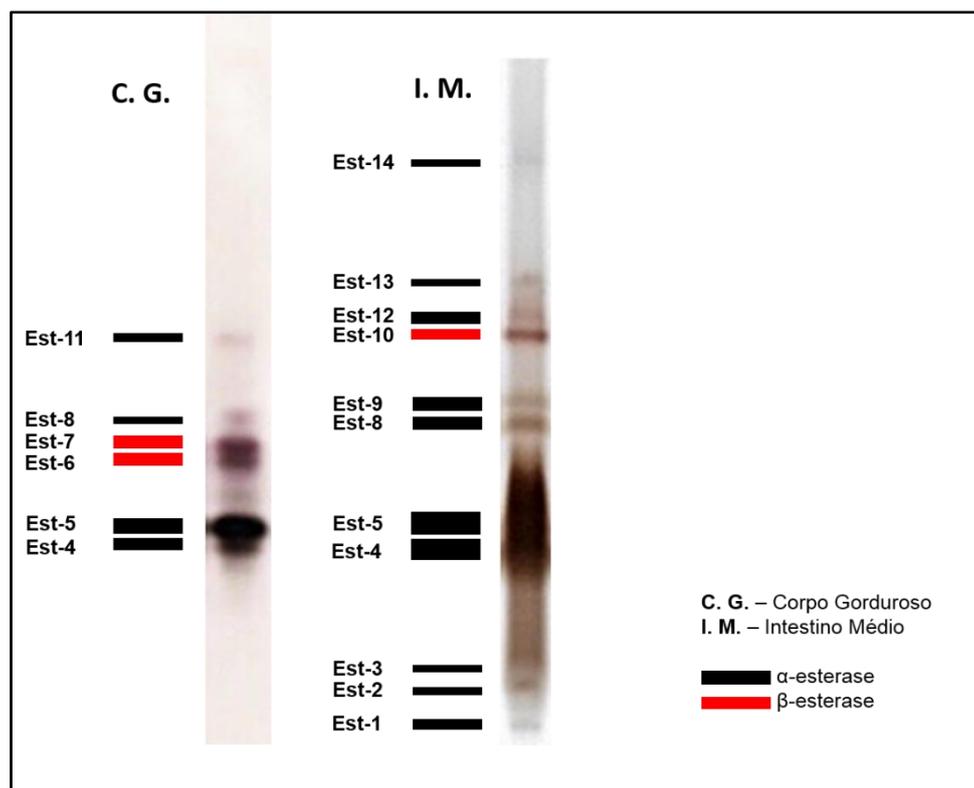


Figura 1. Zimograma do padrão das esterases detectadas no corpo gorduroso e intestino médio de lagartas de *Bombyx mori* no 7º dia do 5º ínstar.

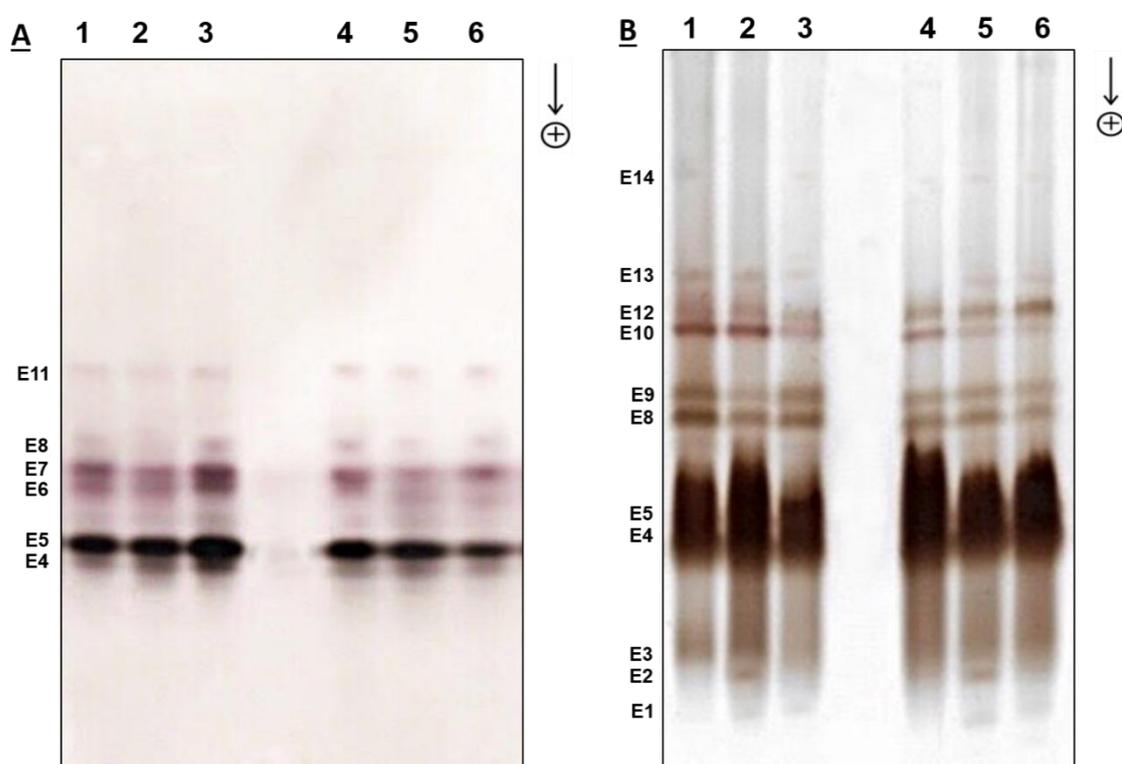


Figura 2. **A.** Padrão eletroforético de esterases do corpo gorduroso; **B.** Padrão eletroforético de esterases do intestino médio de lagartas de *Bombyx mori* no 7º dia do 5º ínstar. 1-C1; 2-C2; 3-C3; 4-V1; 5-V2; 6-T.

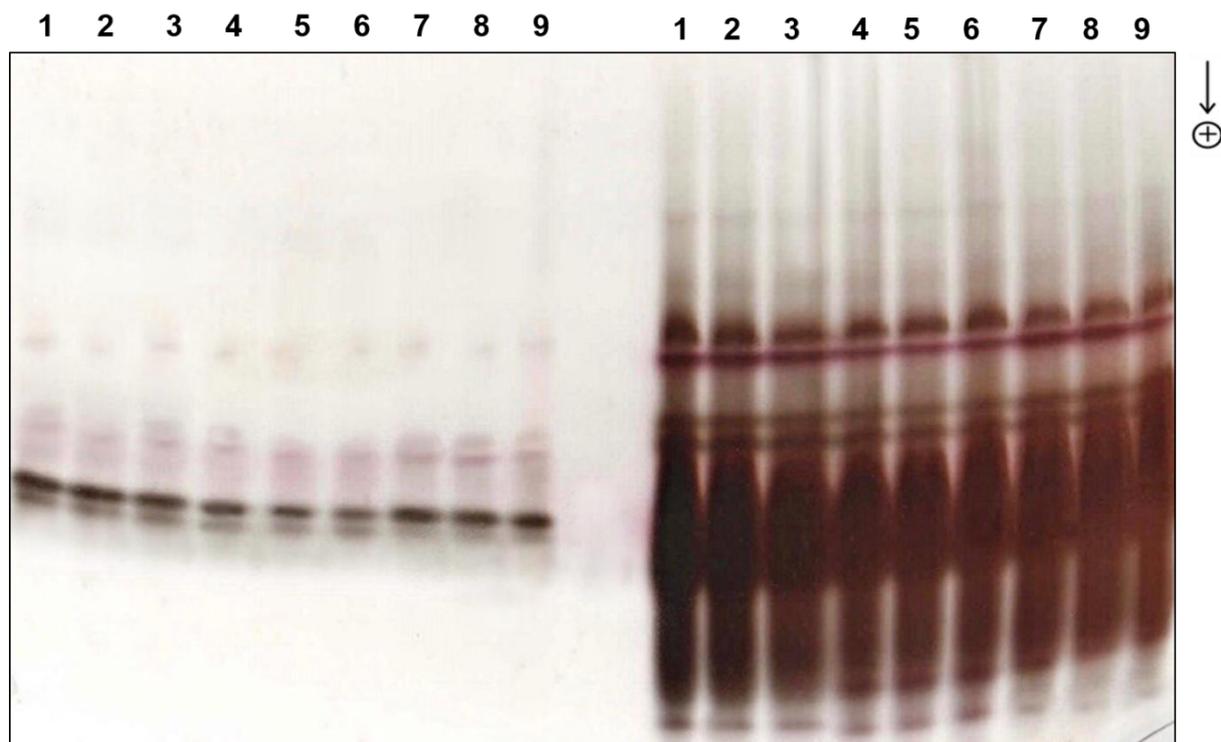


Figura 3. Padrão eletroforético de esterases do corpo gorduroso e intestino médio de lagartas de *Bombyx mori* no 7º dia do 5º ínstar corridas no mesmo gel. 1, 2 e 3 –CI (controle branco), 4, 5 e 6 –VI (*BmNPV*); 7, 8 e 9 –T (tratamento).

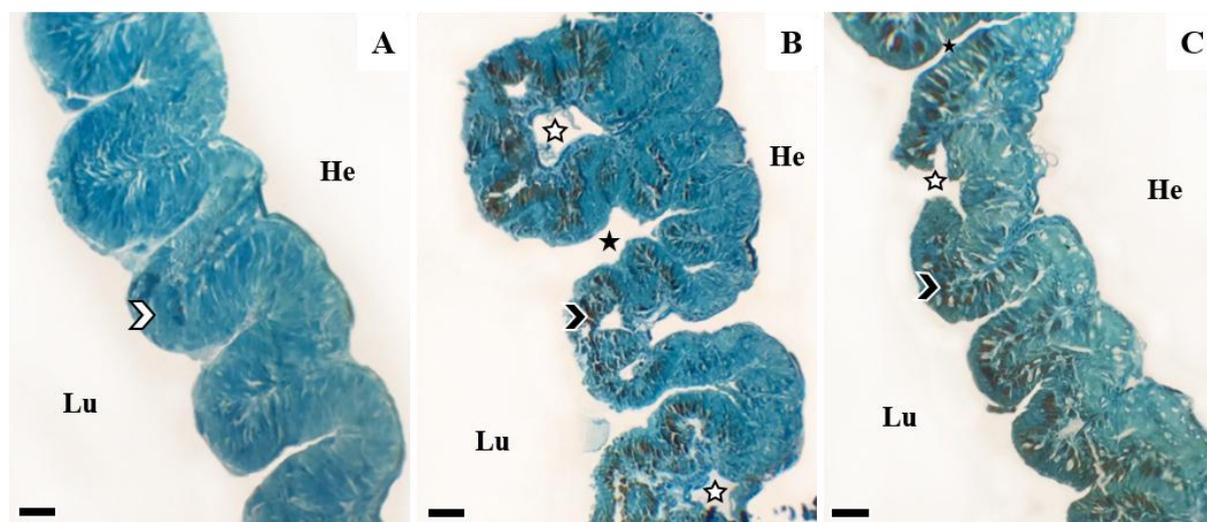


Figura 4. Fotomicrografias da região média do trato digestório de lagartas de *Bombyx mori* no 7º dia do 5º ínstar. A. CI (controle branco); B. VI (*BmNPV*); C. T (tratamento). Lúmen intestinal (Lu), hemocele (He), epitélio sem infecção (D) epitélio com infecção (N), desestruturação do epitélio (☆) espaçamento epitelial (★). Coloração: Azan modificado. Escala = 100 µm.

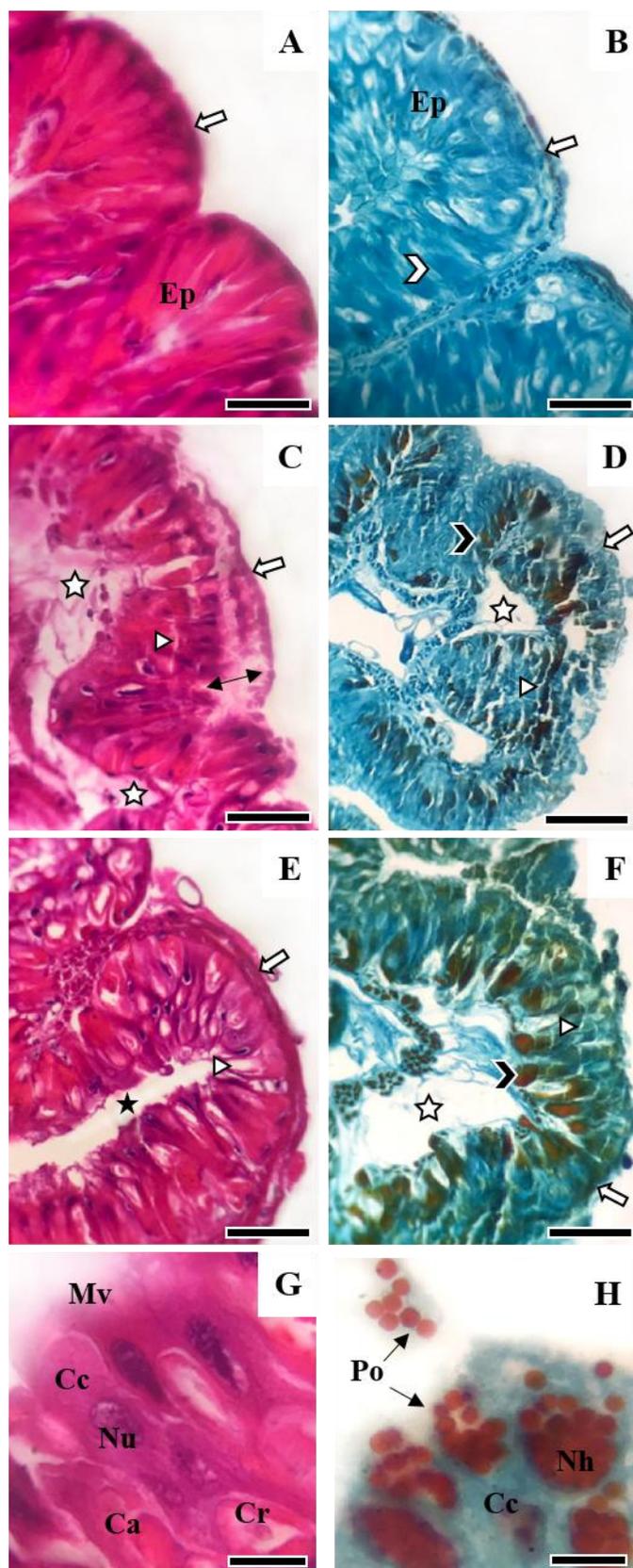


Figura 5. Fotomicrografias de células epiteliais do intestino médio de lagartas de *Bombyx mori* no 7º dia do 5º instar. **A. B. e G.** *CI* (controle branco); **C.D. e H.** *VI* (*BmNPV*); **E. e F.** *T*(tratamento). Epitélio (Ep), microvilosidades (Mv), células colunares (Cc), células caliciformes (Ca), células regenerativas (Cr), núcleo normal (Nu), núcleo hipertrófico (Nh), poliedros maduros no núcleo e no ambiente extracelular (Po), musculatura (Cr), células epiteliais sem infecção (↔), células epiteliais com infecção (➤) desestruturação do epitélio (☆) espasamento epitelial (★), descolamento da lamina basal (↔↔), rompimento celular (▷). Coloração: Hematoxilina e eosina (A, C, E e G); Azan modificado (B, D, F e H). Escala = 50 µm.

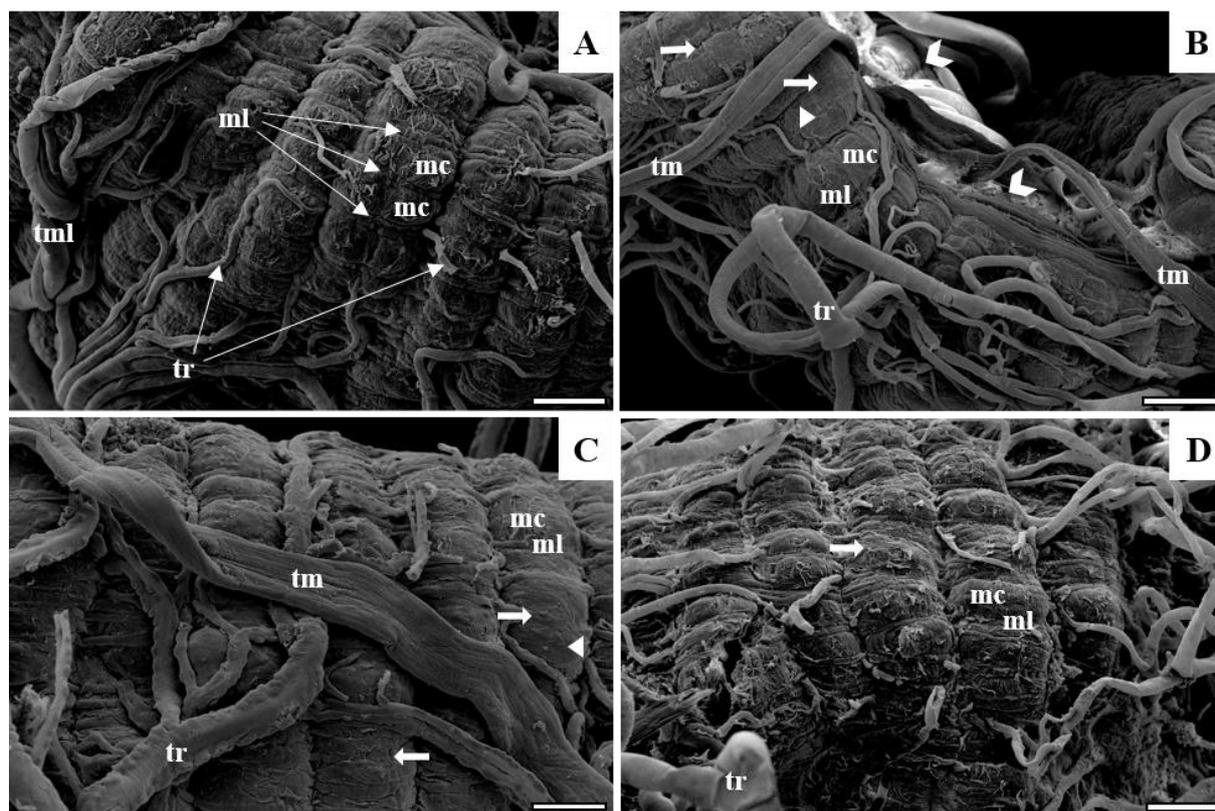


Figura 6. Microscopia eletrônica da musculatura da região média do trato digestório de lagartas de *Bombyx mori* no 7º dia do 5º ínstar. **A.** *CI* (controle branco); **B.** e **C.** *VI* (*BmNPV*); **D.** *T* (tratamento). Musculatura longitudinal (ml), musculatura circular (mc), traquéias e traquéolas (tr), túbulos de malpighi lisos (tml), ampolas dos túbulos de malpighi (tm) musculatura longitudinal deformada (⇔), musculatura circular dilatada (▷), desestruturação da parede do epitélio (▷). Escala = B e D - 500 µm; A - 400 µm; C - 300 µm.

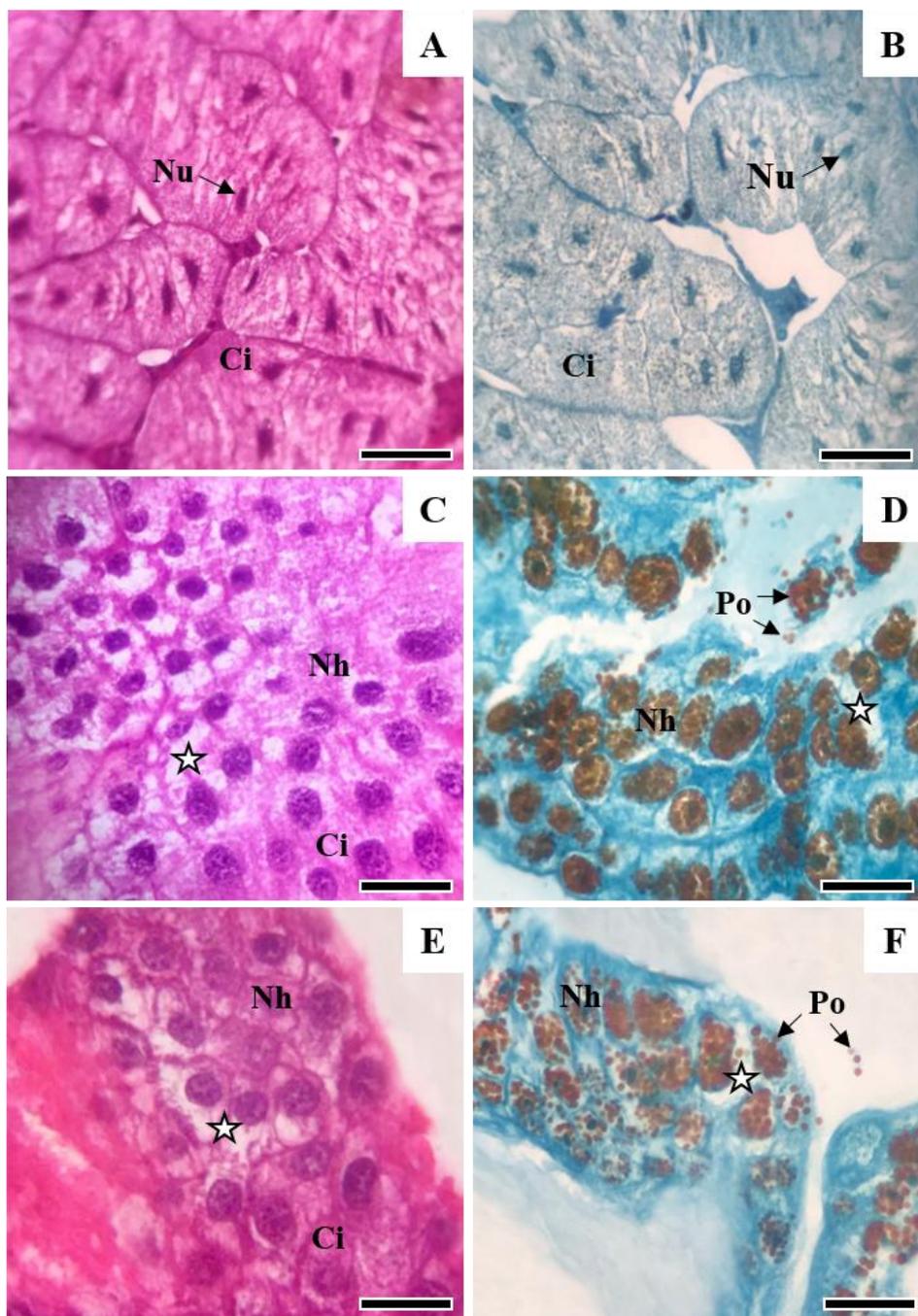


Figura 7. Fotomicrografias de células do corpo gorduroso de lagartas de *Bombyx mori* no 7º dia do 5º ínstar. **A.** e **B.** CI (controle branco); **C.** e **D.** VI(BmNPV); **E.** e **F.** T (tratamento). Núcleo normal (Nu), núcleo hipertrófico (Nh), poliedros maduros no núcleo e no ambiente extracelular (Po), citoplasma (Ci), desintegração do conteúdo citoplasmático (☆). Coloração: Hematoxilina e eosina (A, C e E); Azan modificado (B, D e F). Escala = 50 μ m.

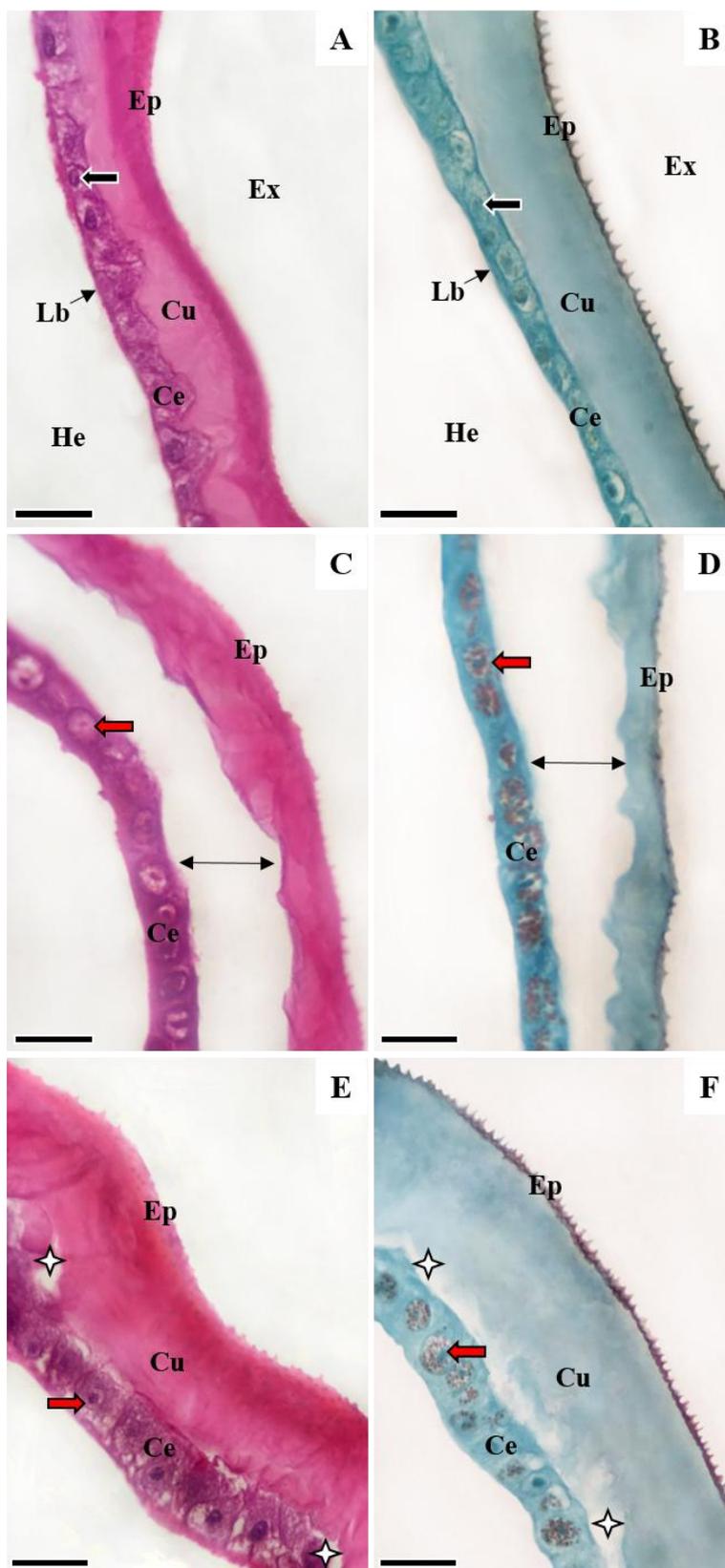


Figura 8. Fotomicrografias do tegumento de lagartas de *Bombyx mori* no 7º dia do 5º ínstar. **A.** e **B.** CI (controle branco); **C.** e **D.** VI(*BmNPV*); **E.** e **F.** T (tratamento). Lâmina basal (Lb), células epidérmicas (Ce), cutícula (Cu), epicutícula (Ep), núcleo normal (↔), núcleo hipertrófico (→), desarranjo estrutural na cutícula (↔↔), desarranjo estrutural minimizado (☆). Coloração: Hematoxilina e eosina (A, C e E); Azan modificado (B, D e F). Escala = 50 μm .

Discussão

Como mostrado, neste trabalho foram identificadas 11 bandas esterásicas no intestino médio e seis bandas esterásicas no corpo gorduroso de lagartas híbridas de *B. mori*. Laufer (1961) e Eguchi & Sugimoto (1965) identificaram seis bandas esterásicas no intestino médio e oito no corpo gorduroso de lagartas de *B. mori*. Vários outros autores determinaram um número diferente de bandas esterásicas no intestino médio de diferentes raças e híbridos de *B. mori*: Egorova et al. (1977) sete bandas esterásicas, Eremina (1985) seis bandas esterásicas, Jing et al (2005) cinco bandas esterásicas e, Staykova et al. (2012) visualizaram também 11 bandas esterásicas e, indicaram que pode ocorrer uma expressão específica das esterases de acordo com o ínstar das lagartas, relacionadas com uma variação no número e na intensidade das frações das enzimas, pois nos estágios iniciais e posteriores do desenvolvimento, menos bandas podem ser detectadas. As diferenças entre os resultados obtidos e os resultados de outros autores, podem estar relacionadas com o uso de diferentes técnicas eletroforéticas e com o estudo de raças e híbridos de diferentes origens.

O grupo das α -esterases inclui carboxilesterases, colinesterases e acetilesterases, e o das β -esterases inclui apenas carboxilesterases e colinesterases (Oakeshott et al., 1993), estas enzimas sabidamente atuam por meio da detoxificação metabólica, mecanismo pelo qual os inseticidas, por exemplo, são modificados para formas menos tóxicas ao inseto ou eliminados rapidamente, prevenindo a sua ação no sítio alvo (Wu et al., 2004; Beckel et al., 2006). Neste estudo, não foi observada inibição ou expressão de nenhuma banda esterásica diferente das determinadas no padrão eletroforético, logo, a infecção viral por BmNPV ou mesmo o tratamento com o fármaco Bm5 e Pluronic não alteraram o perfil enzimático. O que indica, que este sistema de detoxificação envolvido no metabolismo de compostos xenobióticos não foi acionado. As análises dos sistemas antioxidantes feitas por Vessaro-Silva et al. (2019) em lagartas de *B. mori* mostram alguns momentos de alterações das enzimas catalase e superóxido dismutase, e o sistema colinérgico revelou alterações apenas no início da infecção por BmNPV. Assim, os autores reconhecem o sistema antioxidante como uma barreira para impedir a infecção viral, embora não possa impedir a ocorrência da infecção, uma vez que é mantida uma ligação co-evolucionária entre o vírus e o hospedeiro.

Por outro lado, as análises morfológicas realizadas indicaram alterações no intestino médio, corpo gorduroso e tegumento de *B. mori* após a infecção. O intestino médio é formado por um epitélio simples composto por três tipos de células repousando sobre uma lâmina basal intimamente associada aos músculos viscerais intrínsecos que compreendem músculos circulares correndo ao redor do intestino e músculos longitudinais que se estendem ao longo de partes dele. As células do intestino médio estão ativamente envolvidas na produção e secreção de enzimas, bem como na absorção de nutrientes. A maioria das células são altas, denominadas células colunares e a membrana do lado luminal forma microvilosidades. As células colunares do intestino médio têm uma vida limitada e, na maioria dos insetos, incluindo lepidópteros, são continuamente substituídas por células regenerativas na base do epitélio intestinal. Espalhadas entre as células colunares estão as células caliciformes (Snodgrass, 1993; Chapman, 1998).

Na citopatologia da infecção causada por BmNPV nas células do epitélio intestinal das lagartas do grupo VI, os nucleocapsídeos apresentaram-se envoltos por poliedros, que

crecem pelo acúmulo e cristalização contínuos da proteína poliedrina conforme descrito por Brancalhão (2002a). Assim como os resultados reportados por Vessaro-Silva et al. (2019) as células colunares foram susceptíveis ao vírus com poliedros maduros no núcleo e no ambiente extracelular, enquanto que nas células regenerativas e caliciformes não houve evidências desenfreadas de infecção. A infecção nas áreas de transição entre as regiões do intestino foram mais evidentes, pois essas áreas são pontos alvos do BmNPV, Ribeiro et al. (2009) relataram a infecção da cárdia, área de transição entre o intestino anterior e o médio de *B. mori* e Baggio et al. (2014), relataram a infecção do anel intersticial do piloro, área que marca a transição entre o intestino médio e o posterior. A infecção também revelou uma grande desestruturação interna do epitélio, provavelmente devido a alterações na estrutura da musculatura intestinal responsável pela sustentação das células epiteliais, pois se a musculatura esta frouxa ou deformada, o epitélio perde sustentação. Enquanto que nas lagartas do grupo *T*, o epitélio intestinal apresentou-se menos desestruturado e corrompido. As modificações na estrutura da musculatura são de certa forma acentuadas, pois, como mostrado por Vessaro-Silva (2017) as fibras musculares não são tecidos prontamente susceptíveis a infecção por BmNPV, porém, o tecido muscular responde à infecção sistêmica devido à ação viral no sistema traqueal, ao final do ciclo de infecção viral o tecido muscular apresenta-se desorganizado, com alterações nas miofibrilas e deformação da lâmina basal.

Já o corpo gorduroso é um tecido alvo preferencial na infecção por BmNPV, possivelmente devido as suas funções no metabolismo intermediário e no armazenamento de nutrientes, representando um local rico em substratos e energia necessários à replicação viral. As principais células do corpo gorduroso são os adipócitos, estas células aparecem organizadas em lâminas que, normalmente, distribuem-se em duas camadas, uma próxima do intestino e a outra próxima ao tegumento; o corpo gorduroso fica em contato íntimo com a hemolinfa, facilitando a troca de metabólitos (Chapman, 1998).

Os núcleos das células gordurosas infectadas apresentaram-se hipertrofiados e, em um estágio avançado da infecção, onde o ciclo reprodutivo do vírus possibilita a citólise e consequente liberação dos poliedros já maduros na cavidade geral do corpo do inseto, assim como observado por Brancalhão (2002b) em lagartas do 5º instar pós-inoculação com BmNPV. Nas lagartas do grupo *T* não foram observadas diferenças marcantes na estrutura das células gordurosas em comparação as lagartas do grupo *VI*. A infecção destas células por BmNPV acarreta um aumento no conteúdo de lipídeos livres na hemolinfa que, somado à presença dos poliedros, se torna leitosa, conferindo, assim, o aspecto branco-amarelado ao tegumento (Brancalhão, 2002b).

Outro tecido de grande importância é o tegumento, a camada mais externa do inseto, compreendendo a epiderme e a cutícula. A epiderme é formada por uma camada simples de células espessas. A cutícula, também conhecida como procutícula, é constituída por quitina, secretada pelas células epidérmicas e depositada na superfície externa, onde se solidifica para formar o exoesqueleto. A cutícula é dividida em duas camadas: exocutícula (externa) e endocutícula (interna), a parte externa frequentemente se torna dura e rígida, enquanto a parte interna é indiferenciada. A epicutícula desempenha um papel importante no apoio ao inseto e fornece proteção externa (Chapman, 1998; Fujihara et al., 2011).

A citopatologia da infecção causada por BmNPV nas células do epitélio tegumentar das lagartas do grupo VI apresentaram espaçamentos na região da cutícula separando-a das células epidérmicas, Brancalhão e Ribeiro (2003) também visualizaram espaçamentos na região da cutícula em lagartas do 5º ínstar após a infecção por BmNPV e indicaram que esta característica histopatológica pode ser aplicada pelo fato de que as células do epitélio tegumentar são responsáveis pela secreção e manutenção da cutícula e, na infecção por BmNPV o metabolismo celular de *B. mori* torna-se totalmente alterado e mobilizado para a produção de partículas virais. Como consequência, há uma modificação na síntese de componentes químicos da secreção procuticular, perdendo, assim, sua integridade estrutural. Resultados semelhantes foram demonstrados por Oro (2017) em que a endocutícula apresentou-se desorganizada nas células infectadas por BmNPV, perdendo o padrão lamelar normal de cadeias polissacarídicas de quitina interligadas paralelamente por microfibrilas. O desarranjo estrutural na cutícula apresentou-se em menor proporção em lagartas do grupo Tem comparação com as lagartas do grupo VI. Demonstrando que o fármaco age de tal maneira que impede e minimiza a desorganização do epitélio tegumentar. Frequentemente, ocorrem rupturas no tegumento, levando ao extravasamento da hemolinfa rica em poliedros maduros, esses poliedros aderem-se facilmente às folhas de amoreira, possibilitando a sua ingestão por lagartas sadias. Soma-se a isto o deslocamento aleatório e o geotropismo negativo exibido pelas lagartas infectadas, alterações comportamentais comuns nas infecções por baculovírus (Vasconcelos, 1996; Brancalhão & Ribeiro, 2003). Tendo que a ruptura do tegumento auxilia na dispersão da doença, pois desestabiliza a estrutura do tegumento como um todo, que se rompe, o tratamento com o fármaco Bm5 mostrou-se eficiente nesse tecido.

Estudos realizados por Cisneros (2020), em concomitância a este trabalho, revelaram que a aplicação de uma dose do fármaco Bm5 dissolvida em micelas de PluronicF-127 logo após a infecção por BmNPV em lagartas de *B. mori* no 5º ínstar apresentou uma redução significativa na mortalidade de lagartas e crisálidas, que foram capazes de construir casulos de boa qualidade. Com isso, e com base nos resultados obtidos, percebe-se que a morfologia é menos desestruturada e corrompida em lagartas infectadas com BmNPV e tratadas com uma dose do fármaco Bm5 em comparação a morfologia observada em lagartas infectadas sem o tratamento, o que é indicativo de que o fármaco está agindo minimizando os efeitos da ação viral sobre diferentes tecidos, reduzindo a desordem causada nas células e nos tecidos durante a infecção por BmNPV. Porém, como o rompimento de membrana e a propagação horizontal do vírus ainda ocorre, fazendo-se necessário um inibidor de amplo espectro para ambas as enzimas hidrolíticas virais.

Agradecimentos

Os autores agradecem à empresa de Fiação de Seda BRATAC, pelo fornecimento das lagartas de *Bombyx mori*, tornando possível a realização desse trabalho; a Central de Microscopia do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da UEM pela assistência no manuseio de equipamentos e à CAPES pelo apoio financeiro fornecido à pesquisa.

Referências

- Ahamad, M.S.I., Kari, N.N. & Vootla, S.K.** (2017) Pathogen-driven proteomic changes in hemolymph of nuclear polyhedrosis virus-infected silkworm *Bombyx mori* L. *Trends in Insect Molecular Biology and Biotechnology* 103-126. doi: 10.1007/978.3.319.61343.7.6.
- Arunkumar, K.P., Metta, M. & Nagaraju, J.** (2006) Molecular phylogeny of silkmoths reveals the origin of domesticated silkworm, *Bombyx mori* from Chinese *Bombyx mandarina* and paternal inheritance of *Antheraea proylei* mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **40**, 419-427.
- Au, S. & Panté, N.** (2012) Nuclear transport of baculovirus: revealing the nuclear pore complex passage. *Journal of Structural Biology* **177**, 90–98.
- Baggio, M.P., Ribeiro, L.F.C., Vessaro-Silva, S.A. & Brancalhão, R.M.C.** (2014) *Bombyx mori* pylorus infection by *Alphabaculovirus*. *Genetics and Molecular Research* **13**. 6332-6339.
- Beckel, H.S., Lorini, I. & Lazzari, S.M.N.** (2006) Efeito do sinergista butóxido de piperonila na resistência de *Oryzaephilus surinamensis*(L.) (Coleoptera, Silvanidae) a deltametrina e fenitroton. *Revista Brasileira de Entomologia* **50**, 110-114.
- Blissard, G.W. & Theilmann, D.A.** (2018) Baculovirus Entry and Egress from Insect Cells. *Annual Review of Virology* **5**, 113-139.
- Brancalhão, R.M.C.** (2002a) Vírus entomopatogênicos no bicho-da-seda: taxonomia e citopatologia causada por *Nucleopolyhedrovirus* em células de *Bombyx mori*. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* **24**, 54-58.
- Brancalhão, R.M.C. Souza, V.B.V. & Soares, M.A.M.** (2002b) Infecção causada por *Nucleopolyhedrovirus* nas células gordurosas de *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). *Arquivos do Instituto Biológico* **69**, 57-63.
- Brancalhão, R.M.C. & Ribeiro, L.F.C.** (2003) Citopatologia da infecção causada por *BmNPV* no tegumento de *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia* **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. *Genetics and Molecular Research* **8**, 162-172.
- Brancalhão, R. M. C., Torquato, E. F. B., Soares, M. A. M. & Bilha, J. K.** (2013) Práticas de laboratório bicho da seda: montagem do ciclo de vida. *Arquivos do Museu Dinâmico Interdisciplinar* **8**, 58-60.
- Bueno, P.S.A., Biavatti, D.C., Chiarello, A.S.D., Fassina, V.A., Fernandez, M.A. & Seixas, F.A.V.** (2018) The structure of viral cathepsin from *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus as a target against grasserie: Docking and molecular dynamics

simulations. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-24. doi: 10.1080/07391102.2018.1521344.

Chapman, R.F. (1998) *The Insect Structure and Function*. 788 pp. (Ed 4^o) Cambridge, UK, Cambridge University Press.

Cisneros, J.J.C. (2020) Avaliação da administração preventiva do fármaco Bm5 em lagartas de *Bombyx mori* L. infectadas com o nucleopoliedrovírus - BmNPV. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil. *No prelo*.

Egorova, T., Vasilleva, L., Sankina, T., Nasirillaev, Y. & Phillippovich, Y. (1977) Enzymatic activity of soluble proteins in different Silkworm races (*B. mori* L.) *Journal of Genetics and Biology* **3**, 447-463.

Eguchi, M. & Sugimoto, T. (1965) Changes in esterase zymograms in the silkworm, *Bombyx mori* L., during development. *Journal of Insect Physiology* **11**, 1145-1149.

Eremina, O. (1985) Studies on the effect of permethrine upon the esterase spectrum of some insects. *Insect Biochemistry* **1**, 83-86.

Federici, B.A. (1997) Baculovirus pathogenesis. pp. 33 in Miller, L. K. (Ed.). *The baculoviruses*. New York, USA, Springer Science+Business Media.

Fujihara, R. T., Forti, L.C., Almeida, M.C. & Baldin, E.L.L. (2011) Insetos de Importância Econômica: Guia Ilustrado para Identificação de Famílias. pp. 231. São Paulo, Brasil, FEPAF.

Gigliolli, A.A.S., Lapenta, A.S., Ruvolo-Takasusuki, M.C.C., Abrahão, J. & Conte, H. (2015) Morpho-functional characterization and esterase patterns of the midgut of *Tribolium castaneum* Herbst, 1797 (Coleoptera: Tenebrionidae) parasitized by *Gregarina cuneata* (Apicomplexa: Eugregarinidae). *Micron* **76**, 68-78.

Hamm, J.J. (1966) A modified azan staining technique for inclusion body viruses. *Journal of Invertebrate Pathology* **8**, 125-126.

Hanada, Y. & Watanabe, J. K. (1986) Manual de criação do bicho-da-seda. pp. 224. Curitiba, Brasil, COCAMAR.

Hawtin, R.E., Arnold, K., Ayres, M.D., Zanotto, P.M., Howard, S.C., Gooday, G.W., Chappell, L.H., Kitts, P.A., King, L.A. & Possee, R.D. (1995) Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology* **212**, 673-685.

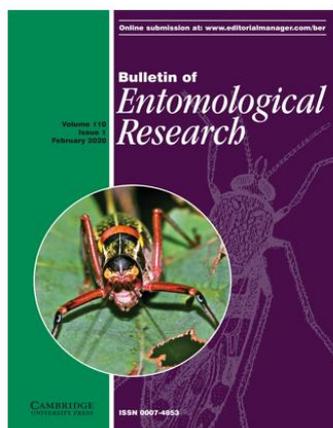
Hodgson, J.J., Arif, B.M. & Krell, P.J. (2011) Interaction of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus cathepsin protease progenitor (proV-CATH) with insect Baculovirus chitinase as a mechanism for proV-CATH cellular retention. *Journal of Virology* **85**, 3918-3929.

- 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.**(2006) On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. *Archives of Virology* **151**, 1257–1266.
- Jing, L., Fang, Y., Ying, X. Wenxing, H., Meng, X., Syed, M.N. & Fang, C.** (2005) Toxic impact of ingested Jatropherol-I on selected enzymatic activities and the ultrastructure of midgut cells in silkworm, *Bombyx mori* L. *Journal of Applied Entomology* **129**, 98-104.
- Junqueira, L.C.U. & Junqueira, L.M.M.S.** (1983) Técnicas básicas de citologia e histologia. 123 pp. (*Ed 1^o*). Santos, Brasil, Livraria e Editora Santos.
- Kumar, P. Baing, M. & Sengupta, K.** (1990) Handbook on pest and disease control of mulberry and silkworm. Economic and Social Commission for Asia and the Pacific. Nova York, ONU.
- Laufer, H.** (1961) Forms of enzymes in insect development. *Annals of the New York Academy of Sciences* **94**, 825-835.
- Montella, I.R., Schama, R. & Valle, D.** (2012) The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance – a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **107**, 437-449.
- Oakeshott, J.G., Papenrecht, E.A., Boyce, T.M., Healy, M.J. & Russel, R.J.** (1993) Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. *Genetica* **90**, 239-268.
- Ohkawa, T., Majima, K. & Maeda, S.** (1994) A cysteine protease encoded by the baculovirus *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology* **68**, 6619-6625.
- Oro, A.L.** (2017) Tegumento de *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) Infectado pelo *Bombyx mori Nucleopolyhedrovirus*. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular) Centro de Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil. *No prelo*.
- 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). *Journal of Invertebrate Pathology* **99**, 1–7.
- 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. *Journal of Invertebrate Pathology* **100**, 195–198.
- Santorum, M., Beu, C.C.L., Ribeiro, L.F.C. Santos, J.S. Santos, D.C. & Brancalhão, R.M.C.** (2017) Ampullae infection of the malpighian tubules of *Bombyx mori* by *Alphabaculovirus*. *Journal of Biosciences* **33**, 703-712.
- Senem, J.V., Torquato, E.F.B., Ribeiro, L.F.C. & Brancalhão, R.M.C.** (2016) Cytopathology of the trachea of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) to *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*. *Micron* **80**. 39–44.

- Slack, J.M., Kuzio, J. & Faulkner, P.** (1995) Characterization of *v-cath*, a cathepsin L-like proteinase expressed by the baculovirus *Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus*. *Journal of General Virology* **76**, 1091-1098.
- Snodgrass, R.E.** (1993) Principles of Insect Morphology. 666 pp. New York, USA, Cornell University Press.
- Staykova, T., Popov, P. & Ivanova, E.** (2012) Breed specific expression of gut silkworm (*Bombyx mori* L.) nonspecific esterases. *Journal of Bioscience and Biotechnology* **1**, 27-31.
- Terra, W.R. & Ferreira, C.** (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology* **109**, 1-62.
- 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). *Neotropical Entomology* **35**, 70-74.
- Vasconcelos, S.D.** (1996) Alternative routes for the horizontal transmission of a nucleopolyhedrovirus. *Journal of Invertebrate Pathology* **68**, 269-274.
- Vessaro-Silva, S.A.** (2017) Aspectos patológicos do músculo estriado de *Bombyx mori* (Lepidoptera; Bombycidae) infectado por AlphaBV. Tese (Doutorado em Biologia Comparada). Centro de Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil. *No prelo*.
- Vessaro-Silva, S.A., Neto, M.H.M., Brancalhão, R.M.C., Ribeiro, L.F.C., Guimarães, A.T.B. & Oliveira, C.M.T.** (2019) Antioxidant systems as a response to midgut cellular of *Bombyx mori* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Bombycidae) infection for Baculoviruses. *Journal of Economic Entomology* **20**, 1-9.
- Volkman, L.E. & Keddie, B.A.** (1990) Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis. *Seminars in Virology* **1**, 249-256.
- Watanabe, J.K., Yamaoka, R.S. & Baroni, S.A.** (2000) Cadeia produtiva da seda: diagnósticos e demandas atuais. pp. 129. Londrina, Brasil, IAPAR.
- Wu, G., Jiang, S. & Miyata, T.** (2004) Effects of synergists on toxicity of six insecticides in parasitoid *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* **97**, 2057-2066.
- Xu, M., Feifei, Z. & Keping, C.** (2017) Silkworm: A promising model organism in life science. *Journal of Insect Science* **17**, 1-6.
- Zhang, S., Xu, Y., Fu, Q., Jia, L., Xiang, Z. & He, N.** (2011) Proteomic analysis of larval midgut from the silkworm (*Bombyx mori*). *Comparative and Functional Genomics*, 1-13. doi: 10.1155/2011/876064.

ANEXO I

Normas para submissão de artigos na revista *Bulletin of Entomological Research*.



Bulletin of Entomological Research

•ISSN: 0007-4853 (Print), 1475-2670 (Online)
•Frequency: 6 issues per year

Aims and scope

The aims of the *Bulletin of Entomological Research* are to further our global knowledge of entomology through the generalisation of research findings rather than providing more entomological exceptions. The *Bulletin* publishes high quality and original research papers, 'critiques' and review articles concerning insects or other arthropods of economic importance in agriculture, forestry, stored products, biological control, medicine, animal health and natural resource management. The scope of papers addresses the biology, ecology, behaviour, physiology and systematics of individuals and populations. This includes the interactions between species (plants, hosts for parasites, natural enemies and whole communities), novel methodological developments, including molecular biology, in an applied context. The *Bulletin* does not publish the results of pesticide testing or traditional taxonomic revisions.

Styles of Paper

Bulletin of Entomological Research publishes two types of paper:

- Research Papers

A full account of a complete project, including details of experimental findings.

- Reviews

Literature overviews of recent research in a larger subtopic or comparative reviews of related work in different species. Reviews will normally be specially commissioned but we would welcome any suggestions from authors for reviews they wish to write. Reviews can be comparative across species or be confined to a single species.

We no longer publish Short Communications. However, short papers reporting exceptionally important findings, that are likely to be highly cited, will still be published, but as Research Papers. If the referees and editors judge a paper to be particularly significant then it will be fast-tracked for publication.

We also welcome 'Letters to the Editor' with comments on recently published papers to encourage a dialogue between readers and researchers.

Manuscript Preparation

Language

Manuscripts should be in English. We suggest that authors whose first language is not English have their manuscripts checked by a native English speaker before submission. This is optional, but will help to ensure that any submissions that reach peer review can be judged exclusively on academic merit. We offer a Cambridge service which you can find out more about [here](#), and suggest that authors contact as appropriate. Please note that use of language editing services is voluntary, and at the author's own expense. Use of these services does not guarantee that the manuscript will be accepted for publication, nor does it restrict the author to submitting to a Cambridge-published journal.

Manuscript content

Manuscripts should be prepared according to the following structure:

- The text, divided under appropriate headings. Clearly differentiate between primary (bold, large font size), secondary (bold, text font size) and tertiary (italics) headings
- Acknowledgements (if any)
- References (for further information about presenting references please see below)
- Tables, either at the end of the manuscript or as separate files. Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals and every table should be mentioned at least once in the text.
- Illustrations should be submitted as separate files in TIF or EPS format but captions to illustrations should be supplied on a separate sheet at the end of the main manuscript.

Research Papers should not exceed 8,000 words, while Reviews may be up to 10,000 words in length.

Abstract

Each paper must commence with an accurate, informative abstract in one paragraph that is complete in itself and intelligible without reference to text or figures. It should not exceed 250 words. A short title should also be provided for use as a running head, and authors should specify keywords for the article.

References

References must be based on the name and year system, give full journal titles and conform to the following styles:

Follett, P.A. & Roderick, G.K. (1996) Genetic estimates of dispersal ability in the leucaenapsyllid predator *Curinuscoeruleus* (Coleoptera: Coccinellidae): implications for biological control. *Bulletin of Entomological Research* **86**, 355-361.

Nevill, E.M., Kappmeier, K. & Venter, G.J. (1993) Tsetse fly research in Zululand. p. 81 in *Proceedings of the ninth Entomological Congress organized by the Entomological Society of Southern Africa, Johannesburg, 28 June-1 July 1993* Pretoria, Entomological Society of South Africa.

Wilson, M.D. & Post, R.J. (1994) Integration of morphometric, cytogenetic and molecular techniques: a case study of *Simuliumdamnosum* pp. 215-224 in Hawksworth, D.L. (Ed.) *The identification and characterization of pest organisms*. Wallingford, CAB International.

Please list papers by more than two authors, but with the same first author, by year sequence and alphabetically within each year. Citation of authors in the text should appear in the form: Polaszek (1996) or (Polaszek, 1996). Authors should be cited in chronological order as: (Blackman et al., 1994; Roberts & Kumar, 1995).

Tables

Tables should be in a simple form. They should not be used if text or illustrations give the same information. They can either be submitted as separate files (Microsoft Word or Excel) or embedded within the main manuscript text file. Each table must be accompanied by a clear and concise caption.

Illustrations

Illustrations should be submitted in TIF or EPS format at approximate final publication size. Resolution of artwork should be at the following minimum resolutions: Line artwork (black & white), 1200dpi; Combination, i.e. line/tone (greyscale), 800dpi; Black & White halftone (greyscale), 300dpi; and colour halftone, 300dpi. Comprehensive guidance on creating suitable electronic figures is available [here](#).

Captions should be listed at the end of the manuscript text. Please:

- ensure text figures, line drawings, computer-generated figures and graphs are of sufficient size and quality to allow for reduction
- avoid the use of grey tints or complex hatching
- use halftone images where they make a real contribution to the text, and ensure they are of good quality at the intended final size with any required lettering or numbering inserted by the author
- type figure captions and numbers on a separate page at the end of the body text of the manuscript
- inform the Editorial Office at the earliest opportunity if you wish to use colour figures (we will ask authors to pay in advance for the use of colour, but we can advise on how this can be kept to a minimum if we know your plans).

Supplementary Material

There will normally be one of the following reasons for you to be supplying supplementary material to accompany the online version of your article:

1. You wish to link to additional information which due to its nature does not lend itself to print media (examples- full data sets, movie or sounds files etc...)
2. The Editor of the Journal has requested that you extract certain information from the original article in order to allow for space constraints of the print version.
3. You have requested additional material to be available to accompany an article that does not normally allow such material to be included (example – tables to accompany a correspondence article).

N.B. Please note that no copyediting or quality assurance measures will be undertaken on supplementary material (other than to ensure that the file is intact). The authors therefore warrant that the supplementary material that they submit is in a suitable format for publication in this manner. The material shall be published online in exactly the form that it is supplied.

Submission

Please follow the following instructions to supply supplementary material to accompany the online version of your article:

1. Each supplementary file must be supplied as a separate file. Do not supply this material as part of the file destined for publication in the print journal.
2. Each supplementary file must have a clear title (e.g. Supplementary Figure 1).
3. Provide a text summary for each file of no more than 50 words. The summary should describe the contents of the file. Descriptions of individual figures or tables should be provided if these items are submitted as separate files. If a group of figures is submitted together in one file, the description should indicate how many figures are contained within the file and provide a general description of what the figures collectively show.
4. The file type and file size in parentheses.
5. Ensure that each piece of supplementary material is clearly referred to at least once in the print version of the paper at an appropriate point in the text, and is also listed at the end of the paper before the reference section.

Format and file size

- File sizes should be as small as possible in order to ensure that users can download them quickly.
- Images should be a maximum size of 640 x 480 pixels at a resolution of 72 pixels per inch.
- Authors should limit the number of files to under ten, with a total size not normally exceeding 3 MB. Sound/movie files may be up to 10 MB per file; colour PDFs/PowerPoint may be up to 5 MB per file; all other general file types may be up to 2 MB per file but most files should be much smaller.
- We accept files in any of the following formats (if in doubt please enquire first):

MS Word document (.doc) , Adobe Acrobat (.pdf), Plain ASCII text (.txt), Rich Text Format (.rtf), WordPerfect document (.wpd), HTML document (.htm), MS Excel spreadsheet (.xls), GIF image (.gif), JPEG image (.jpg), TIFF image (.tif), MS PowerPoint slide (.ppt), QuickTime movie (.mov), Audio file (.wav), Audio file (.mp3), MPEG/MPG animation (.mpg)

If your file sizes exceed these limits or if you cannot submit in these formats, please seek advice from the editor handling your manuscript.

Technical and Nomenclature Standards

All work should use SI units as standard.

Anatomical terms can be a mixture of the English vernacular and Latin, depending on current usage. When a Latin term is selected for use, it should correspond with the *Nomina Anatomica Veterinaria*. Where doubts could arise, then the first time a vernacular term is used, the Latin should be provided in parentheses; thereafter the vernacular can be used alone.

Manuscript Preparation

We kindly ask that you follow the instructions below for the final manuscript. This will minimize the risk of errors being introduced during the publishing process.

- Use double line spacing and ample margins (at least 2.5 cm) on each side

- Do not underline anything
- Number each line consecutively across the pages of the manuscript, rather than within pages
- Do not indent the start of each paragraph
- Number every page (preferably the top right corner)
- Use italics for taxonomic nomenclature and bold for headings
- Use standard abbreviations (e.g. Fig. and Figs) and SI units
- Use British rather than American spellings, and 'z' rather than 's' spellings in words with 'ize'

Voucher specimens

The deposition of voucher specimens should be considered where appropriate.

Manuscript submission

All manuscripts should be submitted via our on-line system, Editorial Manager, at www.editorialmanager.com/ber New users will need to register first.

Please note that the journal uses software to screen papers where there is reason to believe that material may not be original. By submitting your paper you are agreeing to any necessary originality checks your paper may have to undergo during the peer review and production processes.

Peer review

Communications for peer review will be by email as far as possible. All contributions will be reviewed by at least two referees to ensure both accuracy and relevance. The referees' reports will provide a basis on whether we accept a paper, and revision may be required before final acceptance.

Authors are invited to suggest the names and contact details (including e-mail addresses) of at least two, and up to four, potential referees for their paper when submitting their manuscript, and are asked to provide keywords indicating the content of the manuscript. When submitting, please also give a brief description (no more than 50 words) of why the manuscript is an important contribution to entomology research.

Publication

Copyright

The policy of the Bulletin of Entomological Research is that authors (or in some cases their employers) retain copyright and grant Cambridge University Press a licence to publish their work. In the case of gold open access articles this is a non-exclusive licence. Authors must complete and return an author publishing agreement form as soon as their article has been accepted for publication; the journal is unable to publish the article without this. Please download the appropriate publishing agreement [here](#).

For open access articles, the form also sets out the Creative Commons licence under which the article is made available to end users: a fundamental principle of open access is that content should not simply be accessible but should also be freely re-usable. Articles will be published under a Creative Commons Attribution license (CC-BY) by default. This means that the article is freely available to read, copy and redistribute, and can also be adapted (users can “remix, transform, and build upon” the

work) for any commercial or non-commercial purpose, as long as proper attribution is given. Authors can, in the publishing agreement form, choose a different kind of Creative Commons license (including those prohibiting non-commercial and derivative use) if they prefer.

Proofs

Authors will receive a PDF file of page proofs by email, and will be asked to return corrected proofs within 72 hours.

Offprints

The author (or main author) of an accepted paper will receive a free PDF of their paper. Paper offprints are available for a fee and should be ordered at proof stage.

Reprints

For all reprint pricing details, please contact special_sales@cambridge.org

Last updated January 2nd, 2020

ORCID

Bulletin of Entomological Research now requires that all corresponding authors identify themselves using their ORCID iD when submitting a manuscript to the journal. ORCID provides a unique identifier for researchers and, through integration in key research workflows such as manuscript submission and grant applications, provides the following benefits:

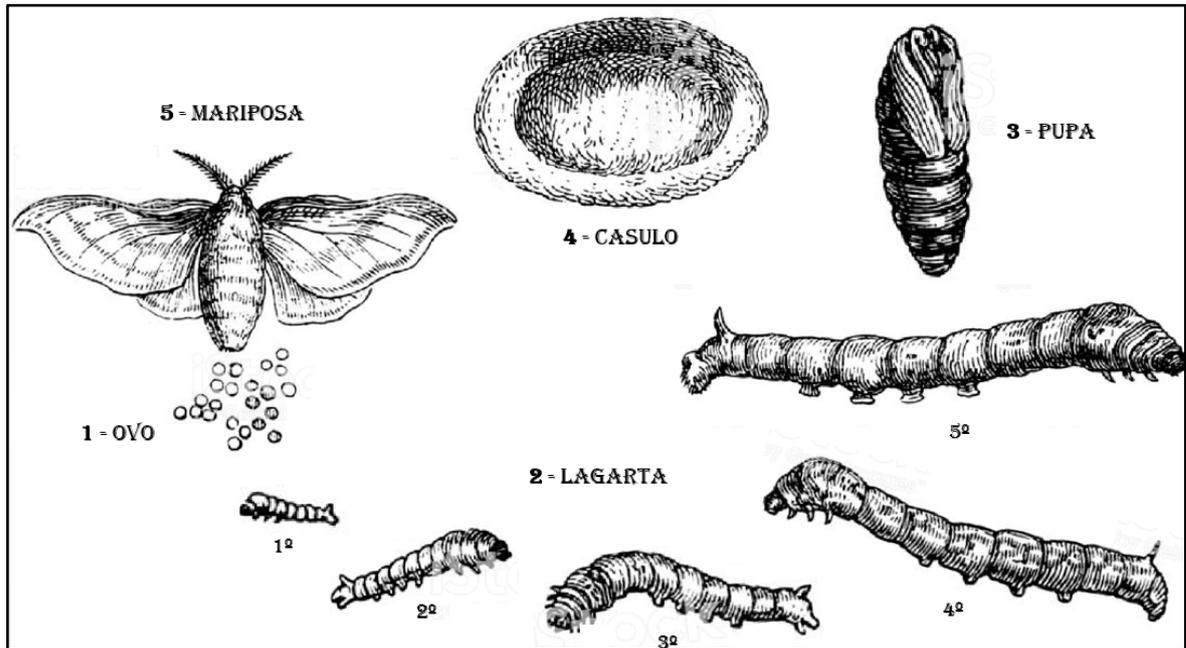
- Discoverability: ORCID increases the discoverability of your publications, by enabling smarter publisher systems and by helping readers to reliably find work that you've authored.
- Convenience: As more organisations use ORCID, providing your iD or using it to register for services will automatically link activities to your ORCID record, and will enable you to share this information with other systems and platforms you use, saving you re-keying information multiple times.
- Keeping track: Your ORCID record is a neat place to store and (if you choose) share validated information about your research activities and affiliations.

If you don't already have an iD, you'll need to create one if you decide to submit a manuscript to *Bulletin of Entomological Research*. You can register for one directly from your user account on Editorial Manager or via <https://ORCID.org/register>.

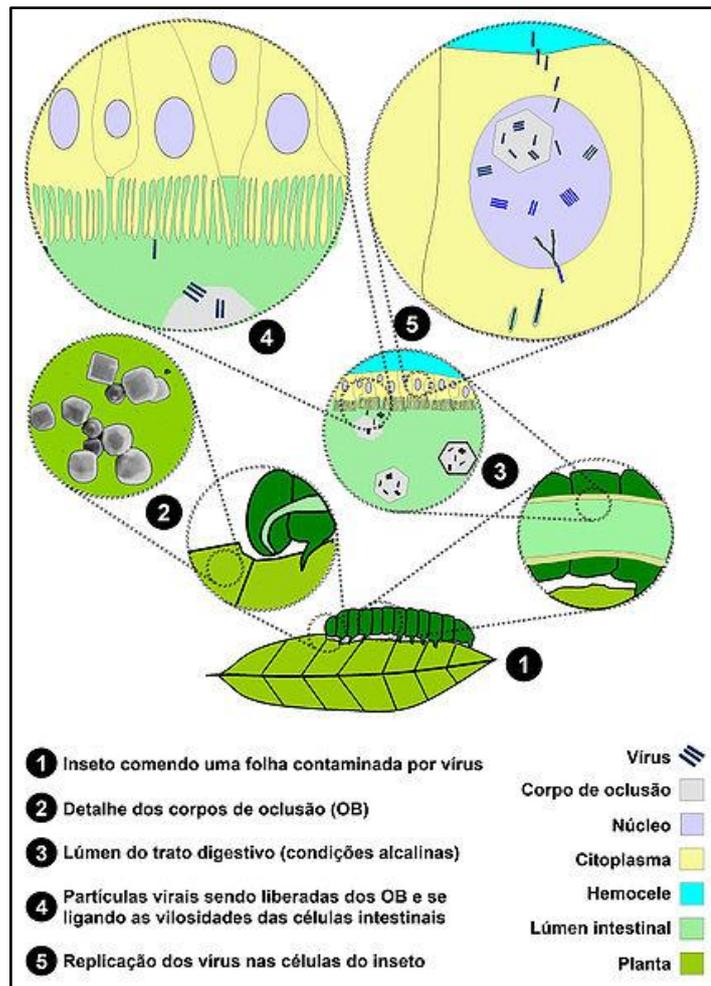
If you already have an iD, please use this when submitting, either by linking it to your Editorial Manager account or supplying it during submission by using the "Link to ORCID record" button.

Last updated June 12th, 2019.

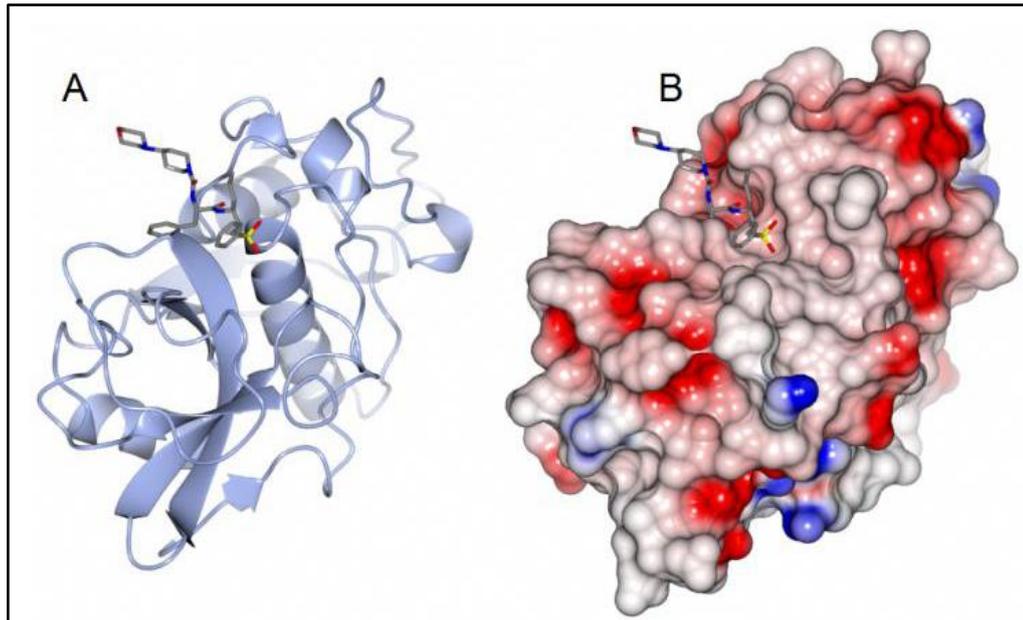
ANEXO II



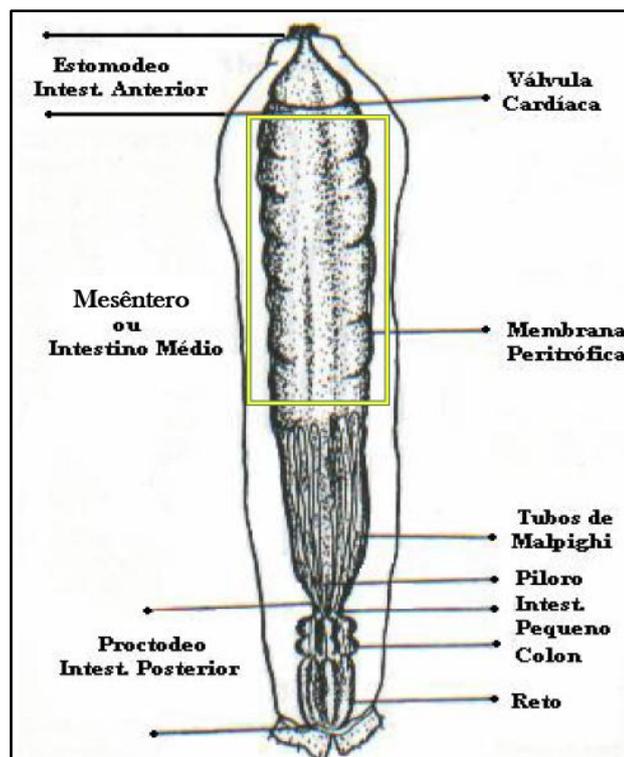
1 – Ciclo de vida do bicho-da-seda. (Fonte: <https://www.istockphoto.com/br/vetor/fases-do-bicho-da-seda>. Com modificações).



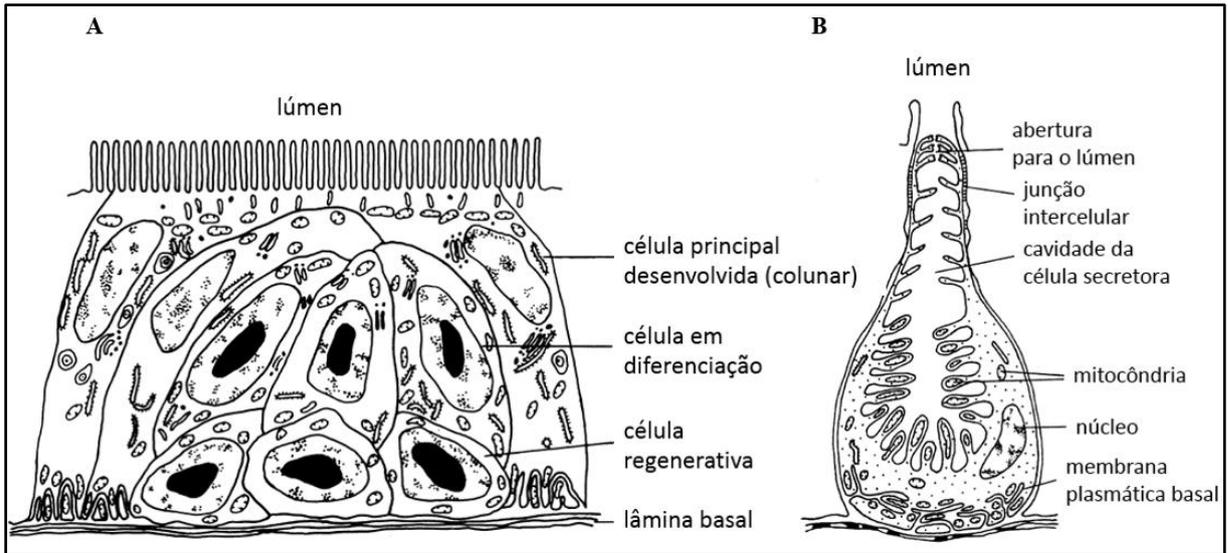
2 – Ciclo de infecção do baculovírus *BmNPV*. (Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Baculoviridae>).



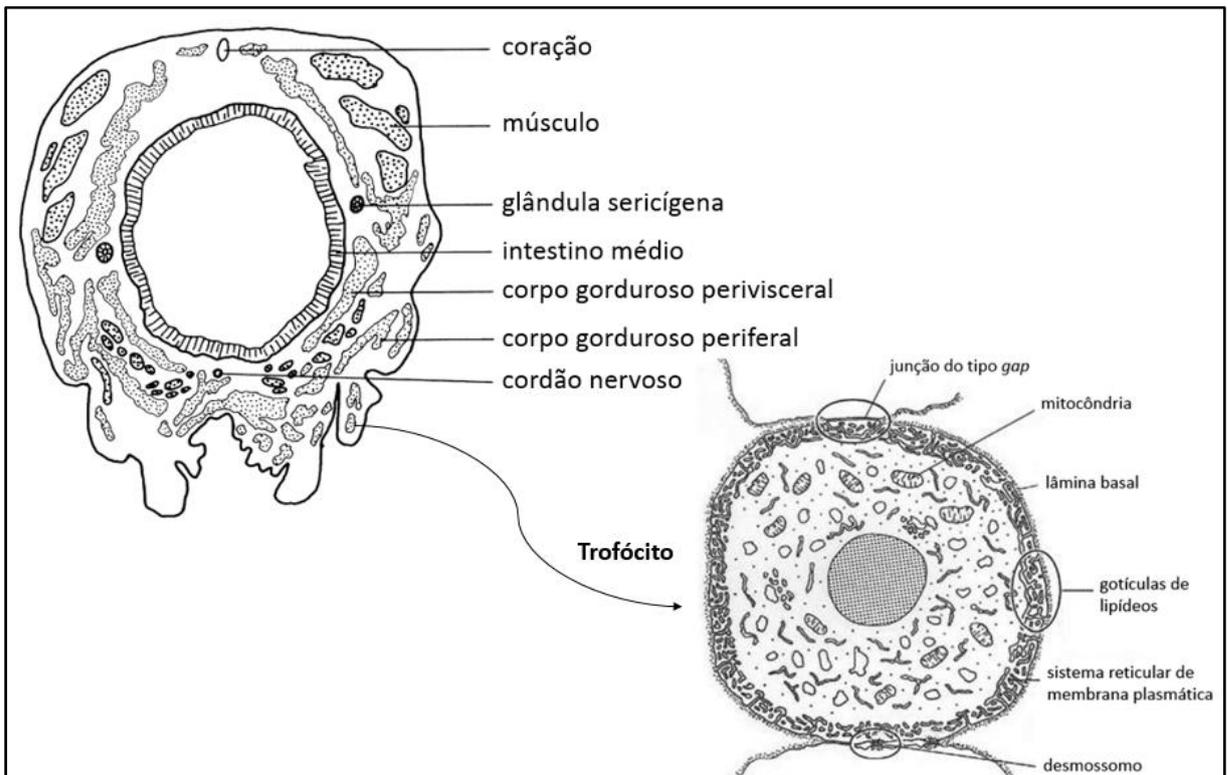
3 - Estrutura terciária da *BmNPV-Cath* ligada ao inibidor MYP (cinza) representada na forma ribbons (A) e por superfície eletrostática (B) (Bueno et al., 2018).



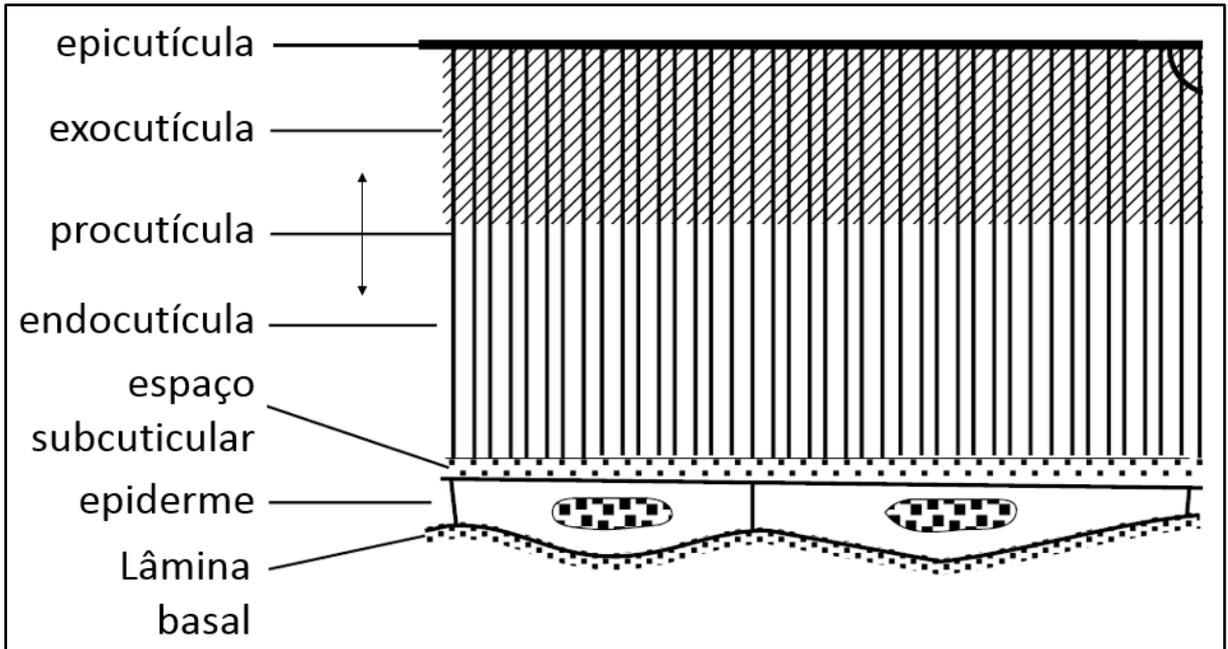
3 – O intestino médio (mesêntero) do bicho-da-seda. Um tubo cilíndrico comprido e largo, que sofre um estreitamento na sua porção final, é a principal parte do sistema digestivo onde ocorre a digestão e assimilação do alimento (adaptado de Krishnaswami et al., 1979).



4 – Células regenerativas do intestino médio. (A) Diagrama de um nidus na base do epitélio do intestino médio mostrando a diferenciação das células principais. (B) Diagrama de uma célula caliciforme (adaptado de Chapman, 1998).



5 – Secção transversal da distribuição do corpo gorduroso em uma lagarta. Em destaque uma célula adiposa (adaptado de Chapman, 1998).



6 – Estrutura básica do tegumento de uma lagarta (adaptado de Chapman, 1998).