

LESÕES ULTRA-ESTRUTURAIS DO CÉREBRO DE CAMUNDONGOS ALBINOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE COM O VIRUS PIRY (BeAn 24232)

Ermelinda R. M. da CRUZ (1)

RESUMO

A inoculação experimental do vírus Piry (Be An 24232) em camundongos albinos recém-nascidos induz à formação de uma encefalite com lesões graves, de células isoladas ou focais, que evoluem para necrose e na qual a reação inflamatória é discreta e só aparece na fase final da evolução. A modificação mais precoce é a diminuição da eletrondensidade e a marginação da cromatina nuclear. Seguem-se modificações de organelas, mais intensas nas mitocôndrias e no Golgi, com reagrupamento delas. Os citolisosomas surgem no citoplasma celular e, em maior quantidade nas células produtoras de vírions. Os GERL são muito proeminentes e guardam relação direta com a presença de maior número de partículas. O vírion é montado na membrana citoplasmática de neurônios e acumulado no interstício, com raras vesículas vírus-símiles no citoplasma, vizinhas às áreas de síntese virótica.

INTRODUÇÃO

O vírus Piry foi isolado pela primeira vez em 1960, de amostras de fígado e baço de um marsupial (*Philander opossum*) capturado pelo grupo do Instituto Evandro Chagas na Floresta do Utinga em Belém, Pará, Brasil (WOODALL²⁷). Faz parte do grupo antigênico da Es-tomatite Vesicular dos Arbovirus. Sobre este vírus já foram feitos estudos sorológicos (PINHEIRO & col.²⁵) para observar a taxa de imunidade nos habitantes de várias áreas da região Amazônica, e ocorrência de casos humanos (PINHEIRO²⁶) e estudos da patologia experimental a nível de microscopia óptica (DIAS⁹). Estudos de microscopia eletrônica porém, foram feitos, no sistema nervoso central, por BERGOLD & MUNZ⁶, apenas para identificação da partícula virótica. Também nas fibras do

miocárdio ARAUJO & col.², demonstraram pela primeira vez o aparecimento e a reduplicação do vírus, assim como as alterações ultra-estruturais precoces.

O estudo do vírus Piry é de grande interesse não só por ser um arbovírus da região Amazônica, mas também por ser patógeno para a espécie humana. Experimentalmente o quadro mais grave observado até agora é o da encefalite, que no entanto ainda não foi estudada completamente. Este trabalho procura preencher essa lacuna, analisando as lesões ultra-estruturais do cérebro produzidas pelo vírus Piry no modelo mais clássico: em camundongos albinos recém-nascidos infectados experimentalmente.

Trabalho executado na Seção de Patologia Virótica (Prof. Dr. Ronaldo de Araujo) do Núcleo de Patologia Regional e Higiene da Universidade Federal do Pará e no Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal (Prof. Dr. Luigi Bogliolo) da Universidade Federal de Minas Gerais. Projeto SIP/02-006 do Programa do Trópico Úmido do CNPq e Projeto B/39/79/093/00/00 da FINEP. Integrante de pesquisa conjunta com o Instituto Evandro Chagas, Belém e o Instituto de Medicina Tropical de Hamburgo, Alemanha, segundo convênio CNPq-KFA. Trabalho elaborado com base na Tese de Doutorado em Patologia Humana apresentada ao DAPML da UFMG

(1) Prof. Ass. Dr., Pesquisadora do NPRH da UFFa

MATERIAL E MÉTODOS

Foi usada a amostra BeAn 24232 do vírus Piry, fornecida pelo Instituto Evandro Chagas para duas séries de inoculações.

Foram inoculados por via intra-cerebral 3 lotes com 6 animais em cada, de camundongos albinos suíços recém-nascidos com 2 dias de idade. O inoculum para cada animal foi 0,02 ml de uma suspensão em solução de albumina bovina, de tecido cerebral de camundongos recém-nascidos infectados previamente com o vírus Piry. Idêntico número de animais usou-se para controle, tendo recebido cada um, também por via intra-cerebral, 0,02 ml apenas da solução de albumina bovina. Tanto os animais controle como os inoculados com suspensão do vírus Piry foram sacrificados 12, 24 e 36 horas após a inoculação sendo utilizados em cada etapa dois animais para exame em microscopia eletrônica, um para microscopia óptica e um para controle. Posteriormente, foi feita outra série de inoculação, idêntica à acima referida.

A partir das 24 horas de inoculados com a suspensão de vírus, os animais começaram a ter morte espontânea e não sobreviveram às 39 horas. Os animais controle restantes sobreviveram a este período e foram desprezados.

Apenas os animais sacrificados foram utilizados para coleta de material para estudo. Os animais eram sacrificados por decapitação sendo retirados fragmentos de 1 mm³ da porção central e posterior do cérebro, que foram fixados por imersão em solução de aldeído glutárico a 2,5% em tampão fosfato 0,1, pH 7,2 (GLAUERT¹²) os da primeira inoculação e em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (KARNOVSKY¹⁶) com pH 7,2 os da segunda inoculação.

Após lavagem em tampão fosfato os fragmentos foram processados pela técnica de rotina, com pós-fixação em ácido ósmico a 1% e desidratados em alcoóis de concentração crescente e incluídos em Epon 812, fórmula de LUFT¹⁷, com pequenas modificações (ARAÚJO & col³).

Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo (KARNOVSKY¹⁶) e examinados em microscópios Zeiss Em — 952 e Siemens Elmiskop 101.

RESULTADOS

Microscopia óptica

12 horas após a inoculação as lesões são discretas e consistem em alterações degenerativas de neurônios isolados, distribuídos irregularmente. Os neurônios assim comprometidos mostram núcleos retraídos, com marginação cromatínica, citoplasma levemente eosinófilo (Fig. 1A e 1B) e aparente redução do volume celular; alguns deles, pela maior retração citoplasmática, configuram corpúsculos eosinofílicos com núcleos picnóticos na periferia. Mais numerosas são as células de citoplasma e núcleo de aspecto vesiculoso e lobulado, de cromatina rarefeita. O interstício é alargado e esponjoso (Fig. 1A). Pequenos focos com grumos de cromatina são encontrados, ainda, em várias áreas (Fig. 1B, setas).

24 horas após a inoculação estão presentes as lesões descritas acima porém com distribuição focal e em maior intensidade. Estabelecem-se nesta fase lesões vasculares, constantes de tumefação endotelial com diminuição do lume, exsudação celular incipiente e edema perivascular (Fig. 1C).

36 horas após a inoculação a necrose focal é mais evidente; fragmentos e grânulos de cromatina são bem identificáveis dentro de espaços claros. A disposição linear destes focos sugere que os mesmos formam ao longo do trajeto de capilares.

A tumefação celular, citoplasmática e nuclear, é intensa, assim como o edema. Coexistem focos hemorrágicos perivasculares (Fig. 1D).

Vasos com hiperemia e intensa exsudação neutrofilica são ainda encontrados. São raros os leucócitos no interstício, mesmo nos focos de necrose. O edema perivascular persiste e, em algumas áreas, é mais intenso (Fig. 1D).

RESULTADOS

Microscopia eletrônica

Com 12 horas após a inoculação a distribuição das lesões é irregular, sem predileção por áreas ou células. São atingidas tanto as células gliais como as neuronais e seus prolongamentos.

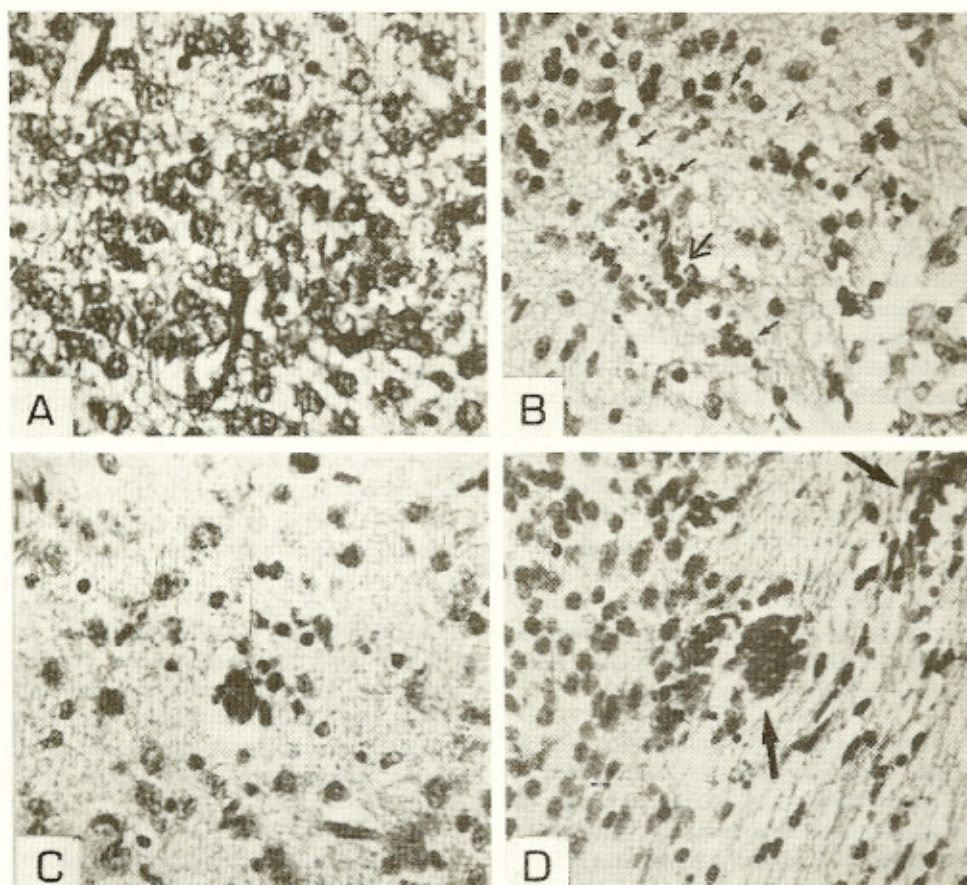


Fig. 1 — Cérebro de camundongo albino inoculado com o vírus Piry. A) Neurônios com citoplasma claro e tumefeito e núcleo vesiculosos, lobulados, com rarefação da cromatina. Notar dois capilares de luz virtual e o edema perivascular. H.E., 400 \times . B) Grânulos cromatinicos e núcleos picnóticos dispostos linearmente (setas). No canto inferior direito edema intersticial intenso com dissociação de células e fibras nervosas. H.E., 100 \times . C) Capilar com intensa tumefação de células endoteliais, com obstrução da luz. Edema perivascular com presença de alguns granulócitos neutrófilos. Há, ainda, alguns núcleos picnóticos junto ao capilar. H.E., 400 \times . D) Dois focos de hemorragia recente (setas) ao lado de capilar intensamente alterado. H.E., 100 \times .

As lesões celulares localizam-se tanto no núcleo como no citoplasma. No núcleo as alterações mais evidentes consistem em diminuição da eletrondensidade da heterocromatina e retração e/ou marginação da cromatina (Fig. 2A).

No citoplasma são as seguintes as principais alterações: **As mitocôndrias** são tumefeitas, com dilatação das cristas, cristólise, rarefação e vacúolos na matriz (Fig. 2A). **O Complexo de Golgi** apresenta hipertrofia e hiperplasia muito salientes, com grande aumento numérico de vesículas "coated", habitualmente acumuladas irregularmente em uma das extremidades com complexo (Fig. 2A). Essas alterações são mais

evidentes nas áreas perinucleares e há continuidade da membrana nuclear com a do complexo de Golgi e a do retículo endoplasmático (Fig. 2A).

Com 24 horas após a inoculação há progressão das alterações celulares com áreas de edema intracelular e focos de reagrupamento de organelas em torno do complexo de Golgi, com vesículas do retículo em posição periférica e, mais externamente ainda, retículo endoplasmático dilatado e algumas mitocôndrias que, nesta fase, apresentam-se bem distendidas, tumefeitas e edematosas (Fig. 2B).

Os citolisosomas estão grandemente aumentados em número, em relação aos cérebros examinados 12 horas após a inoculação e são muito eletrondensos. Na maioria das vezes estão

agrupados; entre eles destacam-se nitidamente corpos densos, em torno dos quais é evidente a presença de organelas (Fig. 2B).

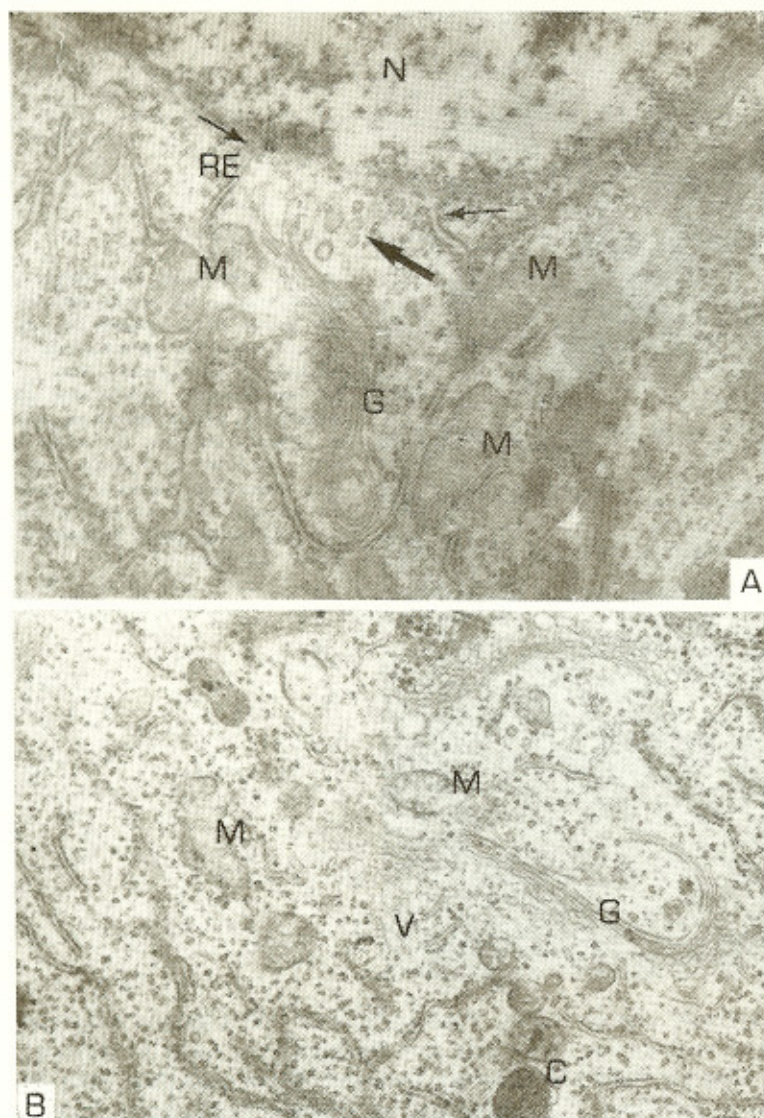


Fig. 2 — Cérebro de camundongo albinos inoculado com o vírus Piry. A) Neurônio com núcleo (N) de aspecto pálido pela acentuada diminuição dos grupos cromatinicos, com membrana nuclear pouco evidente e em aparente continuidade (setas delgadas) com as do complexo de Golgi (G) e do retículo endoplasmático (RE). Mitocôndrias (M) com tumefação, cristólise e pequenos vacúolos na matriz. Há aumento das chamadas vesículas "coated" do Golgi (seta espessa). 31.000X.

B) Início de reagrupamento de organelas no citoplasma de neurônios: em volta do complexo de Golgi (G), há numerosas pequenas vesículas (V), mitocôndrias (M) distendidas e tumefeitas, retículo endoplasmático (RE) com esboço de dilatação e corpos densos (C). 3.000X

As partículas viróticas brotam na superfície da membrana celular de neurônios (Fig. 3A) e acumulam-se entre as células, em verdadeiros espaços intersticiais (Fig. 3B). Os vírions apresentam-se em forma de bala ou circulares, tem porção central mais eletrondensa, separada do capsídio por halo claro; por fora do capsídio o envelope viral mostra algumas projeções filiformes delicadas. A média das medidas para as partículas completas em forma de bala foi de

143 nm X 33 nm e para as partículas circulares 37,8 nm.

Com 36 horas após a inoculação são ainda as modificações ultra-estruturais já descritas mais intensas, principalmente o edema celular e a presença de vesículas intracitoplasmáticas. As mitocôndrias, mostram, ainda, cristas com disposição lamelar e empilhamento, formando figuras de mielina (Fig. 4) e matriz com aumen-

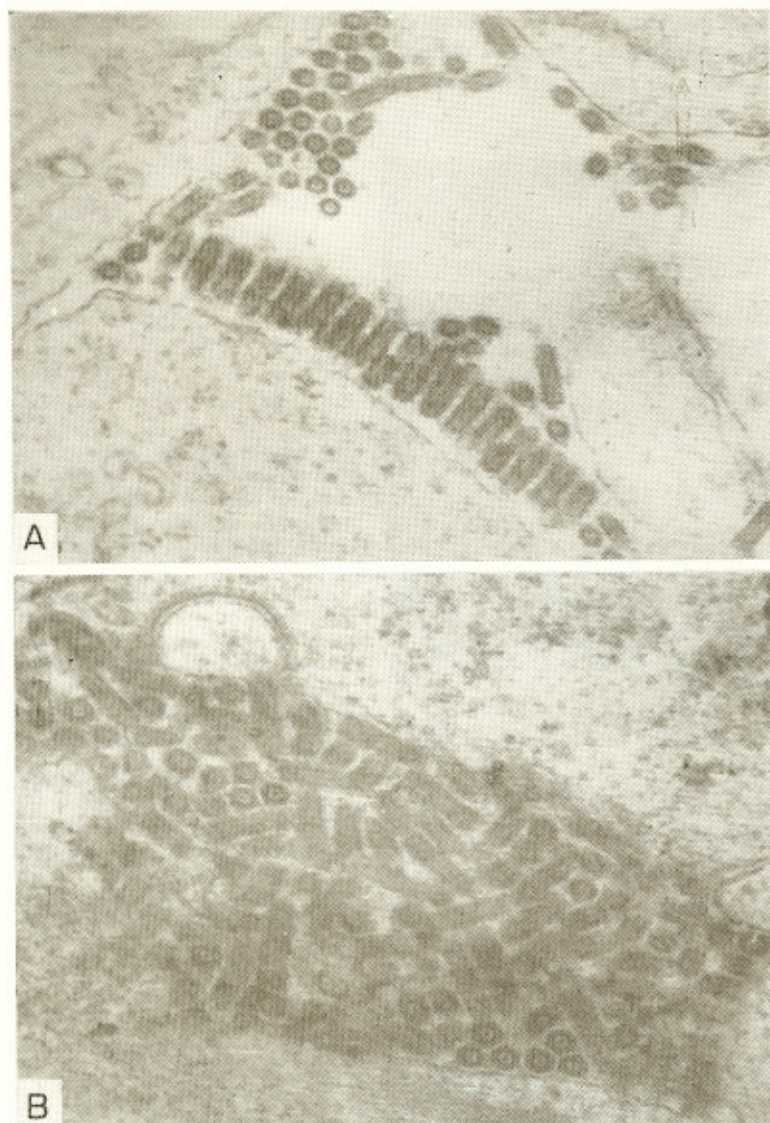


Fig. 3 — Cérebro de camundongo albinos inoculado com o vírus Piry. A) Fase inicial do brotamento de partículas do vírus Piry na membrana citoplasmática de neurônio. 107.000 \times . B) Fase posterior, com vírions acumulados em grande quantidade entre as células. Partículas em forma de bala de revólver, com porção central mais eletrondensa, separada do capsídeo por halo claro; envelope virótico com pequenas projeções filiformes delicadas. 107.000 \times

to de densidade. No retículo endoplasmático a tumefação aumenta e formam-se numerosas áreas claras, à custa da dilatação das cisternas (Fig. 4). Em apenas uma das células foi observada a presença de algumas partículas viróticas em cisternas dilatadas do retículo.

São ainda encontradas células isoladas em necrose (Fig. 5A).

As vesículas adquirem três tipos principais: **Tipo 1** (Fig. 5A): grandes e grosseiras, localizadas nos citolisosomas ou no citoplasma de células em necrose; **Tipo 2** (Fig. 4): grandes, isoladas, com membrana nítida, situadas em orga-

nelas; **Tipo 3** (Fig. 5B): vírus-símiles, pequenas, com halo eletrotransparente entre o "core" e a membrana vesicular. Estas vesículas, mais numerosas que as demais, localizam-se frequentemente entre o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático.

COMENTÁRIOS

Uma das características básicas das lesões induzidas pelo vírus Piry consiste no fato de atingirem apenas células isoladas ou pequenos focos de tecido nervoso, bem circunscritos; essas lesões são representadas por degenerações, que evoluem até a necrose. A cariorrexe é a



Fig. 4 — Cérebro de camundongo albino inoculado com o vírus Piry. Na vizinhança do núcleo (N) e em torno do complexo de Golgi (G) há vesículas grandes isoladas (V), retículo endoplasmático (RE) discretamente dilatado e mitocôndrias eletrodensas iniciando formação de figuras de mielina (setas curtas). Toda a extensão da membrana citoplasmática mostra partículas viróticas em brotamento (estrelas). Notar a intensa tumefação dos dendritos vizinhos, na parte inferior da eletromicrografia, abaixo das estrelas. 26.600X.

expressão morfológica mais saliente dessa última. Resulta disso a presença de fragmentos nucleares conglomerados em pequenos focos separados por ampla zona de tecido normal, e tal aspecto constitui um padrão morfológico relativamente constante. O mesmo aliás é encontrado nos demais órgãos infectados com o mesmo vírus (DIAS & col.¹⁰). Resposta inflamatória, discreta, aparece na fase final, marcada predominantemente, por hiperemia e marginação dos leucócitos. Não foram encontrados corpos de inclusão.

O vírus Piry, portanto, parece induzir reação inframatória apenas secundariamente, como consequência das alterações celulares degenerativo-necróticas.

As alterações mais precoces causadas pelo vírus Piry são, aparentemente, as nucleares. O núcleo torna-se pálido e sua cromatina se marginaliza. Essa modificação é nítida já 12 horas após a inoculação, em células neuronais e gliais, predominando nas primeiras. É impossível afirmar apenas pelo exame morfológico (MINS¹⁸;

ARAUJO¹) se essa modificação nuclear representa a primeira reação das proteínas ou do cerne virótico com a célula infectada.

Nas mitocôndrias as modificações são leves e aparentemente reversíveis na fase inicial, enquanto que na fase final são mais graves e se enquadram no tipo das encontradas em células em necrose ou com lesões tóxicas intensas (PEREZ TAMAYO²³). A concomitância destas alterações com aumento do número dos citolisosomas e o desenvolvimento da necrose celular parecem confirmar essa afirmativa.

No complexo de Golgi a modificação inicial consiste em hipertrofia e hiperplasia, em algumas células, ambas avaliadas por comparação com células vizinhas da mesma natureza. A existência de contactos dos sáculos do complexo de Golgi com a membrana nuclear, já alterada pela infecção virótica, pode sugerir a participação dessa estrutura na síntese posterior dos vírions. A modificação que parece realmente ter relação com o aumento da atividade de síntese nestas células está representada pelo grande nú-

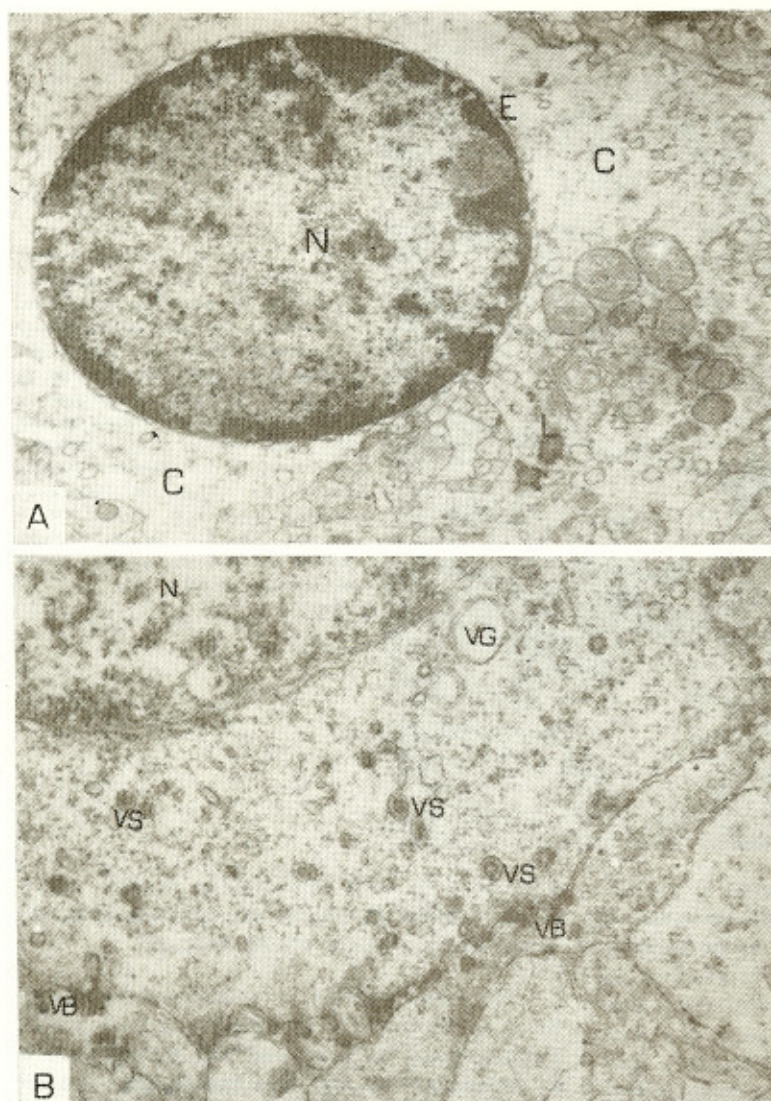


Fig. 5 — Cérebro de camundongo inoculado com o vírus Piry. A) Células com alterações iniciais de necrose. Núcleo (N) com alterações da textura cromatinica e dilatação do espaço peri-nuclear (E). O citoplasma mostra grande tumefação em zonas vazias de organelas (C) e constituição citolisosomas (L) complexos, com corpos densos, vesículas e várias organelas ainda identificáveis. 4.500 \times . B) Neurônios com núcleo (N) de aspecto pálido e pericárlion com vesículas grandes (VG) isoladas, vesículas vírus-símiles (VS) e partículas viróticas em brotamento (VB) na membrana citoplasmática. 27.000 \times .

mero das vesículas "coated" originadas do complexo de Golgi as quais, segundo MOLLENHAUER & WHALEY¹⁹, são responsáveis pelo aporte de material sintetizado nas células.

No **retículo endoplasmático** as alterações são discretas e localizadas, consistindo quase exclusivamente, em pequena dilatação de algumas cisternas isoladas. A modéstia dessas alterações contrasta com a abundância das partículas viróticas, cuja presença indica a ocorrência de síntese proteica ativa, o que deveria produzir hiperplasia de retículo. Mesmo nas zonas do citoplasma com reagrupamento das organelas o retículo endoplasmático pouco se modifica. Esse rearranjo das organelas pode ser interpre-

tado como a expressão morfológica de sua participação na síntese do vírus. A ausência de hiperplasia do retículo endoplasmático em nosso material experimental teria então, uma interpretação lógica: as eletromicrofotografias só documentam as fases posteriores às da síntese proteica.

Utilizamos a classificação de GORDON & col.¹³ para caracterizar os tipos de citolisosomas encontrados em nosso material. Estes, detectados já 12 horas após a inoculação, aumentam nitidamente de tamanho e número após 24 e 36 horas. São numerosos os citolisosomas C₂ e seu aumento acompanha o progredir da intensidade das outras alterações celulares. São espe-

cialmente freqüentes nas fotografias que documentam acúmulo virótico no interstício. Talvez indiquem células que sintetizam mais proteínas viróticas, ou seja, aquelas que são mais agredidas pelo vírus e, portanto, mais necessitadas de "turnover" mais rápido. Provavelmente a presença precoce dos citolisosomas representa a expressão morfológica dessa condição, uma vez que em animais jovens a quantidade desse lisosomas é constante (PETERS & col.²⁴).

Um achado muito freqüente foi a presença dos chamados GERL (associação entre Golgi, Retículo Endoplasmático e Lisosomas) (NOVIKOFF²²), particularmente nos animais sacrificados 36 horas após a inoculação. Entre as infecções por arbovírus amazônicos analisadas com a microscopia eletrônica, é esta a primeira em que os GERL aparecem tão freqüentemente. Como a infecção com o vírus Piry é a que produz maior abundância de partículas viróticas há portanto, aparentemente, relação direta entre o número dessas partículas e a abundância de GERL. Um achado que reforça essa interpretação é o de que, na lesão miocárdica pelo mesmo vírus, onde o número de partículas é muito menor, a ocorrência do GERL não foi documentada (ARAÚJO & col.²).

Os citolisosomas maiores, com aspecto de fagolisomas, são mais raros; encontrados apenas 36 horas após a inoculação. Isso parece relacionar-se com a maior extensão, nesta fase, dos fenômenos necróticos.

É de ressaltar que os citolisosomas não foram encontrados em células endoteliais: isto leva a supor que essas células não participam ativamente na disseminação da partícula virótica.

As vesículas do tipo 1 são de interpretação fácil, pela sua relação com outras estruturas que marcam os fenômenos regressivos celulares. As vesículas tipo 2, derivadas de vacuolização de organelas, guardam relação com as estruturas das quais derivam. As vesículas tipo 3 são semelhantes às vesículas granulares de (BURNS-TOCK⁷), porém delas se diferenciam por não guardarem relação direta com sinápses. Acumulam-se em maior número às proximidades das zonas de formação dos vírions na membrana e seu aspecto morfológico sugere a possibilidade de que se tratem de vesículas contendo material virótico, ou seja, de locus intra-citoplasmá-

tico de síntese virótica. A disposição destas vesículas em áreas específicas; certo arranjo, embora pouco visível, em fileiras irregulares; sua proximidade com a membrana celular onde ocorre a montagem do vírus e o fato de não terem sido encontrados fora desta localização, são argumentos a favor dessa interpretação.

Os resultados de estudos anteriores (BERGOLD & MUNZ⁶; ARAÚJO & col.²) e a documentação do presente trabalho permitem afirmar que a membrana citoplasmática é o locus principal de montagem dos vírions. A síntese virótica foi documentada em neurônios praticamente apenas na membrana citoplasmática. Outro ponto de formação virótica foi encontrado em apenas uma célula, onde o vírus foi visto em cisterna dilatada do retículo endoplasmático. Isto parece indicar que documentamos apenas a fase inicial da multiplicação virótica (MUSSGAY & WEIBEL²¹; CHAIN & col.⁸; ACHESON & TAMM⁴) pois na fase tardia esta multiplicação efetua-se em vesículas citoplasmáticas (MORGAN & col.²⁰; ERLANDSON & col.¹¹; HIGASHI & col.¹⁴; ARTSOB & SPENCE⁵). Os vírions completos formam grandes acúmulos entre as células.

O vírion tem a forma clássica dos Rhabdovírus, em forma de bala, com limites externos paralelos. As medidas por nós efetuadas, em relação às de BERGOLD & MUNZ⁶, mostram vírion discretamente menor quanto ao comprimento, enquanto que a variação do diâmetro transversal foi bem maior. Também as medidas efetuadas por SHOPE & MURPHY citados por KARABATSOS & col.¹⁵, são maiores que as nossas. Estas diferenças podem estar relacionadas com o tipo de técnicas utilizadas para o exame das partículas.

O aspecto de edema intersticial observado na microscopia óptica corresponde, na microscopia eletrônica, a uma tumefação grande de dendritos isolados e dos pés vasculares dos astrócitos e não há acúmulo de líquido entre as células.

Os vasos sanguíneos mais alterados são os capilares. O lume de alguns deles é obstruídos em consequência do aumento de tamanho das células endoteliais. Essa lesão é importante porque pode contribuir, pela isquemia que produz, para a necrose de neurônios. Embora estes achados sejam referendados pelos exames dos

animais controle, é ainda muito discutido o real significado dos achados morfológicos da patologia vascular na gênese lesional do sistema nervoso central.

SUMMARY

Electron microscopic findings in swiss albino mice brain following experimental inoculation of Piry Virus (Type BeAn 24232)

The experimental inoculation of Piry Virus (BeAn 24232) in newborn albino mice induce an encephalitis with severe lesions of isolated cells or focal distribution, progressing to necrosis; the inflammatory reaction is very meager and to be found only in the final stage of injury evolution. A weaker nuclear electron-density with chromatin marginalisation are the earliest modifications. It follows organelle alterations, more intense in mitochondria and Golgi complex, with topographical rearrangements. Cytoplasmic citolosomes appear and are more prominent in virus-producing cells. The so called GERL are very conspicuous and show a direct relationship to the amount of virus particles produced in the cells. The cytoplasmic membrane is the locus of virion assembly and the complete particles are accumulated between the cells. Rare small virus-like vesicles were also detected in neuron cytoplasm.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARAUJO, R. — Contribuição ao estudo ultra-estrutural do cérebro de camundongos albinos infectados experimentalmente com arbovirus Mucambo de Be An 67949. [Tese Docência Livre]. Universidade Federal do Pará, 1974.
2. ARAUJO, R.; DIAS, L. B.; ARAUJO, M. T. F.; PINHEIRO, F. & MOUTINHO, E. R. C. — Miocardite experimental em camundongos albinos por vírus Piry (BeAn 24232). Estudo anátomo-patológico em microscopia ótica e em microscopia eletrônica com demonstração da partícula viral. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 20: 102-111, 1978.
3. ARAUJO, M. T. F.; ARAUJO, R.; VIANA, M. & OLIVEIRA, M. L. — Processamento de tecidos para análise de ultra-estrutura celular: técnica de rotina e contribuição da experiência regional amazônica. *Hiléia Médica* (Belém) 1: 13-15, 1979.
4. ACHESON, N. H. & TAMM, I. — Replication of Semliki Forest Virus: An Electron Microscopic Study. *Virology* 32: 128-143, 1967.
5. ARTSOB, H. & SPENCE, L. — Growth of vesicular Stomatitis Virus in mosquito cell lines. *Can. J. Microbiol.* 20: 329-336, 1974.
6. BERGOLD, G. H. & MUNZ, K. — Characterization of Piry Virus. *Arch. f. ges. Virusforsch.* 31: 152-167, 1970.
7. BURNSTOCK, G. — Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* 24: 509-581, 1972.
8. CHAIN, M. M. T.; DOANE, F. W. & McLFAN, D. M. — Morphological development of Chikungunya Virus. *Can. J. Microbiol* 12: 895-900, 1966.
9. DIAS, L. B. — Tropismo Mesenquimal de alguns vírus isolados na Amazônia. *IV Cong. Reg. Norte-Nord. Pat., Campina Grande (Paraíba)*, 1971.
10. DIAS, L. B.; DUARTE, F. & DE PAOLA, D. — Lesões pouco usuais na histopatologia experimental de arbovirus Amazônicos. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 6: 135, 1972.
11. ERLANDSON, R. A.; BABCOCK, V. I.; SOUTHAM, C. M.; BAILEY, R. B. & SHIPKEY, F. H. — Semliki Forest Virus in HEP-2 cell cultures. *J. Virol.* 1: 996-1009, 1967.
12. GLAUERT, A. M. — *Practical Methods in Electron Microscopy*. Amsterdam, North-Holland Publ. Co, 1974.
13. GORDON, G. B.; MILLER, R. L. & BESNCH, K. G. — Studies on the intracellular digestive process in mammalian tissue culture cells. *J. Cell Biol.* 25: 41-55, 1965.
14. HIGASHI, N.; MATSUMOTO, A.; TABATA, K. & NAGATOMO, Y. — Electron microscope study of development of Chikungunya virus in green monkey Kidney stable (Vero) cells. *Virology* 33: 55-69, 1967.
15. KARABATSOS, N.; LIPMAN, M. B.; GARRISON, M. S. & MONGILLO, C. A. — The morphology, morphogenesis and serological characterisation of Rhabdovirus Navarro, Kwatta and Mossaril. *J. Gen. Virol.* 21: 429-433, 1973.
16. KARNOVSKY, M. J. — Simple method for "staining with lead" at high pH in electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11: 129-132, 1971.
17. LUFT, J. H. — *Advanced Techniques in Biological Electron Microscopy*. Berlin, Springer Verlag, 1973.
18. MIMS, C. A. — Aspects of the pathogenesis of virus diseases. *Bact. Rev.* 28: 30-76, 1964.
19. MOLLENHAEUR, H. H. & WHALEY, W. G. — An observation on the functioning of the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* 11: 222-225, 1963.
20. MORGAN, C.; HOWE, C. & ROSE, H. M. — Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. V. Western Equine Encephalomyelitis virus. *J. Exptl. Med.* 113: 219-233, 1961.
21. MUSSGAY, M. & WEIBEL, J. — Electron microscopic and biological studies on the growth of Venezuelan

- Equine Encephalitis virus in KB cells. *Virology* 16: 52-62, 1962.
22. NOVIKOFF, A. B. — Enzyme localization and ultrastructure of neurons. In: *The Neuron*. Amsterdam, Elsevier, 1967.
23. PEREZ TAMAYO, R. — *Patología Molecular Subcelular y Celular*. México, La Prensa Médica Mexicana, 1975.
24. PETERS, A.; PALAY, S. L. & WEBSTER, H. F. — *The Fine Structure of the Nervous System: the neurons and supporting cells*. Philadelphia, W. B. Saunders Company, 1976.
25. PINHEIRO, F. P.; BENSABATH, G.; ANDRADE, A. H. P.; LINS, Z. C. & AZEVEDO, M. C. — Vigilancia y investigación de las enfermedades infecciosas a lo largo de la carretera transamazónica del Brasil. Reimpreso del *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* 11: 187-189, 1974.
26. PINHEIRO, F. P.; BENSABATH, G. & ANDRADE, A. H. P. — *Patología Tropical na Amazônia*. Ed. Veronesi, R. In: *Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio, Editora Guanabara, 1978.
27. WOODALL, J. P. — Virus research in Amazonia. *Ata Simpos. Biota Amazônica* 6: 31-63, 1976.

Recebido para publicação em 28/7/1980.