

ALTERAÇÕES ULTRA-ESTRUTURAIS DO FÍGADO DE CAMUNDONGOS ALBINOS APÓS INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL COM ARBOVÍRUS MUCAMBO (Tipo BeAn 10967)

Ronaldo de ARAUJO (1), Leónidas BRAGA DIAS (2) e Friedhelm HUTH (3)

RESUMO

A inoculação experimental do arbovírus Mucambo (tipo BeAn 10967) induz em camundongos albinos adultos uma hepatite aguda com necrose hepatocitária e hipertrofia e hiperplasia reativas das células de Kupffer, além de infiltrados leucocitários entre as traves de Remak. No 4.º e 5.º dias após a inoculação tanto intra-peritoneal como intra-cerebral ou subcutânea foram encontradas partículas semelhantes a vírus, limitadas quase exclusivamente ao núcleo dos hepatócitos. As alterações ultra-estruturais são distintas das induzidas por outros vírus hepatotrópicos e poderiam ser tomadas como modelo para uma eventual hepatite humana de origem viral.

INTRODUÇÃO

Não são numerosas as análises ultra-estruturais das modificações induzidas por arbovírus, sendo as mais estudadas as presentes nas encefalites (MORGAN & col.²³, MUSSCAY & WEIBEL²⁷, ERLANDSON & col.¹⁴, JOHNSON & JOHNSON¹⁷). Da febre amarela há estudos das alterações hepáticas e das partículas viróticas (BEARCROFT^{7, 8}). Trabalhos semelhantes já foram efetuados em carneiros, camundongos e "hamsters" após inoculação com vírus RFV (Rift Valley Fever) (MCCAVRAN & EASTERDAY²⁰).

Estudos em microscopia ótica demonstraram que os seguintes tipos de arbovírus oriundos da região amazônica induzem experimentalmente uma hepatite: Apeú, Nepuyo, Marituba, Guamá, Catú, Mojú, Oriboca, Caraparú, Itaquí e Murutucú (DE PAOLA¹², LACERDA¹⁹). DE PAOLA¹² sugeriu que um tipo especial de hepatite encontrada na região amazônica deveria ter sua causa pesquisada

também entre estes tipos mencionados de vírus. Por isso o estudo das alterações ultra-estruturais da hepatite nos animais de laboratório induzidas após inoculação de arbovírus parece ter interesse para a medicina humana. O presente trabalho analisa os achados ultra-estruturais após inoculação com o arbovírus Mucambo.

Este vírus foi isolado em 1959 de um roedor, nas matas do IPEAN, em Belém do Pará, pelos técnicos do Instituto Evandro Chagas, a partir do fígado e do cérebro. Experimentalmente o vírus mata, após inoculação intra-cerebral, tanto o camundongo recém-nascido como o adulto. Sorologicamente pertence ao chamado Grupo A dos arbovírus.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram inoculados 15 camundongos albinos adultos pelas vias intra-cerebral, intra-

Trabalho executado no Instituto de Patologia da Universidade de Düsseldorf. Diretor: Prof. Dr. H. Meessen

- (1) Prof. Adjunto da Universidade Federal do Pará. Núcleo de Patologia Regional. Diretor: Prof. Dr. J. M. Leite. Bolsista do Deutsch Akademiker Austausch Dienst em Düsseldorf em 1971
- (2) Patologista do Instituto Evandro Chagas. Diretor: Dr. Miguel Azevedo. Professor Assistente da Universidade Federal do Pará, Belém, Brasil
- (3) Professor Assistente (Oberarzt) do Instituto de Patologia da Universidade de Düsseldorf

peritoneal e subcutânea, usando-se 5 animais para cada uma delas. O material inoculado foi uma suspensão de tecido cerebral de camundongos recém-nascidos previamente infectados com o vírus Mucambo (BeAn 10967), utilizando-se 0,03 ml para a via intra-cerebral e 0,2 ml para as duas outras.

No 2.º dia após a inoculação foi sacrificado apenas um animal inoculado por via intra-cerebral; do 3.º ao 5.º dia foram sacrificados 3 animais por dia, um de cada uma das vias utilizadas; no 6.º dia foram sacrificados 2 animais, um inoculado por via intra-peritoneal e outro por via subcutânea. O 5.º animal inoculado por via intra-cerebral teve morte espontânea no 6.º dia, não permitindo fixação adequada, motivo pelo qual não foi utilizado. Os dois animais restantes sobreviveram ao 6.º dia e não foram utilizados. Foram estudados, portanto, 12 dos 15 animais inoculados.

Para a microscopia óptica os fragmentos de tecido hepático foram fixados em formol a 10%, incluídos em parafina e os cortes corados com hematoxilina e eosina e hematoxilina férrica-picrofucsina-resorcina.

Para a microscopia eletrônica fragmentos de parênquima hepático de 1 mm foram fixados em glutaraldeído a 3% em tampão fosfato 0,1 M, com pH de 7,2. Durante o transporte de Belém a Düsseldorf foram eles conservados nesta solução mantida a 4.ºC, ou seja, durante 7 dias para o animal sacrificado no 2.º dia após a inoculação e durante 2 dias para aqueles sacrificados no 6.º dia. Após abundante lavagem em solução tampão-fosfato foram então pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% durante 1 hora e, após desidratação em acetona, incluídos em Durcupan. Os cortes ultra-finos foram contrastados com hidróxido de chumbo e acetato de uranilo e examinados e fotografados em microscópio RCA-EMU-E.

RESULTADOS

Microscopia óptica

No animal sacrificado no 2.º dia após a inoculação por via intra-cerebral, a estrutu-

ra lobular hepática está conservada e os hepatócitos apresentam-se levemente túmidos, com núcleos de tamanhos diferentes, com predomínio dos maiores e com a cromatina representada por grandes grumos. Freqüentes hepatócitos binucleados e células endoteliais sinusoidais de núcleos também hipertróficos são os outros achados.

Nos dias subsequentes as alterações hepáticas observadas não apresentaram diferenças qualitativas e de intensidade relacionáveis à via de inoculação, motivo pelo qual serão descritas conjuntamente, ainda que no 6.º dia não esteja representada a via intra-cerebral.

No 3.º dia após a inoculação, os lóbulos e traves de Remak continuam bem conservados em sua estrutura. A discariose aumentou, bem como o número de células binucleadas. Pequenos focos de hiperplasia de células sinusoidais também com núcleos de tamanhos diferentes são bem evidentes (Fig. 1a).

No 4.º dia cariólise com focos disseminados de necrose hepatocitária com pequenos acúmulos leucocitários e focos de hiperplasia de células endoteliais constituem o achado mais saliente. Nos núcleos são mais intensos a discariose e os grumos cromatínicos grosseiros e percebem-se áreas menos intensamente coradas. Em células sinusoidais isoladas há sinais de fagocitose, pequenos grumos de pigmento biliar são visíveis entre os hepatócitos.

No 5.º dia as alterações regressivas estão muito acentuadas. A discariose é intensa e mais da metade dos núcleos hepatocitários mostra contornos irregulares, com grandes e grosseiros conglomerados cromatínicos que se coram intensamente; ao lado destes são encontrados outros de aspecto bastante hipocromático ou em nítida necrose. Os limites celulares são pouco visíveis. A hiperplasia das células endoteliais sinusoidais e o infiltrado leucocitário cresceram a ponto de constituir pequenos focos isolados nitidamente identificáveis. Também os espaços de Kiernan estão alargados por infiltração leucocitária de neutrófilos, linfócitos e plasmócitos (Fig. 1b).

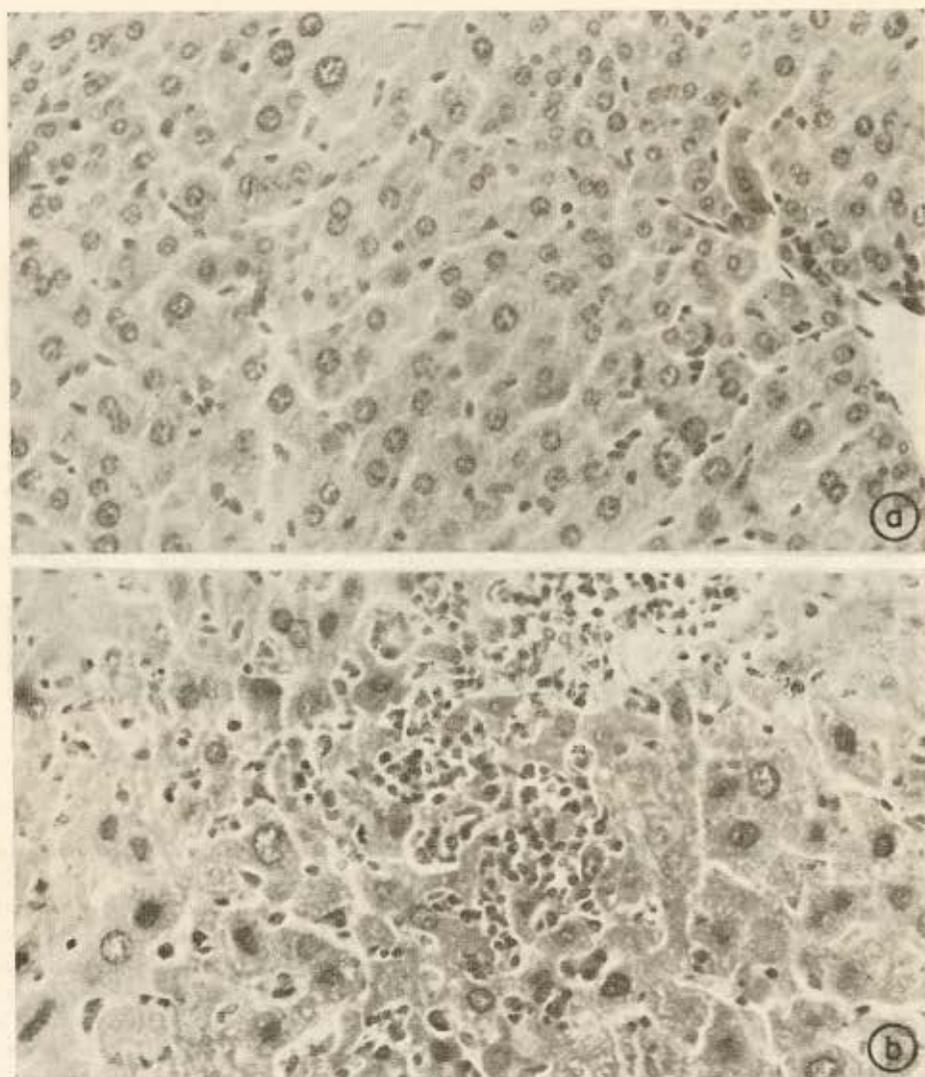


Fig. 1a — Tecido hepático 3 dias após inoculação do vírus Mucambo, com nítida discariedade hepatocitária e início de mobilização das células sinusoidais. H. & E., 310 \times .
Fig. 1b — Tecido hepático 5 dias após a inoculação do vírus Mucambo, com discariedade mais intensa, primeiros focos de necrose hepatocitária e denso infiltrado de células mononucleares, bem como proliferação de células de Kupffer. H. & E., 310 \times .

No 6.^o dia não há aumento notável dos infiltrados celulares inflamatórios. Entretanto a necrose hepatocitária é mais intensa; núcleos exibindo os aspectos típicos deste fenômeno regressivo são freqüentes.

Corpos de inclusão nucleares ou citoplasmáticos não foram observados em nenhum dos animais estudados.

Microscopia eletrônica

No 2.^o dia após a inoculação, hepatócitos isolados mostram vacuolização citoplasmática. Gotículas de gordura de médio tamanho são visíveis tanto em hepatócitos como em células de Kupffer. Estas últimas células, em várias áreas, são muito salientes, com nucleoplasma bastante pálido (Fig. 2) e de-

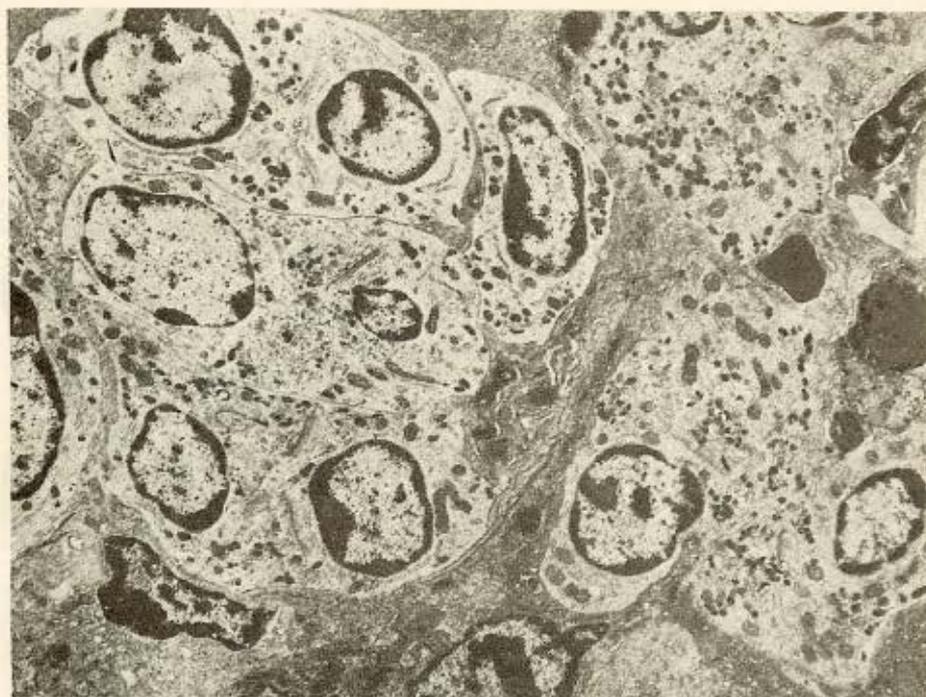


Fig. 2 — Células endoteliais em proliferação, exibindo núcleos hipocromáticos, 3 dias após a inoculação do vírus Mucambo. M.E.: 1.400; Aumento final: 5.300.

saparecimento das microvilosidades no bordo que limita com os hepatócitos.

No 3.º dia a hipertrofia das células endoteliais sinusoidais constitui pequenos conglomerados celulares (Fig. 2). Algumas destas células mostram fagocitose de hemácias e outros fragmentos celulares (Fig. 3). As modificações dos hepatócitos são mais acentuadas que as do 2.º dia.

No 4.º dia o achado predominante é a hipertrofia e hiperplasia das células endoteliais sinusoidais, que também apresentam vacuolização e gotas de gordura no citoplasma. Os hepatócitos têm núcleos nitidamente maiores, mais pálidos, com grande nucléolo e cromatina distribuída predominantemente na periferia. Entre alguns hepatócitos salienta-se a presença de canaliculos biliares dilatados contendo detritos celulares parcialmente lamelares em aspecto. Tanto nas células íntegras como nas que apresentam diversos graus de dissolução carioltica

observam-se nos núcleos partículas arredondadas semelhantes a vírus ("virus-like particles") (Fig. 4). Seu aspecto é monomorfo, são circundadas por um halo claro (conjuntamente com ele medem aproximadamente 70 m μ) e se dispõem tanto na periferia como no centro do núcleo, possuindo um centro constituído de finos grumos muito electron-densos.

No 5.º dia as células sinusoidais hiperplásicas tomam um aspecto sincicial e têm núcleos muito pálidos. As partículas semelhantes à vírus são mais numerosas, visíveis tanto em hepatócitos como em células endoteliais sinusoidais. Nestas últimas, principalmente nas que exibem fenômenos regressivos são encontrados, ao lado destas partículas, numerosos filamentos delgados que se entrecruzam em rede irregular (Fig. 5a). Também em raras células são visíveis pequenos novelos de delgadas estruturas micro-tubulares (Fig. 5b). Ainda presentes às proximidades das partículas semelhantes a vírus existem grânulos maiores, arredondados ou ovais, for-

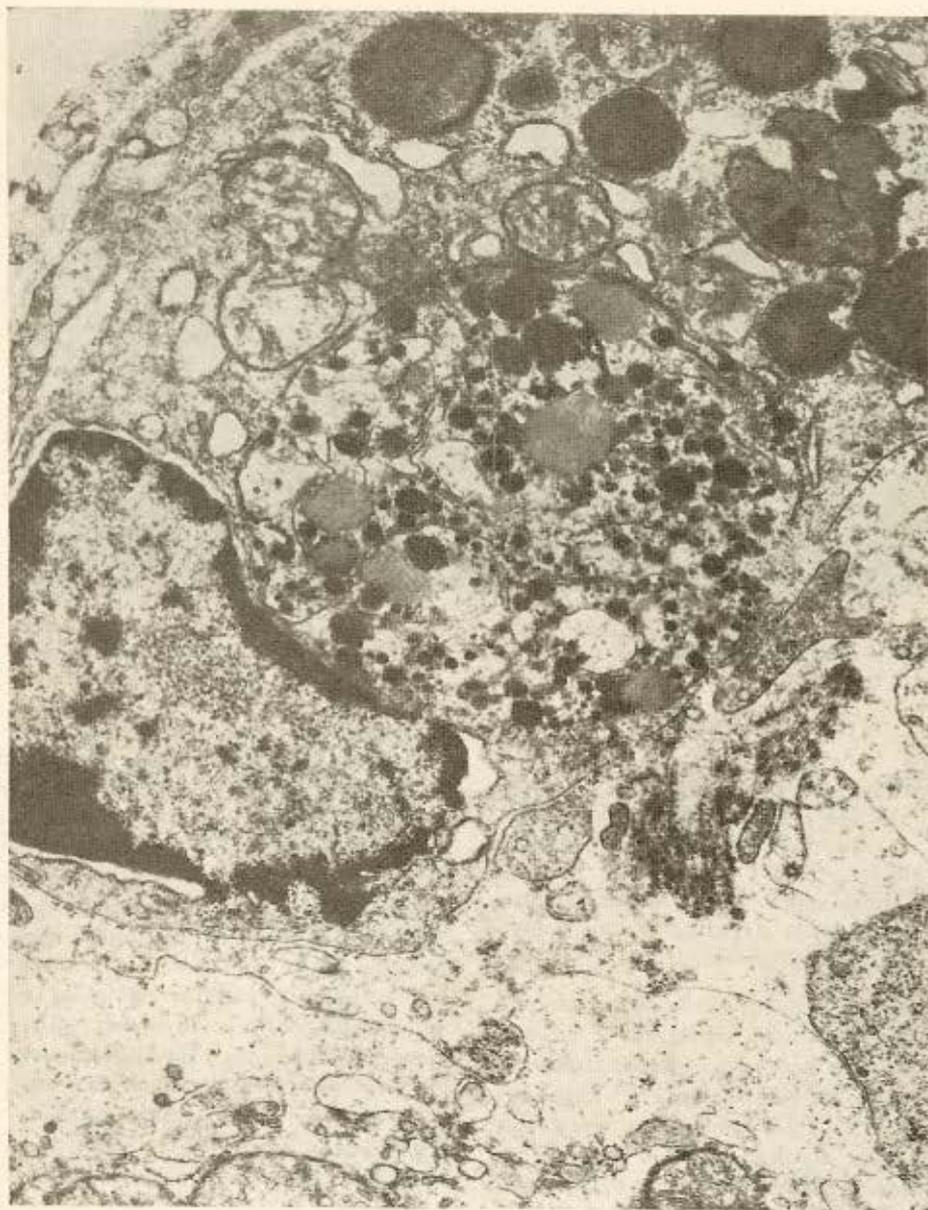


Fig. 3 — Células de Kupffer exibindo diferentes tipos de fagossomas, 3 dias após a inoculação do vírus Mucambo. M.E.: 7.000; Aumento final 26.000.

temente electrondensos. Por vezes os núcleos de aspecto pálido mostram estruturas microvesiculares com um diâmetro de cerca de 35 μ m e delimitadas por delgada membrana.

No 6.º dia repetem-se os achados do dia anterior; em alguns poucos núcleos são vi-

síveis inclusões dotadas de matriz parcialmente homogênea e parcialmente corpuscular e delimitadas por cápsula incompleta.

Em todos os animais examinados não foram encontradas alterações do epitélio biliar tanto à microscopia óptica como à electrónica.



Fig. 4 — Núcleo hepatocitário com partículas semelhantes a vírus circundadas em halo claro, 4 dias após a inoculação do vírus Mucambo. M.E.: 1.500; Aumento final: 57.000.

DISCUSSÃO

A existência de lesões hepáticas e renais após a inoculação do vírus Mucambo em camundongos foi determinada anteriormente por um de nós (DIAS¹³) tanto com a amostra BeAn 10967 como com a amostra BeAn 94.768, esta isolada da urina de um roedor silvestre (*Oryzomys goeldii*).

Os elementos mesenquimatosos e parenquimatosos comprometidos revelaram à microscopia eletrônica a presença de partículas vírus-símiles no interior do núcleo. Entretanto, tais partículas não podem ser apontadas com segurança absoluta como de origem virótica. Elas se assemelham a partículas descritas em estudos sobre outros arbovírus, como o Mayaro (SATURNO²²), o Chikungunya (CHAIN & col.¹⁰), o da floresta de Semliki (ACHESON & TAMM¹), o da encefalite equina venezuelana (BYKOVSKY & col.⁹) e o Oriboca (LACERDA¹⁹). Porém, assemelham-se também aos denominados grânulos pericromáticos que têm sido encontrados alterados não só em infecções viróticas (SWANSON & col.³⁵), como em muitas outras condições (MIYAI & STEINER²²; ALTMANN & BANASCH⁴; YOUNG & col.³⁷; AFZELIUS &

SCHOENTAL²). Devemos, entretanto, mencionar que já na descrição original destas partículas, WATSON³⁶ postulava uma possível origem virótica para elas. As partículas por nós documentadas têm contorno circular e são sempre circundadas por um halo claro, conjuntamente com o qual medem aproximadamente 70 m μ , não possuindo membrana limitante nítida que possa ser interpretada como capsídeo. Estudos efetuados no rim (ARAÚJO & col.⁶) e no cérebro (ARAÚJO⁵) de animais infetados experimentalmente com este vírus não foram mais felizes em precisar a natureza virótica destas partículas. Fato que fala a favor de tal natureza é o de serem elas encontradas em núcleos de aspecto pálido em sua total extensão ou em áreas delimitadas, configurando a denominada vesícula nuclear descrita no núcleo de células nas quais se processa replicação virótica (SIEGERT & FALKE³⁴).

Estes núcleos hipocromáticos mostram condensação cromatínica em grumos periféricos, nucléolos muito salientes, grandes e polimorfos, e acumulam grandes gotas de gordura; ou seja, apresentam modificações regressivas que têm sido descritas em numerosas outras infecções viróticas (ALMEIDA³; SCHEIDEG-

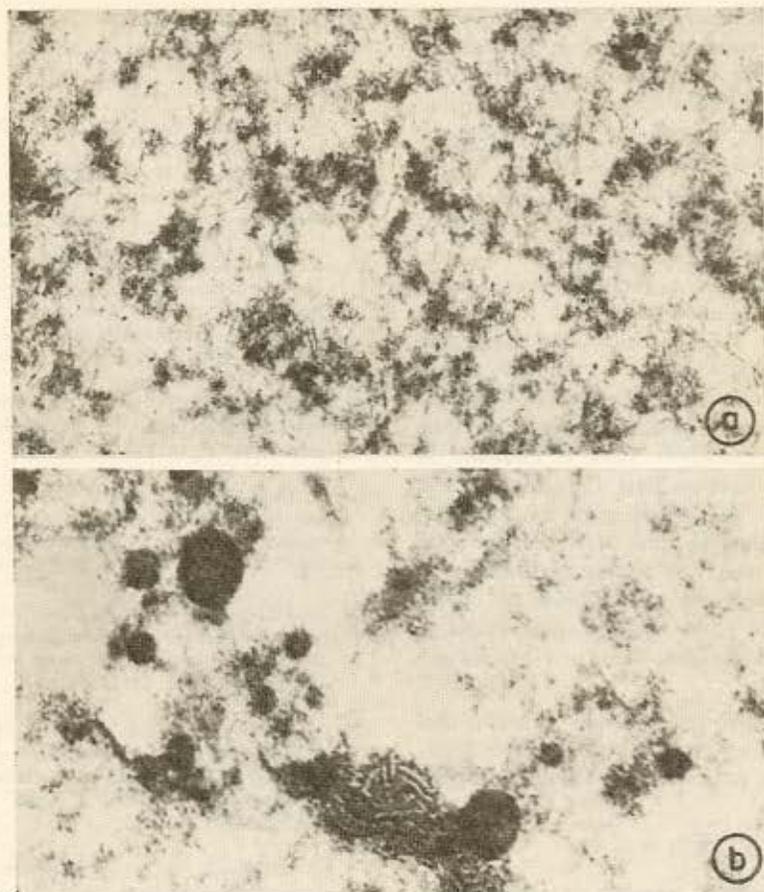


Fig. 5a — Delgados microfilamentos encontrados no núcleo de uma célula de Kupffer que apresenta fenômenos regressivos. M.E.: 15.000; Aumento final: 57.000.

Fig. 5b — Estruturas microtubulares e grânulos nucleares no núcleo de células de Kupffer que exhibe, como a anterior, fenômenos regressivos. Ambas figuras, após 5 dias da inoculação do vírus Mucambo. M.E.: 15.000; Aumento final: 57.000.

GER³³; SIEGERT & FALKE³⁴; RABIN & JENSON³⁰; MORGAN & col.^{23, 24}; MORGAN & HUBER²⁵; DAVID¹¹; ORCEL²⁹) e portanto devem ser interpretadas como não patognomônicas.

Os filamentos filiformes documentadas nos núcleos de células endoteliais com fenômenos regressivos (Fig. 5a), são morfologicamente iguais aos descritos em células após infecção com vírus do herpes humano (MURPHY & col.²⁶) e com o Reovírus tipo III (GONATAS & col.¹⁵). A pequena quantidade de núcleos exibindo tais filamentos não permite uma afirmativa sobre sua natureza. Também os novelos de micro-túbulos cujas

membranas são bastante electrondensas e que se encontram nos mesmos núcleos, são comparáveis a estruturas micro-tubulares descritas em células após a infecção com o vírus da influenza e com o adenovírus porcino (KOESTNER & col.¹⁸; SAITO & col.²¹) que são interpretadas como manifestação morfológica inicial da síntese das proteínas viróticas.

Quanto à morfo-patogenia da hepatite induzida após inoculação do vírus Mucambo parece-nos lícito supor, a partir dos achados descritos, que os hepatócitos são as células primariamente atingidas e que os vírus devem ter o núcleo como local preferencial de

replicação. As hiperplasias e hipertrofias celulares vistas entre as traves de Remak e o infiltrado celular inflamatório encontrado podem ser considerados como reações à infecção virótica nos hepatócitos e aos fenômenos regressivos neles observados.

As alterações hepáticas encontradas após a inoculação do vírus Mucambo são nitidamente diferentes das que vimos após a infecção experimental de camundongos com outro arbovirus da região amazônica (HUTH & ARAUJO¹⁶) e também das descritas para outros arbovírus (MIMS²¹). A importância do estudo deste vírus e da hepatite por ele induzida repousa principalmente em sua eventual patogenicidade para o homem; as modificações experimentais induzidas podem por isso, servir de modelo para uma possível infecção humana, já que permitem caracterizar, pelo menos em parte, morfológica e patogenicamente, uma das formas de evolução da hepatite aguda para a qual, como se sabe, são tão numerosas tanto a etiologia como a patogenia.

Uma repetição deste estudo experimental seria desejável, já que não foi possível caracterizar com precisão a partícula virótica.

S U M M A R Y

Electron microscopic findings in mouse liver following inoculation of Mucambo-Virus (Type BeAn 10967)

The intracerebral, intraperitoneal and subcutaneous inoculations of the arbovirus Mucambo (BeAn 10967) in adult mice, induce an acute hepatitis with primary liver cell injury and necrosis, proliferation of sinus lining cells and inflammatory infiltrate. Virus-like particles are found mainly in the liver cell nuclei; they are about 35 μ wide and consist of a spherical center surrounded by a pale halo, without a distinct capsid. The electron microscopic picture differs from that of other virus-induced hepatitis and could be regarded as a model to a possible virus induced human hepatitis.

A G R A D E C I M E N T O S

Os Autores agradecem à Dra. Gilberta Bensabath, Chefe do Laboratório de Arboví-

rus do Instituto Evandro Chagas (Belém, Pará) que lhes forneceu os animais inoculados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACHESON, N. H. & TAMM, I. — Replication of Semliki Forest virus: an electron microscopic study. *Virology* 32:128-143, 1967.
2. AFZELIUS, B. A. & SCHOENTAL, R. — The ultrastructure of the enlarged hepatocytes induced in rats with a single oral dose of retrorsine, a pyrrolizidine (senecio) alkaloid. *J. Ultrastruct. Res.* 20:328-345, 1967.
3. ALMEIDA, J. D. — A classification of virus particles based on morphology. *Canada Med. Ass. J.* 89:787-789, 1963.
4. ALTAMANN, H. W. & BANNASCH, P. — Die intravitale Karyorrhexis der exokrinen Pankreaszelle im elektronenmikroskopischen Bild. *Z. Zellforsch.* 71:51-68, 1966.
5. ARAUJO, R. — Alterações ultra-estruturais no cérebro de camundongos inoculados experimentalmente com arbovirus tipo Mucambo. (Em preparo).
6. ARAUJO, R.; DIAS, L. B. & HUTH, F. — Veränderungen von Mäusenieren nach experimenteller Infektion mit Mucambo-Virus. *Virchows Arch. Abt. A Path. Anat.* 354: 312-323, 1971.
7. BEARCROFT, W. G. — Electron microscope studies on the liver cells of yellow fever infected rhesus monkeys. *J. Path. Bact.* 80: 421-426, 1960.
8. BEARCROFT, W. G. — Electron microscope studies on the liver of yellow fever infected african monkeys. *J. Path. Bact.* 83:59-64, 1962.
9. BYKOVSKY, A. F.; YERSHOV, F. I. & ZHDANOV, V. M. — Morphogenesis of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *J. Virol.* 4: 496-504, 1969.
10. CHAIN, M. M. I.; DOANE, F. W. & MCLEAN, D. M. — Morphological development of Chikungunya virus. *Can. J. Microbiol.* 12:895-900, 1966.
11. DAVID, H. — Zellschädigung und Dysfunktion. In: *Protozoologia*. Vol. X-1. Viena, New York, Springer, 1970.
12. DE PAOLA, D. — Patologia dos virus tropicais. *Atas Simp. Biota Amazônica* 6(Patologia):25-29, 1967.
13. DIAS, L. B. — Não publicado.

14. ERLANDOSON, 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.
15. GONATAS, N. K.; MARGOLIS, G. & KILHAM, L. — Reovirus type III encephalitis: observation of virus-cell interactions in neural tissues. II. Electron microscopic studies. *Lab. Invest.* 24:101-109, 1971.
16. HUTH, F. & ARAUJO, R. — Morphologische Veränderungen der Mäuse-Leber nach Inoculation von Arbovirus (Typ BeAn 67949). *Virchows Arch. B Zellpath.* 9:153-163, 1971.
17. JOHNSON, K. P. & JOHNSON, R. T. — California encephalitis. II. Studies of experimental infection in the mouse. *J. Neurophth. Exp. Neurol.* 27:390-401, 1968.
18. KOESTNER, A.; KASZA, L.; KINDIGAND, G. A. & SHADDUCK, A. — Ultrastructural alterations of tissue cultures infected with a pathogenic porcine adenovirus. *Amer. J. Path.* 53:651-665, 1968.
19. LACERDA, P. R. S. — Alterações ultra-estruturais do fígado na infecção experimental por arbovirus do grupo C, B e 17 (Oriboca). *Hospital (Rio)* 74:815-830, 1968.
20. MCGAVRAN, M. H. & EASTERDAY, B. C. Rift Valley fever hepatitis. Light and electron microscopic studies in the mouse. *Amer. J. Path.* 42:587-607, 1963.
21. MIMS, C. A. — Aspects of the pathogenesis of virus diseases. *Bact. Rev.* 28:30-71, 1964.
22. MIYAI, K. & STEINER, J. W. — Fine structure of interphase liver cell nuclei in subacute ethionine intoxication. *Exp. Molec. Path.* 4:525-566, 1967.
23. MORGAN, C.; HOWE, C. & ROSE, H. M. — Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. V. Western equine encephalomyelitis virus. *J. Exp. Med.* 113:219-234, 1961.
24. MORGAN, C.; ELLISON, S. A.; ROSE, H. M. & MOORE, D. H. — Structure and development of virus in the electron microscope. II. Vaccine and fowl pox virus. *J. Exp. Med.* 100:301-310, 1956.
25. MORGAN, T. E. & HUBER, G. L. — Loss of lipid fixation for electron microscopy. *J. Cell Biol.* 32:757-760, 1967.
26. MURPHY, F. A.; HARRISON, A. K. & WHITFIELD, S. G. — Intranuclear formation of filaments in herpes virus homin's infection of mice. *Arch. ges. Virusforsch.* 21:463-468, 1967.
27. 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.
28. NII, S.; MORGAN, C.; ROSE, H. M. & HSU, K. C. — Electron microscopy of Herpes simplex virus. IV. Studies with ferritin conjugated antibodies. *J. Virol.* 2:1172-1184, 1968.
29. ORCEL, L.; SMADJA, C.; GRYNBLAT, A. & SCOTTO, J. — Aspects anatomo-pathologiques et évolutifs actuels des hépatites à virus. *Ann. Anat. Path.* (Paris) 15:61-104, 1970.
30. RABIN, E. R. & JENSON, A. B. — Electron microscopic studies of animal viruses with emphasis on in vivo infections. *Progr. Med. Virol.* 9:392-450, 1967.
31. SAITO, Y.; YOSHIOKA, I.; IGARASHI, Y. & NAKAGAWA, S. — Nuclear inclusions observed by electron microscope in cynomolgus monkey kidney cells infected with influenza virus. *Virology* 40:408-409, 1970.
32. SATURNO, A. — The morphology of Mayaviruses. *Virology* 21:131-133, 1963.
33. SCHEIDEGGER, S. — Allgemeine Pathologie der Virusinfektionen. In: *Handbuch der allgemeinen Pathologie*. Ed. F. BUCHNER, E. LETTERER, I. ROULET — Vol. XI/2. Berlin, Springer, 1965.
34. SIEGERT, R. & FALKE, D. — Elektronenmikroskopischen Untersuchungen über die Entwicklung des Herpes virus hominis in Kulturzellen. *Arch. ges. Virusforsch.* 19:230-249, 1966.
35. SWANSON, J. L.; CRAIGHEAD, J. E. & REYNOLDS, E. S. — Electron microscopic observations on herpes virus homin's (Herpes simplex virus) encephalitis in man. *Lab. Invest.* 14:1966-1981, 1966.
36. WATSON, M. J. — Observations on a granule associated with chromatin in the nuclei of cells of rat and mouse. *J. Cell Biol.* 13:162-167, 1962.
37. YOUNG, D. E.; ARNOLD, E. A. & STOWELL, R. E. — Effects of slow and rapid thawing on nuclear structure of rapidly frozen mouse hepatic parenchymal cells. *Lab. Invest.* 15:381-402, 1966.