

Efeito da tunicamicina sobre a replicação do vírus Mayaro em células de *Aedes albopictus*

Leticia Pereira Cortez*

Fernanda Marcicano Burlandy**

Moacyr Alcoforado Rebello***

Resumo

Tunicamicina (TM) é um antibiótico isolado de *Streptomyces lysosuperficus*, caracterizado inicialmente como uma substância com atividade inibidora da proliferação de bactérias, fungos e leveduras. Este antibiótico possui um efeito bloqueador da formação de N-acetilglicosamina, alterando de maneira significativa o processo de glicosilação das proteínas. Neste trabalho, verificamos que, em células de *Aedes albopictus*, a presença de TM acarreta uma drástica inibição da replicação do vírus Mayaro. Mesmo em baixas concentrações de TM (0,05 µg/ml), o tratamento das células durante 24 horas produz uma inibição de 50% na produção de partículas virais infecciosas. Em concentrações mais elevadas, este antibiótico diminuiu progressivamente a replicação do vírus Mayaro, atingindo valores de 98,5% de inibição, após 48h de tratamento. A análise por eletroforese em gel de poliacrilamida das proteínas virais previamente marcadas com metionina-[³⁵S] revela que a TM nas concentrações de 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml e 0,15 µg/ml não afeta a síntese dos polipeptídeos do vírus Mayaro. Apenas em concentrações mais elevadas (0,5 µg/ml) observam-se alterações na síntese e na mobilidade eletroforética das glicoproteínas virais. Estes dados sugerem que, em baixas concentrações, a TM pode afetar a replicação do vírus Mayaro em células de *Aedes albopictus* através de outros mecanismos.

Palavras-chave: Tunicamicina. Vírus Mayaro. Células de *Aedes albopictus*.

INTRODUÇÃO

O vírus Mayaro é um arbovírus (“arthropod-borne virus”) pertencente à família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*, mantido na natureza através de um ciclo replicativo que envolve a presença de hospedeiros vertebrados e inver-

tebrados. Os invertebrados funcionam como vetores (particularmente mosquitos e carrapatos), sendo responsáveis pela transmissão de um grande número de viroses, tais como a Febre Amarela, a Febre Dengue e encefalites. Os reservatórios naturais do vírus Mayaro são provavelmente algumas espécies de micos e macacos,

* Bolsista PIBIC-CNPq. Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes. UFRJ.

** Doutoranda. Bolsista CNPq. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. UFRJ.

*** Professor de Virologia. Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes. UFRJ.

Laboratório de Virologia Molecular II

Departamento de Virologia

Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes

Centro de Ciências da Saúde

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Av. Brigadeiro Trompowsky, s/n, Ilha do Fundão Cidade Universitária

21.941-590 Rio de Janeiro RJ Brasil

E-mail: rebello@micro.ufrj.br

visto que estas apresentam uma alta prevalência de anticorpos contra este vírus (ANDERSON et al., 1957; PINHEIRO et al., 1986). Os principais vetores do vírus Mayaro são os mosquitos do gênero *Haemagogus*, embora vetores alternativos, como *Culex* e *Aedes*, já tenham sido apontados (PINHEIRO, 1981).

No Brasil, o vírus Mayaro foi primeiramente detectado durante uma epidemia perto da cidade de Belém, em 1955, e, desde então, tem sido isolado de humanos e animais silvestres, principalmente nas fronteiras da região amazônica. Os sintomas clínicos são bastante similares aos da Febre Dengue e incluem febre alta, artralgias, que pode se transformar em artrite dos pulsos, tornozelos, dedos dos pés e de outras articulações, exantema, cefaléia, mialgia, dor ocular, fotofobia, conjuntivite, diarreia e vômitos (CAUSEY; MAROJA, 1957).

O vírus Mayaro apresenta a propriedade de multiplicar-se em células de vertebrados, induzindo modificações na síntese de macromoléculas da célula hospedeira, acompanhadas de alterações morfológicas da membrana celular que culminam em lise celular. Em células de mosquito (*Aedes albopictus*), a infecção ocorre de maneira persistente, não sendo, portanto, observadas modificações na síntese de DNA, RNA e proteínas das células hospedeiras (DE MENESES; REBELLO, 2001).

Os mosquitos do gênero *Aedes* são importantes vetores na transmissão de diversos vírus causadores de doenças que concentram atualmente grande atenção da opinião pública, tais como o vírus Dengue e o vírus da Febre Amarela. Os mosquitos da espécie *A. albopictus* foram detectados na América do Norte em 1972, provenientes da Ásia, região em que a espécie é amplamente distribuída (HAWLEY et al., 1987). No Brasil, o primeiro relato da sua presença foi feito em 1986 (FONTENILLE; TOTO, 2001). Experimentalmente, esta espécie é considerada como vetor dos Flavivírus (vírus Dengue sorotipos 1, 2, 3 e 4, vírus da Encefalite Japonesa, vírus do Oeste do Nilo e vírus da Febre Amarela), dos Alfavírus (vírus Chikungunya, vírus da Encefalite Equina do Leste, vírus Mayaro, vírus

da Encefalite Equina do Oeste, vírus da Encefalite Equina Venezuelana e vírus Sindbis) e dos Bunyavírus (vírus Jamestown Canyon, vírus Keystone, vírus Oropouche e vírus LaCrosse) (MOORE; MITCHEL, 1997).

O genoma dos Alfavírus é formado por RNA fita simples, polaridade positiva, não-segmentado, de aproximadamente 12 Kb, associado a 240 cópias de uma proteína denominada C (30kDa), formando um capsídeo de simetria icosaédrica. Este nucleocapsídeo é recoberto por um envelope lipoprotéico, oriundo da membrana plasmática da célula hospedeira, onde estão inseridas as glicoproteínas E1 (54 kDa) e E2 (52 kDa), sob a forma de heterodímeros, constituindo as espículas virais (MEZENCIO et al., 1990; MEZENCIO; REBELLO, 1993). O RNA genômico (42S) funciona como RNA mensageiro (RNAm) para as proteínas não-estruturais, sendo traduzido nas poliproteínas p123 e p1234 que são clivadas, dando origem a quatro proteínas não-estruturais (nsp1, nsp2, nsp3 e nsp4), necessárias à replicação do RNA viral. As proteínas não-estruturais formam o complexo de replicação responsável pela formação inicial de várias fitas de RNA genômico de polaridade negativa (42S) que, por sua vez, servem como molde para a síntese de novas fitas de RNA genômico de polaridade positiva (RNA 42S+) e de RNA subgenômico 26S, também de polaridade positiva. O RNA subgenômico (26S) serve como RNAm para a tradução das proteínas estruturais do vírus, as quais são sintetizadas sob a forma de uma poliproteína, dando origem à proteína do capsídeo (proteína C) e às proteínas p62, 6K e E1. A proteína C possui atividade autoproteolítica, realizando sua própria clivagem durante a tradução, a partir do polipeptídeo nascente (STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G., 1994).

A tunicamicina é um antibiótico isolado inicialmente de *Streptomyces lysosuperificus* (TAKATSUKI; ARIMA; TAMURA, 1971), cuja estrutura química é formada por uracil, uma cadeia de ácido graxo variável nos diferentes compostos da família, N-acetilglicosamina e aminodialdose. Seu mecanismo de ação está relacio-

nado com a interrupção da síntese do oligossacarídeo durante as primeiras etapas do processo de glicosilação de proteínas. Isto ocorre devido à competição da TM e da N-acetilglicosamina pelo grupo fosfato do carreador dolicol fosfato (FIGURA 1) (HEIFETZ; KEENAN; ELBEIN, 1979; LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

Devido a estas propriedades, a TM tem sido utilizada em diversos estudos sobre a função das glicoproteínas. Os vírus envelopados

apresentam glicoproteínas em sua composição e alterações na síntese ou processamento das mesmas interferem na infecciosidade dos vírus (LEAVITT; SCHLESINGER; KORNFIELD, 1977). Nosso laboratório está desenvolvendo um trabalho que procura correlacionar os aspectos da replicação viral em dois tipos de células, de vertebrados e invertebrados. Neste trabalho, nosso objetivo foi verificar o efeito antiviral da TM em células de *Aedes albopictus*.

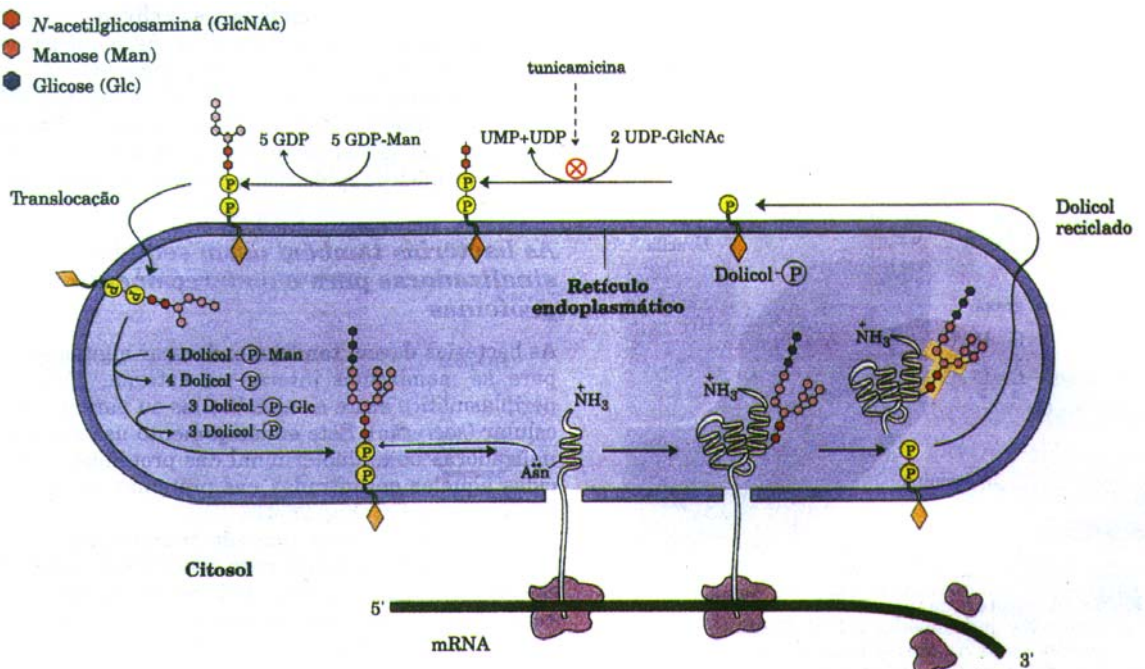


FIGURA 1 – Esquema de síntese do núcleo oligossacarídico das glicoproteínas
Fonte: LEHNINGER; NELSON; COX, 1995, p.701.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo celular e propagação viral

Células de *Aedes albopictus*, clone C6/36, foram usadas neste estudo. Esta linhagem celular foi obtida do Arbovirus Research Unit, Yale University, USA. As células são mantidas a 28°C em meio Leibovitz's (L-15), suplementado com 0,2 mM de aminoácidos não-essenciais, 0,3% de triptose fosfato, 0,02% de L-glutamina, 10% de soro fetal bovino, penicilina (500U/ml), estreptomicina (100µg/ml) e anfotericina B (Fungizona, 2,5µg/ml). A amostra do vírus Mayaro foi obtida inicialmente através da Amer-

ican Type Culture Collection, Rockville, MD, USA e propagada em células BHK-21. Após a lise celular (cerca de 72 h), o meio de cultura é recolhido e submetido a uma centrifugação de 3.000 xg, durante 10 min, para remoção de restos celulares. Em seguida, a suspensão é dividida em alíquotas e guardada a -70°C.

Tratamento das células com TM

A TM, obtida da Sigma Chemical Co., USA, é dissolvida em meio de cultura (DMEM, Meio de Eagle modificado por Dulbecco). As células de *Aedes albopictus* são infectadas com 10 unidades formadoras de placas (PFU) por

célula, em meio sem soro. Após 60 min a 28°C, os vírus não adsorvidos são removidos por aspiração, é adicionado meio de cultura fresco, e as células são incubadas a 28°C. Para determinar a atividade antiviral, meio de cultura contendo várias concentrações de TM é adicionado à monocamada de células após o período de adsorção viral. Posteriormente, as células são incubadas a 28°C e, após 24 h e 48 h, o sobrenadante é recolhido para determinação do título viral.

Titulação viral

A produção de partículas virais infecciosas em células tratadas e não-tratadas é determinada por ensaio de placa. Resumidamente, diluições virais (0,3 ml) são adicionadas à monocamada de células Vero confluentes. Após 60 min, a 37°C, os vírus que não adsorveram são removidos por aspiração, e as monocamadas cobertas com meio de cultura, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 50% de goma karaya (Sigma Chemical Co.). Em seguida, as células são incubadas em atmosfera de 5% de CO₂, a 37°C, por três dias. Decorrido este tempo, as monocamadas são coradas com cristal violeta (1%) e as placas virais contadas (BURLANDY; REBELLO, 2001).

Análise das proteínas marcadas com metionina-[³⁵S] por eletroforese em gel de poli-acrilamida

Monocamadas de células confluentes são marcadas com metionina-[³⁵S] (20µCi/ml) em meio isento de metionina. Após a marcação, as células são lavadas com PBS e lisadas em tampão de lise (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol; 5% 2-mercaptoetanol e 0,001% de azul de bromofenol). As amostras são aquecidas por 5 min, a 100°C, e submetidas à eletroforese em gel de poli-acrilamida a 12,5%, segundo técnica descrita por Laemmli (1970). Os géis secos são expostos a filme Kodak X-Omat e analisados com o sistema de intensificação Kodak BIOMAX Transcreen (LE). As proteínas virais são quantificadas por análise densitométrica do perfil da auto-radiografia com um densitômetro a laser (Ultrosan 2202, LKB

Instruments, Bromma, Suécia). As proteínas do vírus Mayaro são designadas pelo seu peso molecular relativo, estimado por comparação com um padrão de proteínas (Life Technologies).

RESULTADOS

Com o objetivo de verificar o efeito de diferentes concentrações de TM na replicação do vírus Mayaro, células confluentes de *A. albopictus* foram infectadas com uma multiplicidade de infecção igual a 1 (moi = 1) e, após o período de adsorção (1h, 28°C), o inóculo foi retirado por aspiração e as células lavadas com meio de cultura. A seguir, adicionou-se TM em diferentes concentrações e as culturas foram incubadas a 28°C, durante 24h e 48h. Após o tempo especificado, o sobrenadante foi recolhido para determinação do título viral.

Dentro das condições experimentais descritas neste trabalho, o tratamento das células com TM não induziu efeito tóxico, como determinado pela análise microscópica e pela técnica de coloração viral com Azul de Tripán (dados não mostrados).

Como podemos observar na Tabela 1, o tratamento das células com 0,05µg/ml de TM

TABELA 1
Inibição da replicação viral em células tratadas com TM em diferentes concentrações

TM (µg/ml)	24 h.p.i		48 h.p.i	
	% de inibição	PFU/ml	% de inibição	PFU/ml
0	0	10 ⁸	0	1,1x10 ⁹
0,05	48	5,2x10 ⁷	52	5,3x10 ⁸
0,1	48	5,2x10 ⁷	76	2,7x10 ⁸
0,15	74	2,6x10 ⁷	89	1,3x10 ⁸
0,2	87	1,3x10 ⁷	94	6,7x10 ⁷
0,5	96,7	3,3x10 ⁶	98,5	1,7x10 ⁷

Notas: O sobrenadante das células infectadas e tratadas com TM em diferentes concentrações foi recolhido e dosado pelo método de placas (ver Materiais e Métodos). O resultado está expresso na Tabela na forma de PFU/ml e a porcentagem de inibição em relação ao controle infectado.
h.p.i.-horas após infecção.
PFU-unidades formadoras de placas.

durante 24h e 48h de infecção inibiu em 50% a produção viral. Em concentrações mais elevadas de TM, o título viral foi sendo gradativamente reduzido, de forma mais acentuada nas culturas infectadas após 48h. O aspecto das células ao microscópio óptico não apresentava alterações em sua morfologia.

A seguir, investigou-se se o efeito antiviral observado após o tratamento das células com TM poderia ser resultante da inibição da síntese de proteínas virais. Células confluentes foram infectadas ($moi = 10$) e tratadas com diferentes concentrações de TM. Após o período de 24h, as células foram lavadas com meio de cultura e tratadas com metionina- $[^{35}S]$ ($20\mu Ci/ml$) durante 1h. As proteínas foram analisadas por eletroforese em gel de poliácridamida, conforme descrito em Materiais e Métodos.

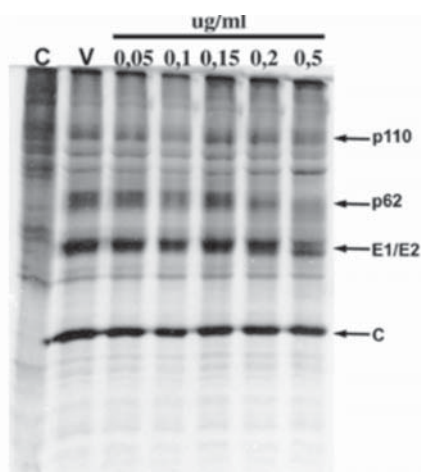
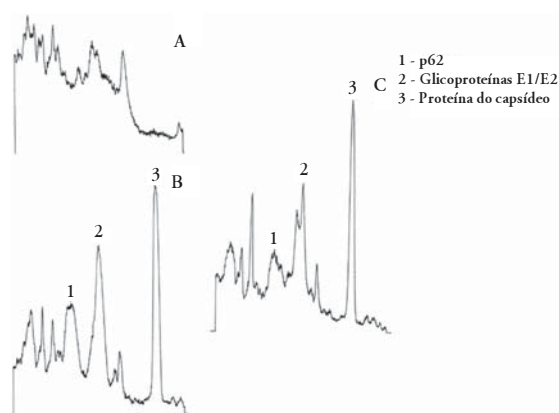


FIGURA 2 – Análise da síntese de proteínas do vírus Mayaro através de eletroforese em gel de poliácridamida

A preparação das amostras e a análise das proteínas foram feitas segundo mencionado em Materiais e Métodos. C-célula não infectada e não tratada, V-célula infectada, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,5-Concentrações de TM em células infectadas, p110-precursor 110 kDa, p62-precursora p62, E1/E2-glicoproteínas E1 e E2, C-proteína do capsídeo.

Na Figura 2, podemos observar inicialmente o perfil das células controle infectadas (coluna V), nas quais as proteínas virais estão bem evidenciadas, a saber: as precursoras p110 e p62, as proteínas estruturais E1 e E2 (glicoproteínas) e a proteína C do nucleocapsídeo. Curiosamente, o tratamento com TM não re-

duziu, de maneira significativa, a síntese de proteínas virais. Apenas em concentrações mais elevadas (0,2 e 0,5 $\mu g/ml$) foi observada uma redução neste processo. O resultado destas experiências pode ser melhor apreciado pela análise densitométrica da auto-radiografia (FIGURA 3).



	% de inibição	M. E. R. (cm)	
		C	V
Proteína C	17,63	3,4	3,4
Glicoproteínas E1/E2	30,15	2,7	2,2
p62	34,5	2	1,9

FIGURA 3 – Análise densitométrica das proteínas do vírus Mayaro em células de *Aedes albopictus* tratadas com TM

A auto-radiografia foi analisada por densitometria e os perfis obtidos são: A-célula não infectada e não tratada, B-célula infectada, C-célula infectada e tratada com TM (0,5mg/ml). A tabela mostra a porcentagem de inibição da síntese das proteínas virais a partir da pesagem dos picos das mesmas em balança analítica e a mobilidade eletroforética relativa das proteínas (M. E. R).

Pode-se observar que, na dose de 0,5 $\mu g/ml$, encontra-se uma discreta redução da proteína do capsídeo; as glicoproteínas, por outro lado, apresentam uma redução significativa na faixa de 30%, indicando que a síntese das mesmas está afetada. A inibição, entretanto, não é proporcional à drástica redução do título viral mostrado na Tabela 1. Observa-se também que, em células tratadas com 0,5 $\mu g/ml$ de TM, as glicoproteínas virais apresentam uma maior migração eletroforética. Este resultado é compatível com a interpretação de que o tratamento com TM resulta na síntese de proteínas virais não

glicosiladas e, conseqüentemente, com peso molecular reduzido.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

As glicoproteínas são componentes majoritários do envelope viral, apresentando funções importantes, tais como na etapa de adsorção e interação com os receptores celulares e no processo de liberação das partículas virais através da superfície celular. Diversos autores têm mostrado que o bloqueio da seqüência das reações de glicosilação interfere, de modo acentuado, com a propagação de diversos vírus animais (CASH; HENDERSHOT; BISHOP, 1980).

Nas experiências realizadas neste trabalho, demonstramos que TM possui uma potente atividade antiviral em células de mosquito (*Aedes albopictus*) infectadas pelo vírus Mayaro. Dois aspectos foram estudados: o efeito da TM na propagação viral e na síntese de proteínas virais específicas.

A análise das proteínas por gel de poliacrilamida e auto-radiografia revelou que, em baixas concentrações de TM (0,05µg/ml, 0,1 µg/ml e 0,15µg/ml), a síntese das proteínas virais está inalterada. Somente em concentrações mais elevadas (0,2µg/ml e 0,5µg/ml), a síntese das proteínas virais, particularmente as glicoproteínas, foi reduzida. Estes dados indicam que a

tradução e a síntese de RNAm viral não é o alvo principal da ação da TM.

O tratamento das células com TM na concentração de 0,5mg/ml acarretou, como mostrado na Figura 3, uma inibição da síntese das proteínas E1 e E2. A alteração da mobilidade eletroforética, entretanto, indica que estas proteínas não estão sendo corretamente processadas. Esta alteração deve estar ocorrendo em nível de glicosilação, desde que este é o efeito esperado da TM. Em nosso laboratório, demonstramos que alterações no processamento das glicoproteínas levam a um bloqueio da montagem do vírus (FERREIRA et al., 2000). Por outro lado, como em doses menores não observamos qualquer inibição da síntese de proteínas virais, embora a produção de partículas virais infecciosas decresça em 50%, sugerimos que, talvez, outros mecanismos estejam envolvidos.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que a atividade antiviral da TM não pode ser explicada somente por alterações nas proteínas virais; apenas nas concentrações de TM mais elevadas esta correlação pode ser feita. Estes dados levam a concluir que outros mecanismos possam estar operando, tais como, alteração no transporte das glicoproteínas virais para a membrana celular e na liberação das partículas virais infecciosas.

Effect of tunicamycin on the replication of Mayaro virus in Aedes albopictus cells

Abstract

Tunicamycin (TM), an inhibiting substance of bacteria, fungi and yeast proliferation, is an antibiotic isolated from Streptomyces lysosuperficus. This antibiotic inhibits the formation of N-acetylglucosamine, thereby it greatly alters the glycosilation of proteins. In this study, we found that the presence of TM causes a drastic inhibition of Mayaro virus replication in Aedes albopictus cells. Even at low concentration (0,05µg/ml), the treatment of the cells for 24 hours reduced in 50% the production of the viral infectious particles. At higher concentrations, the antibiotic reduced progressively the virus replication, resulting in 98,5% inhibition after a 48 hour treatment. The polyacrylamide gel electrophoresis analysis of [³⁵S]-methionine-labelled proteins showed that TM at 0,05µg/ml, 0,1µg/ml e 0,15µg/ml concentration does not affect the synthesis of Mayaro virus polypeptides. Only at higher concentration (0,5µg/ml), the modification of the synthesis and of the electrophoretic mobility of viral proteins were noticed. These results suggest that, at low concentration, TM may affect Mayaro virus replication in Aedes albopictus cells through other mechanisms.

Keywords: *Tunicamycin. Mayaro virus. Aedes albopictus cells.*

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, C. R. et al. Mayaro virus: a new human disease agent II. Isolation from blood of patients in Trinidad. **B. W. Y. Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.6, p.1012-1016, 1957.
- BURLANDY, F. M.; REBELLO, M. A. Inhibition of Mayaro virus replication by prostaglandin A₁ in Vero cells. **Intervirology**, v.44, p.344-349, 2001.
- CASH, P.; HENDERSHOT, L.; BISHOP, D. H. L. The effects of glycosilation inhibitors on the maturation and intracellular polypeptide synthesis induced by snowshoe hare bunyavirus. **Virology**, v.103, p.235-240, 1980.
- CAUSEY, O. R.; MAROJA, O. M. Mayaro virus: a new human disease agent III. Investigation of an epidemic of acute febrile illness in the River Guamá in Pará, Brazil and isolation of Mayaro virus as a causative agent. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.6, p.1017-1023, 1957.
- DE MENESES, M. D. F.; REBELLO, M. A. Effect of prostaglandin A₁, arsenite and aspirin on stress proteins response in mosquito cells. **Z. Naturforsch.**, v.56c, p.298-302, 2001.
- FERREIRA, D. F. et al. Weak bases affect late stages of Mayaro virus replication cycle in vertebrate cells. **J. Med. Microbiol.**, v.49, p.313-318, 2000.
- FONTENILLE, D.; TOTO, J. C. *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse), a potential new dengue vector in Southern Cameroon. **Emerg. Infect. Dis.**, v.7, n.6, p.1066-1067, 2001.
- HAWLEY, W. A. et al. *Aedes albopictus* in North America: probable introduction in used tires from Northern Asia. **Science**, v.236, p.1114-1116, 1987.
- HEIFETZ, A.; KEENAN, R. W.; ELBEIN, A. D. Mechanism of action of tunicamycin on the UDP-GlcNAc:Dolichyl-Phosphate GlcNAc-1-Phosphate transferase. **Biochemistry**, v.18, n.11, p.2186-2192, 1979.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LEAVITT, R.; SCHLESINGER, S.; KORNFELD, S. Tunicamycin inhibits glycosilation and multiplication of Sindbis virus and vesicular stomatitis virus. **J. Virol.**, v.21, n.1, p.375-385, 1977.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of biochemistry**. 2nd ed. New York: Worth Publishers, 1995.
- MEZENCIO, J. M. S.; REBELLO, M. A. Mayaro virus proteins. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.88, n.2, p.299-304, 1993.
- MEZENCIO, J. M. S. et al. Ultrastructural study of Mayaro virus replication in BHK-21 cells. **Arch. Virol.**, v.114, p.229-235, 1990.
- MOORE, C. G.; MITCHELL, C. J. *Aedes albopictus* in the United States: ten-year presence and public health implications. **Emerg. Infect. Dis.**, v.3, n.3, p.329-334, 1997.
- PINHEIRO, F. P. Arboviral zoonoses in South America. Mayaro fever. In: CRC. **Handbook series in zoonoses, section B: Viral zoonoses**. Boca Raton, Flórida: CRC Press, 1981. p.159-164.
- PINHEIRO, F. P. et al. Virologia: aspectos clínico-epidemiológicos. **Anais do Instituto Evandro Chagas**, v.1, p.375-408, 1986.
- STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The alphaviruses: gene expression, replication and evolution. **Microbiol. Rev.**, v.58, p.491-562, 1994.
- TAKATSUKI, A.; ARIMA, K.; TAMURA, G. Tunicamycin, a new antibiotic I. Isolation and characterization of tunicamycin. **J. Antibiotics**, v.24, n.4, p.215-223, 1971.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro. Nossos agradecimentos à Dr.^a Maria Christina Soares Rebello pelas sugestões e críticas no desenvolvimento deste trabalho.