WILSON TITO CRIVELLARI DAMASCENO

Obtenção e caracterização de células tronco indiferenciadas de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* (CRAMER, 1776) (Lepidoptera, Morphidae: Brassolini), como modelo celular de Lepidóptera

São Paulo

2015

WILSON TITO CRIVELLARI DAMASCENO

Obtenção e caracterização de células tronco indiferenciadas de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* (CRAMER, 1776) (Lepidoptera, Morphidae: Brassolini), como modelo celular de Lepidóptera

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria

São Paulo
2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3160
FMVZ

Crivellari-Damasceno, Wilson Tito

Obtenção e caracterização de células tronco indiferenciadas de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* (CRAMER, 1776) (Lepidoptera, Morphidae: Brassolini), como modelo celular de Lepidóptera / Wilson Tito Crivellari-Damasceno. -- 2015.
141 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria.

1. *Caligo illioneus illioneus*. 2. Células tronco. 3. Cultura celular de insetos. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Obtenção e caracterização de células-tronco indiferenciadas de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* (Cramer, 1776) (Lepidoptera, Morphidae: Brassolini), como modelo celular de Lepidoptera", protocolado sob o nº 2931/2013, utilizando massa de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus*, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 10/4/2013.

We certify that the Research "Obtaining and characterization of undifferentiated stem cells of *Caligo illioneus illioneus* as culture model in lepidopteran", protocol number 2931/2013, utilizing embryonated egg mass of *Caligo illioneus illioneus*, under the responsibility Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 4/10/2013.

São Paulo, 23 de abril de 2015.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Autor: CRIVELLARI-DAMASCENO, Wilson Tito

Título: Obtenção e caracterização de células tronco indiferenciadas de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* (CRAMER, 1776) (Lepidoptera, Morphidae: Brassolini), como modelo celular de Lepidóptera

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____ Julgamento _____

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Izabel Crivellari e Mario Alves Damasceno, por todo o incentivo, paciência, apoio e esperança. Muito obrigado por primeiramente serem perfeitos, da exata maneira que são, e obrigado pelo privilégio de minha criação com todo o carinho e amor.

A minha namorada, Maria Eduarda Pimentel Madeira o meu muito obrigado por toda a paciência do universo necessária, amor, apoio, incentivo e por sempre, independente da situação, acreditar em mim e me incentivar nas buscas de meus objetivos.

...com a mais profunda gratidão, amor e carinho, dedico a vocês esta vitória em mais um desafio em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre me forneceram apoio, incentivo e me motivaram a não desistir independente das dificuldades e desafios apresentados pela vida.

A minha amada namorada que trabalha e luta incessantemente todos os dias com o objetivo de me transformar em uma pessoa melhor, que me apoia, incentiva a nunca desistir de um objetivo e que sempre acreditou em minha capacidade. As dificuldades percorridas durante este projeto só foram superadas com a ajuda de seu amor e paciência.

Ao meu excelentíssimo orientador, Professor Doutor Durvanei Augusto Maria, pela paciência, confiança, seriedade, conhecimento, capacidade única, por me ensinar a postura profissional e respeitar a carreira científica.

A Dra. Sonia Will (Soninha resolve), por sua contribuição para a confecção deste trabalho, auxílio na execução de diversos experimentos, ensinamentos e mais importante, obrigado pela amizade.

A todos do departamento de Anatomia da FMVZ: Professora Doutora Maria Angélica Miglino, Lara, Marcão, Márcio, Ana Paula, Jose, Kátia (Cláudia), Raphael (Salsicha), Jéssica, Ronaldo, Rose Eli, Juliana, Malavasi, Thierry, Bruna, Jaque, João, Bianca, Horácio, Luciano, Phelipe. Muito obrigado pela ajuda, paciência e amizade.

Um agradecimento especial ao meu colega, amigo e irmão Rennan (Fofó), pela ajuda provida, pelas incontáveis e sinceras conversas, pela amizade e pelo amor que me foi dado.

Aos amigos do Instituto Butantan pela companhia: Aline, Leandro, Manu, Larissa, Letícia, Alberto, Thaís, Arthur e Joyce.

A Prof. Dra. Marta Maria Antoniazzi do Departamento de Biologia Celular do Instituto Butantan, pelo empréstimo do aparelho de varredura utilizado neste trabalho, principalmente pela Técnica Responsável, Beatriz Maurício, que me ensinou e auxiliou-me na execução das análises.

Ao Sandro, Biólogo do Borboletário de Diadema pela ajuda e doação do material biológico e a estagiária Salma, pelo auxílio na coleta.

Ao fotografo Rafael Lopes, pelo excelente trabalho e auxílio na produção das imagens desta pesquisa.

Aos familiares, alguns que mesmo longe sempre me apoiaram: vovós Vivi e Arlette, tia Li, tia So, tio Chico, tia Nâna, tia Jacque, tio Baby, tio Mimi, tia Nara, tia Adele, tia Lu, tio Dé. Ao primos e primas. Lu, Jr., Yuri, Marcela, Thaís, Juju, Didi, Fê, Dudu, Gu, Gui, Gi, Carol, Nina e Bento. A minha sogra Sandra e ao meu sogro Fernando.

Aos meus irmãos e irmãs: Preta, Juan, Duty, Gordo, Cris, Johnny, Clazão.

Aos meus amigos e amigas Téfi, Alê, Gordinho, Will, Deus, Vini, Macaco, Pipoka, Satu, Giga, Guto, Brunão, Gabi, Ka, Carlito, Macaca, Pirulito, Tamiris, Japa, Balói, Tom, Presunto, Clarissa, Caveira, Fê, Jesus, Baraba, Pam, Carioca, Tessa, Denis e todos aqueles que por algum motivo eu tenha esquecido.

A meu querido filho Shark, que me dá o seu amor incomensurável de uma maneira incondicional e que partilhamos uma admiração recíproca.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram em minha vida e para a realização deste projeto.

Por fim, agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela oportunidade e financiamento durante a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“Só sei que nada sei, e o fato de saber isso, me coloca em vantagem sobre aqueles
que acham que sabem alguma coisa.”
(Sócrates)

“A vida é muito curta para ser pequena”
(Benjamin Disraeli)

“Muda, que quando a gente muda, o mundo muda com a gente.

A gente muda o mundo na mudança da mente.

E quando a mente muda, a gente anda pra frente.

E quando a gente manda, ninguém manda na gente.

Na mudança de atitude não há mal que não se mude nem doença sem cura.

Na mudança de postura a gente fica mais seguro, na mudança do presente a gente
molda o futuro.”

(Gabriel O Pensador)

RESUMO

CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T. **Obtenção e caracterização de células tronco indiferenciadas de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* (CRAMER, 1776) (Lepidoptera, Morphidae: Brassolini), como modelo celular de Lepidóptera.** [Obtention and characterization of undifferentiated stem cell of embryonated eggs from *Caligo illioneus illioneus* (CRAMER, 1776) (Lepidoptera, Morphidae: Brassolini) as cellular model of Lepidoptera]. 2015. 141 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A subespécie *Caligo illioneus illioneus*, conhecida popularmente por Olho-de-coruja é uma Lepidóptera importante da Mata Atlântica no Brasil, possuindo ampla distribuição Neotropical, sendo predadora voraz de diversas culturas agrícolas de importância econômica quando em seus estádios de lagarta. Desde o descobrimento da primeira estabilização por Grace (1962), mais de 500 linhagens celulares de insetos já foram estabelecidas, sendo ferramentas valiosas para o progresso nos estudos fisiológicos, propagação *in vitro* de patógenos, pesquisas sobre controle de pragas e na produção de proteínas recombinantes. Porém, poucos trabalhos apresentaram resultados positivos com linhagens de células tronco embrionárias, especialmente em Lepidópteras. Este projeto teve como objetivo obter, isolar e caracterizar células tronco indiferenciadas de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* obtidas a partir de culturas primárias sob protocolo de cultivo celular específico para Lepidópteras, armazenamento em nitrogênio líquido, avaliação da manutenção e expansão *in vitro*. Através de análises anatômicas e taxonômicas, confirmou-se que a subespécie tratava-se de *Caligo illioneus illioneus*. As análises ultraestruturais do cório do ovo, através de microscopia eletrônica de varredura, demonstraram variação de 32-35 carenas verticais, havendo diferenças taxonômicas no cório do ovo das espécies do gênero *Caligo*. Após a obtenção das células do embrião, estas foram isoladas e cultivadas em meio de cultura celular DMEM-High suplementado, em temperatura de 22°C sem a adição de CO₂. Foram realizadas as análises de aspectos citológicos, morfologia celular, ciclo celular, análises de imunofenotipagem por citometria de fluxo e potencial elétrico e funcional da membrana mitocondrial. As células apresentaram formato globóide, sem adesão ao substrato, com o núcleo bem delimitado e com baixo volume celular. Os dados obtidos pelas análises do ciclo celular das 4 amostras em diferentes passagens

demonstraram que o protocolo estabelecido para a cultura celular foi favorável, com significativo rendimento no número de células, na expansão e criopreservação, confirmado pelo aumento na proporção de células nas fases G2/M e de Síntese, e que as células estavam realizando os processos naturais de interfase e de divisão celular responsável pela embriogênese e crescimento. A análise de imunofenotipagem por citometria de fluxo apresentou marcações positivas com alta expressão para os marcadores de células pluripotentes (Sox2 e Oct 3/4), marcadores de morte celular por apoptose (Caspase 3 e HSP70), marcadores específicos de insetos (Anti Rab-5, Axons BP 102, GM 130 e Dro. FMR1) e marcadores de células de origem mesenquimal (Stro-1, Vimentina), apresentando baixa expressão somente em CD 90. O experimento de potencial elétrico e funcional da membrana mitocondrial apresentou células metabolicamente ativas, não evidenciando diferenças significativas entre as culturas primárias e entre terceira e quinta passagens das 4 amostras. Concluiu-se que foi possível estabelecer um protocolo de cultura celular para Lepidópteras livre de patógenos e que os ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* com 3 e 4 dias para a eclosão apresentaram maior duração em cultura celular, possuindo células indiferenciadas, representando, deste modo, uma ferramenta promissora com grande potencial para pesquisas em biotecnologia e biologia molecular, principalmente devido ao fato da espécie ser de importância ecológica, médica e em controle de pragas nas ciências agrárias.

Palavras-chave: *Caligo illioneus illioneus*. Células tronco. Cultura celular de insetos.

ABSTRACT

CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T. **Obtention and characterization of undifferentiated stem cell of embryonated eggs from *Caligo illioneus illioneus* (CRAMER, 1776) (Lepidoptera, Morphidae: Brassolini) as cellular model of Lepidoptera.** [Obtenção e caracterização de células tronco indiferenciadas de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* (CRAMER, 1776) (Lepidoptera, Morphidae: Brassolini), como modelo celular de Lepidóptera]. 2015. 141 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Caligo illioneus illioneus subspecies, known popularly by Owl Butterfly, is an important Lepidoptera of the Brazilian Atlantic Forest, with wide distribution Neotropical, being a voracious predator of various agricultural crops of economic importance when in their caterpillar stages. Since discovery of the first stabilization by Grace (1962), over 500 insect cell lines have been established and are valuable tools for progress in physiological studies, *in vitro* propagation of pathogens, research on pest control and the production of recombinant proteins. However, few studies showed positive results to embryonic stem cell lines, especially in Lepidoptera. This study aimed to obtain, isolate and characterize undifferentiated stem cells of embryonated eggs from *Caligo illioneus illioneus*, obtained from primary cultures under specific cell culture protocol to Lepidoptera, storage in liquid nitrogen, evaluation of maintenance and expansion *in vitro*. By means of anatomical and taxonomic analysis, it was confirmed that the subspecies was *Caligo illioneus illioneus*. Ultrastructural analysis of the egg chorion, by scanning electron microscopy showed variation of 32-35 vertical carina, having taxonomic differences in egg chorion at the *Caligo* species. After obtaining the embryonic cells, these were isolated and cultured in cell culture medium DMEM-High supplemented, at 22 ° C without addition of CO₂. They were carried out analysis of cytological aspects, cell morphology, cell cycle, immunophenotyping by flow cytometry and electrical and functional potential of mitochondrial membrane. The cells showed globoid shape without adhesion to the substrate, with well-defined nucleus and low cell volume. Data obtained by cell cycle analysis of the four samples at different passages showed that established protocol for cell culture was favorable, with significant yield relative to the number of cells, the expansion and cryopreservation, confirmed by the increase in the proportion of cells in G2/M and Synthesis phases, and the cells were

performing the natural processes of interphase and cell division, responsible for embryogenesis and growth. Immunophenotyping analysis by flow cytometry showed positive markings with high expression for pluripotent cells markers (Sox2 e Oct 3/4), markers of cell death by apoptosis (Caspase 3 e HSP70), specific markers for insects (Anti Rab-5, Axons BP 102, GM 130 e Dro. FMR1) and mesenchymal cell markers (Stro-1, Vimentina), presenting low expression only in CD 90. The electrical and functional potential analysis of mitochondrial membrane has resulted in metabolically active cells, not evidencing significant differences among primary cultures and between the third and fifth passages of 4 samples. It was concluded that it was possible to establish a cell culture protocol to Lepidoptera free from pathogens and that embryonated eggs from *Caligo illioneus illioneus* with 3 to 4 days for hatching showed longer duration in cell culture, having undifferentiated cells, representing in this way, a promising tool with great potential for research in biotechnology and molecular biology, mainly due to this species have ecological and medical importance and in control pests at the agricultural sciences.

Keyword: *Caligo illioneus illioneus*. Stem cells. Cell culture from insects.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Fotos de agrupamentos de ovos ovipostos por <i>Caligo illioneus illioneus</i>	54
Figura 2 -	Ovos de <i>Caligo illioneus illioneus</i>	55
Figura 3 -	Primeiro instar da lagarta de <i>Caligo illioneus illioneus</i>	55
Figura 4 -	Segundo instar da lagarta de <i>Caligo illioneus illioneus</i>	56
Figura 5 -	Terceiro instar da lagarta de <i>Caligo illioneus illioneus</i>	56
Figura 6 -	Quarto instar da lagarta de <i>Caligo illioneus illioneus</i>	57
Figura 7 -	Quinto instar da lagarta de <i>Caligo illioneus illioneus</i>	57
Figura 8 -	Pupa de <i>Caligo illioneus illioneus</i>	58
Figura 9 -	Adulto de <i>Caligo illioneus illioneus</i>	59
Figura 10 -	Dimorfismo em adultos de <i>Caligo illioneus illioneus</i>	60
Figura 11 -	Alteração da forma e coloração das asas de <i>Caligo illioneus illioneus</i>	61
Figura 12 -	Foto do ovo embrionado de <i>Caligo illioneus illioneus</i>	62
Figura 13 -	Foto ultraestrutural do ovo embrionado de <i>Caligo illioneus illioneus</i>	63
Figura 14 -	Foto ultraestrutural do ovo embrionado de <i>Caligo illioneus illioneus</i>	64
Figura 15 -	Foto ultraestrutural do ovo embrionado de <i>Caligo illioneus illioneus</i>	65
Figura 16 -	Foto ultraestrutural do ovo embrionado de <i>Caligo illioneus illioneus</i>	66
Figura 17 -	Foto ultraestrutural do ovo embrionado de <i>Caligo illioneus illioneus</i>	67
Figura 18 -	Foto ultraestrutural do cório do ovo de <i>Caligo illioneus illioneus</i>	68
Figura 19 -	Foto ultraestrutural do cório do ovo de <i>Caligo illioneus illioneus</i>	69

Figura 20 -	Foto ultraestrutural do embrião de <i>Caligo illioneus illioneus</i>	70
Figura 21 -	Citologia das culturas celulares.....	71
Figura 22 -	Citologia das culturas celulares.....	72
Figura 23 -	Cultura celular de ovos embrionados de <i>Caligo illioneus illioneus</i>	73
Figura 24 -	Cultura celular de ovos embrionados de <i>Caligo illioneus illioneus</i>	74
Figura 25 -	Cultura celular de ovos embrionados de <i>Caligo illioneus illioneus</i>	75
Figura 26 -	Cultura celular de ovos embrionados de <i>Caligo illioneus illioneus</i>	76
Figura 27 -	Morfologia celular por citometria de fluxo.....	77
Figura 28 -	Morfologia celular por citometria de fluxo.....	78
Figura 29 -	Morfologia celular por citometria de fluxo.....	79
Figura 30 -	Ciclo celular por citometria de fluxo.....	82
Figura 31 -	Ciclo celular por citometria de fluxo.....	83
Figura 32 -	Ciclo celular por citometria de fluxo.....	84
Figura 33 -	Ciclo celular por citometria de fluxo.....	85
Figura 34 -	Análise estatística das fases do ciclo celular da amostra 1.....	86
Figura 35 -	Análise estatística das fases do ciclo celular da amostra 2.....	87
Figura 36 -	Análise estatística das fases do ciclo celular da amostra 3.....	88
Figura 37 -	Análise estatística das fases do ciclo celular da amostra 4.....	89
Figura 38 -	Análise estatística do DNA fragmentado e Debris.....	90
Figura 39 -	Análise de expressão dos marcadores por citometria da amostra 1 em P3.....	92
Figura 40 -	Análise estatística dos marcadores na amostra 1 (ovos com 4 dias para a eclosão) em terceira passagem (P3).....	93
Figura 41 -	Análise de expressão dos marcadores por citometria da amostra 1 em P5.....	94

Figura 42 -	Análise estatística dos marcadores na amostra 1 (ovos com 4 dias para a eclosão) em quinta passagem (P5).....	95
Figura 43 -	Análise de expressão dos marcadores por citometria da amostra 2 em P3.....	96
Figura 44 -	Análise estatística dos marcadores na amostra 2 (ovos com 3 dias para a eclosão) em terceira passagem (P3).....	97
Figura 45 -	Análise de expressão dos marcadores por citometria da amostra 2 em P5.....	98
Figura 46 -	Análise estatística dos marcadores na amostra 2 (ovos com 3 dias para a eclosão) em quinta passagem (P5).....	99
Figura 47 -	Análise de expressão dos marcadores por citometria da amostra 3 em P3.....	100
Figura 48 -	Análise estatística dos marcadores na amostra 3 (ovos com 2 dias para a eclosão) em terceira passagem (P3).....	101
Figura 49 -	Análise de expressão dos marcadores por citometria da amostra 3 em P5.....	102
Figura 50 -	Análise estatística dos marcadores na amostra 3 (ovos com 2 dias para a eclosão) em quinta passagem (P5).....	103
Figura 51 -	Análise de expressão dos marcadores por citometria da amostra 4 em P3.....	104
Figura 52 -	Análise estatística dos marcadores na amostra 4 (ovos com 1 dia para a eclosão) em terceira passagem (P3).....	105
Figura 53 -	Análise de expressão dos marcadores por citometria da amostra 4 em P5.....	106
Figura 54 -	Análise estatística dos marcadores na amostra 4 (ovos com 1 dias para a eclosão) em quinta passagem (P5).....	107
Figura 55 -	Histogramas representativos da análise do potencial elétrico mitocondrial.....	108
Figura 56 -	Análise estatística do potencial elétrico da membrana mitocondrial em cultura primária (CP) das amostras 1, 2, 3 e 4.....	109
Figura 57 -	Histograma da análise do potencial elétrico mitocondrial.....	110

Figura 58 -	Análise estatística do potencial elétrico da membrana mitocondrial da amostra 1 em terceira passagem (P3) e quinta passagem (P5).....	111
Figura 59 -	Histograma da análise do potencial elétrico mitocôndria.....	112
Figura 60 -	Análise estatística do potencial elétrico da membrana mitocondrial da amostra 2 em terceira passagem (P3) e quinta passagem (P5).....	113
Figura 61 -	Histograma da análise do potencial elétrico mitocondrial.....	114
Figura 62 -	Análise estatística do potencial elétrico da membrana mitocondrial da amostra 3 em terceira passagem (P3) e quinta passagem (P5).....	115
Figura 63 -	Histograma da análise do potencial elétrico mitocondrial.....	116
Figura 64 -	Análise estatística do potencial elétrico da membrana mitocondrial da amostra 4 em terceira passagem (P3) e quinta passagem (P5).....	117
Quadro 1 -	Tabela de morfometria do ovo contendo: Diâmetro, Altura, Carenas verticais e Carenas horizontais com respectivos, Maximo, Mínimo, Média com desvio padrão.....	62
Quadro 2 -	Marcadores celulares e respectivas funções.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ab	aparato bucal
Ac	aerópilas
An	ânulo
Ap	polo anterior
At	tóxax-abdômen
AT	células metabolicamente ativas
BSA	albumina de soro bovino
<i>C. i. illioneus</i>	<i>Caligo illioneus illioneus</i>
Cb	cápsula cefálica
Cd	cerdas táteis
CP	cultura primária
CRBio	Conselho Regional de Biologia
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	desvio padrão
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FSC	células tronco do folículo do ovário
Hr	carena horizontal
IN	células metabolicamente inativas
Is	camada celular interna do cório
ISC	células tronco intestinais
Lc	células inferiores
Mp	micrópila
Os	camada celular externa do cório
P1	primeira passagem
P2	segunda passagem
P3	terceira passagem
P4	quarta passagem
P5	quinta passagem
PBS	Phosphate buffered saline
Pp	polo posterior

Rh-123	Rodamina-123
Ro	roseta
SFB	soro fetal bovino
Uc	células superiores
Vr	carena vertical

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1	<i>CALIGO ILLIONEUS ILLIONEUS</i> (CRAMER, 1776)(LEPIDOPTERA, MORPHIDAE: BASSOLINE).....	29
2.2	IMPORTANCIA ECONÔMICA E ECOLÓGICA.....	31
2.3	CONTROLE DE PRAGAS E VETORES DE DOENÇAS.....	32
2.4	CÉLULAS TRONCO.....	35
2.5	CÉLULAS TRONCO DE INSETOS.....	37
2.6	CULTURA DE CÉLULAS TRONCO DE INSETOS.....	39
3	JUSTIFICATIVA.....	43
4	OBJETIVO	44
4.1	OBJETIVO GERAL.....	44
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
5	MATERIAL E MÉTODOS	45
5.1	COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	45
5.2	MICROSCOPIA ELETÔNICA DE VARREDURA.....	45
5.3	CITOLOGIA.....	46
5.4	CULTURA PRIMÁRIA DE MASSA DE OVOS EMBRIONADOS.....	47
5.5	SUBCULTURAS.....	48
5.6	CARACTERIZAÇÕES DA MORFOLOGIA CELULAR.....	49
5.7	CONGELAMENTO E ARMAZENAMENTO.....	49
5.8	ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR.....	50
5.9	ANÁLISE DE MARCADORES POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	50
5.10	ANÁLISE DO POTENCIAL ELÉTRICO MITOCONDRIAL.....	51
5.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
6	RESULTADOS	53
6.1	ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE <i>Caligo illioneus illioneus</i>	53
6.2	ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DOS OVOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	61

6.3	ASPECTOS CITOLÓGICOS DAS CULTURAS DE OVOS EMBRIONADOS.....	71
6.4	CARACTERIZAÇÃO CELULAR.....	72
6.5	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	76
6.6	ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR.....	79
6.7	ANÁLISE DE IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	90
6.8	POTENCIAL ELÉTRICO E FUNCIONAL DA MEMBRANA MITOCONDRIAL.....	107
7	DISCUSSÃO.....	118
8	CONCLUSÃO.....	130
	REFERÊNCIAS.....	131

1 INTRODUÇÃO

Existem aproximadamente 750.000 espécies de insetos descritas, correspondendo a aproximadamente 70 a 80% do Reino Animal, ou seja, a maioria dos seus representantes, tal fato é devido a sua grande adaptação a todos os ecossistemas terrestres e aquáticos, exceto ambiente marinho (NETO et al., 1976; MICHAEL, 1999; STORER et al., 2003). Possuindo 29 ordens a classe Insecta, pertence à superclasse Hexapoda e ao filo Arthropoda, na ordem Lepidóptera, mariposas e borboletas, encontram-se espécies de insetos-praga com diferentes hábitos alimentares (COSTA et al., 2010). No Brasil, dentre as espécies de Lepidópteras com importância ambiental e econômica, encontra-se a *Caligo illioneus illioneus* (CRAMER, 1776), conhecida popularmente como Borboleta olho de coruja. As espécies do gênero *Caligo* encontram-se amplamente distribuídas pela América Central e América do Sul, ocorrendo da Costa Rica até a Argentina, e compreendem 21 espécies, reconhecidas por Srygley e Penz (1999). Casagrande (1979) e Young; Muyschondt (1985) observaram que espécies do gênero *Caligo* apresentam distribuição geográfica essencialmente Neotropical, sendo poucos os registros da localização regional de cada espécie de *Caligo*.

Os adultos do gênero *Caligo* são borboletas conhecidas por sua exuberante coloração e apresentam dimorfismo sexual, sendo o macho diferenciado da fêmea pela coloração mais intensa e a presença de uma área brilhante na margem interna no ângulo anal das asas posteriores (CLEARE, 1926; CASAGRANDE, 2004). As espécies estão incluídas no elenco das maiores borboletas neotropicais e as fêmeas podem, ocasionalmente, apresentar massa corporal de até duas vezes superior à massa dos machos (SRYGLEY; PENZ, 1999).

A ovoposição é realizada na superfície adaxial e abaxial das folhas de suas plantas-hospedeiras, o ovo apresenta formato arredondado, pouco achatado no pólo anterior, com 2.0 mm de diâmetro (SOUZA et al., 2006) (MALO; WILLIS 1961). O cório do ovo possui número variável de carenas verticais, com um máximo de 36, que partem da região micropilar no pólo anterior (CLEARE, 1926; PENZ et al., 1999).

Segundo Malo; Willis (1961); Casagrande (1979); Souza et al (2006) e Specht; Paluch (2009) o relato de diferenças numéricas relacionadas a quantidade

de carenas verticais do cório entre as espécies do gênero *Caligo*, deu uma nova perspectiva sobre a taxonomia e diferenciação destes indivíduos. Porém, a morfologia ultraestrutural dos ovos e imaturos ainda é pouco conhecida, e a sua aplicação juntamente com outros caracteres taxonômicos, tem se mostrado de grande relevância para uma melhor compreensão no estudo da sistemática e das relações filogenéticas em Lepidópteras (MILLER, 1991; FREITAS; BROWN, 2004), assim como no estudo para o esclarecimento da relação entre as subfamílias de Nymphalidae e Morphidae (GRACIA-BARROS, 1988; FREITAS; OLIVEIRA, 1992; GARCIA-BARROS, 1999).

Os estudos desenvolvidos com o gênero *Caligo* de lepidópteras têm sido direcionados à taxonomia (MIELKE; CASAGRANDE 2006), sistemática (WAHLBERG et al., 2003; FREITAS E BROWN JR., 2004; PENZ, 2007) e morfologia (CASAGRANDE; MIELKE, 2008; SOUZA et al., 2006). Segundo Casagrande (2002) a monofilia dos Brassolíneos está sustentada em caracteres morfológicos das asas e do uso de monocotiledôneas, como planta hospedeira. Nenhum estudo detalhado foi realizado com *C. i. illioneus*, apesar de a espécie ser considerada uma das principais pragas da bananeira (GALLO et al., 2002). Durante o desenvolvimento larval pós-embrionário é comum ao gênero a presença de cinco instares larvais assim como observado por Mallo e Willis (1961) em *C. eurylochus*, Casagrande (1979) em *C. beltrao*, Casagrande e Mielke (2000) em *C. martia* e Sousa (2000) em *C. teucer*. As larvas do gênero *Caligo* apresentam um tamanho grande em relação a outras lepidópteras, e por serem filófagas, consomem uma grande quantidade de tecido foliar (CASAGRANDE, 1979). As larvas de *Caligo* consomem maior quantidade foliar principalmente em seu quinto e ultimo instar larval, conseqüentemente interferindo no desenvolvimento das plantas (CASAGRANDE, 1979).

Estudos sobre o desenvolvimento embrionário, biologia, ecologia e controles biológicos de infestações têm sido muito valorizados, através da associação às práticas comuns na agricultura sustentável, contribuindo para a minimização dos riscos de intervenções no meio ambiente, decorrentes da utilização não controlada de agrotóxicos (ALTIERI et al., 2003).

Pesquisas com células de insetos contribuíram para o progresso nos estudos fisiológicos das espécies no qual foram descritas (ZHANG et al., 2011), destacando-se na utilização da propagação *in vitro* de patógenos, pesquisas sobre controle de

pragas e na produção de proteínas recombinantes (GOODMAN; MCINTOSH, 1994). Em adição, esses estudos foram importantes fontes para o controle agrônomo desses insetos (ELIAS; JARDIN; KAMEN, 2007), pela produção de inúmeros fatores, entre eles está o baculovírus (BLACK et al., 1994; GOODMAN; MCINTOSH, 1994; MURHAMMER, 1996), capaz de controlar 100% das infestações (BELLOTTI; SMITH; LAPOINTE, 1999; FARIAS, 2003).

Foi demonstrado que os notáveis avanços na utilização de células de insetos podem facilitar a adaptação para o crescimento em culturas em suspensão, permitindo que estas sejam ferramentas importantes para estudos nas áreas das ciências biológicas e agrárias (ZHANG et al., 2011). É interessante notar que as células tronco hematopoiéticas identificadas em vertebrados necessitam de genes de desenvolvimento, estes foram que foram originalmente identificados em insetos (BLANK et al., 2008).

As células tronco são células indiferenciadas e com competência proliferativa que fornecem uma fonte constante de tipos celulares maduros essenciais para o crescimento e a manutenção do tecido normal (REYA et al., 2001). As células tronco embrionárias podem ser encontradas em tecidos embrionário e extra embrionário e podem permanecer em estado quiescente até a fase adulta, através da autorreplicação, ou diferenciar-se em diversos tecidos, a partir da expressão de determinados genes, e exercer funções específicas (SOUZA et al., 2003). Muitos tecidos, incluindo sangue, pele, intestino e células germinativas são continuamente mantidos por tecidos de células tronco. Sob certas condições, outros órgãos podem ser reparados utilizando progenitores semelhantes às células tronco gerados por células de desdiferenciação (KAI; SPRADLING, 2004).

Desde o descobrimento da primeira estabilização de células de insetos por Grace (1962), em Lepidopteras, foram estabelecidas mais de 500 linhagens celulares até a presente data, oriundas de mais de 100 espécies de insetos das ordens Lepidoptera e Diptera e 20% de outros invertebrados. As linhagens foram obtidas a partir dos ovários, sangue, tecido adiposo e intestino médio, uma vez que estas apresentaram maior índice de sucesso na estabilização e no desenvolvimento (LYNN, 2000, 2001). O interesse nas células de insetos, a princípio, residia na perspectiva da produção de inseticidas seletivos, como uma alternativa ecologicamente importante ao uso de compostos químicos para o controle de

pragas. Posteriormente, o atrativo destas células passou a ser relacionado ao desenvolvimento de vetores de baculovírus para a alta expressão de genes heterólogos e elas, rapidamente, passaram a ser muito interessantes por produzirem proteínas complexas com precisão e necessitarem de meios de cultura mais simples que as células de mamíferos (AGUILAR, 2010).

Muitas aplicações são dadas às linhagens celulares de insetos obtidas através de culturas; dentre elas destacam-se: a utilização como ferramenta de investigação em virologia, desenvolvimento de vacinas, em estudos de mecanismos de sinalização para estudar imunidade de insetos, produção de proteínas recombinantes, estudos moleculares, estudos celulares e em programas que visam produzir inseticidas com maior eficiência específica (SUDEEP; MOURYA; MISHRA, 2005; SMAGGHE et al., HOSHINO; HIROSE; IWABUCHI, 2009).

Loeb et al (2003) demonstraram que células tronco do intestino médio de Lepidoptera são multipotente e fatores de crescimento endógeno ou exógeno podem promover o desenvolvimento destas em diferentes tipos de células, assim como as células tronco de vertebrados (SLACK, 2000; WATT; HOGAN, 2000; SCHULDINER et al., 2000; MANSERGH et al., 2000). Entretanto, poucos trabalhos apresentam resultados positivos com linhagens de células tronco embrionárias de insetos.

Entre outras linhagens de células como as de Diptera (moscas e mosquitos), são importantes à saúde pública, sendo consideradas ferramentas fundamentais nos estudos biomédicos básicos e aplicados. Apesar do número significativo de linhagens de células que foram estabelecidas a partir de diferentes espécies, a maioria desses estudos não aborda todas as necessidades básicas variáveis e aplicadas nos campos da pesquisa, aos quais as células são necessárias (SEGURA et al., 2012).

Quando se compara o cultivo de células de mamíferos ao de insetos, as células de insetos revelam-se significativamente mais robustas quanto ao cultivo, principalmente em relação à manutenção, facilidade de adaptação na mudança de sistemas aderentes para suspensos, e principalmente por apresentarem maior resistência a estresse ambiental, como mudanças de pH e de osmolalidade (IKONOMOU et al., 2003). Células de mamíferos apresentam uma temperatura ótima para o desenvolvimento celular em torno de 37°C, enquanto que células de insetos desenvolvem-se na faixa de 27 a 29°C. O pH adequado para o bom

desenvolvimento de células de mamíferos situa-se na faixa de 6,8 a 7,8, o pH adequado no cultivo de células de insetos situa-se, geralmente, entre 6,1 e 6,4, não havendo a necessidade de acréscimo de dióxido de carbono, o que reduz a complexidade e os custos do cultivo (BATISTA, 2003).

O sucesso no cultivo de células indiferenciadas depende da remoção das células do seu microambiente natural e mantê-las em um meio de cultura tecidual diferente do seu meio de origem. Para isso, é importante ressaltar que o nicho das células tronco deve interagir com seu microambiente para poder manter suas propriedades (FUCHS et al., 2004). A formação e manutenção dos nichos de células tronco são, muitas vezes, dependentes do suporte circundante ou células do estroma e da secreção dos fatores extracelulares (PEARSON et al., 2009). Entretanto, condições particulares necessitavam de modificação e padronização para cada espécie, dependendo do tipo do explante do tecido inicial, do meio de cultura, adição de suplemento nutricional, pH, temperatura de incubação e mecanismos de remoção de células, entre outros (FRESHNEY, 1987).

Além das aplicações citadas acima, muitas outras tecnologias estão no entorno do estudo sobre obtenção e culturas de células de insetos, sejam elas totipotentes ou não. No entanto, muito ainda há por ser estudado, pois se trata do maior grupo taxonômico existente dentre todos os organismos conhecidos pela ciência. A partir desse contexto, pode-se afirmar que o cultivo celular de insetos pode exercer de maneira significativa uma possibilidade de estudos de diversas espécies em várias áreas de biotecnologia, agricultura e veterinária. Diante do exposto, identifica-se a necessidade de realização de pesquisas com esse intuito, o qual possibilitará a geração de novas alternativas para promover o controle de infestações em plantio, conservação de espécies e vetores de doenças nocivas ao homem e outros animais.

Embora existam muitas linhagens celulares estabelecidas de várias espécies da Classe Insecta, pesquisas e investigações realizadas sobre o tema do presente projeto mostraram poucas informações sobre a ordem Lepidóptera correlacionados à obtenção de células tronco embrionárias e sobre a espécie *Caligo illioneus illioneus*.

O presente estudo teve como objetivo obter células tronco indiferenciadas de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* obtidas a partir de culturas primárias

para a estabilização de um protocolo de cultivo de linhagens celulares de Lepidópteras e a sua caracterização.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *CALIGO ILLIONEUS ILLIONEUS* (CRAMER, 1776)(LEPIDOPTERA, MORPHIDAE: BASSOLINE)

Existem aproximadamente 750.000 espécies de insetos descritas, correspondem a aproximadamente 70 a 80% do Reino Animal (NETO et al., 1976; MICHAEL, 1999; STORER et al., 2003). O número de espécies e gêneros diminui com o aumento da latitude, não havendo registro para os extremos norte e sul (LEMAIRE; MINET, 1998). Possuindo 29 ordens a classe Insecta, pertence à superclasse Hexapoda e ao filo Arthropoda (COSTA et al., 2010). Na ordem Lepidóptera, mariposas e borboletas, encontram-se espécies de insetos-praga com diferentes hábitos alimentares (COSTA et al., 2010). A lagarta da borboleta, *Caligo illioneus illioneus*, conhecida como olho de coruja, é uma importante praga da bananeira e cana-de-açúcar (CLEARE, 1926).

Diversos trabalhos demonstram que o grande potencial de desfolhamento provocado pelas lagartas concentra-se no quarto e quinto instares, segundo Brown (1992). Podendo também ocorrer à penetração de patógenos na planta. Entretanto, os indivíduos adultos de lepidópteras não causam danos para a agricultura, pois se alimentam de néctar por meio do seu aparelho bucal do tipo sugador maxilar (FAZOLIN et al., 2007). Segundo Casagrande (1979) e Young; Muyschondt (1985) as espécies do gênero *Caligo* apresentam distribuição geográfica essencialmente Neotropical, sendo poucos os registros de sua localização regional. Contudo, essas espécies se encontram amplamente distribuídas na América Central e na América do Sul, ocorrendo da Costa Rica até a Argentina, e compreendem 21 espécies, reconhecidas por Srygley; Penz (1999).

A postura dos ovos é realizada na superfície adaxial e abaxial das folhas, apresentando o formato arredondado, pouco achatado no pólo superior, com 2,0 mm de diâmetro, com a coloração padrão do gênero, branco leitoso após a oviposição, torna-se acinzentado e semitransparente durante o desenvolvimento embrionário, possibilitando a visualização da cabeça da larva horas antes da eclosão (MALO;

WILLIS 1961; SOUZA et al. 2006). O cório possui número variável de carenas verticais, com média de 33 e com um máximo de 36, que partem da região micropilar no pólo superior (CLEARE, 1926; PENZ et al., 1999). Podendo ser classificados de acordo com sua coloração, sendo a cor preta, o parasitismo por *Drosófila* ou *Trichogramma spp.* (AGUIAR et al., 2010). O período embrionário (da postura do ovo à eclosão da lagarta) de *Caligo* varia de 9-14 dias dependendo da umidade relativa do ar e variações da temperatura. (MALO; WILLIS, 1961; CASGRANDE, 1979; OTERO; CASAGRANDE, 1992). A espécie *Caligo illioneus illioneus* apresenta cinco instares larvais, a lagarta recém eclodida, em seu primeiro instar mede aproximadamente 4 milímetros de comprimento, seu corpo é cilíndrico, não podendo observar-se os segmentos, corpo de coloração amarelada com quatro linhas longitudinais e de coloração carmim ou verde, apresentam cápsulas cefálicas arredondadas, de coloração marrom, recobertas por cerdas de coloração preta, sem escolos (CLEARE, 1926). Seu segundo instar é semelhante ao primeiro, exceto pelas mudanças na coloração e pela coloração dos processos anais, as cápsulas cefálicas das larvas apresentam três pares de escolos, sendo os escolos dorsais, mais pronunciados, de coloração marrom, e os outros amarelos (CLEARE, 1926). Em seu terceiro instar, as larvas possuem características semelhantes ao segundo instar, porém a diferença é o desaparecimento da coloração preta das terminações da placa suranal, o corpo apresenta projeções dorsais da cutícula recobertas por pequenas cerdas, com placa suranal da mesma cor do corpo, podemos observar a presença de quatro pares de escolos, que permanecem semelhantes até o quinto instar, exceto pela coloração destes que se torna mais clara (CLEARE, 1926). Já no quarto instar ocorre mudanças nos tons da coloração das linhas longitudinais do corpo, de marrom e verde oliva, suas cápsulas cefálicas apresentam dois padrões de coloração de creme e marrom escuro, com escolos dorsais marrons e os outros pares de escolos de coloração creme (CLEARE, 1926). A amplitude máxima do tamanho da lagarta é em seu quinto e ultimo instar pré-pulpa alcançando até 120 milímetros, a lagarta apresenta no quinto instar linhas longitudinais bem marcadas, com diferentes tons de marrom escuro, tendo a presença de cinco projeções cuticulares ao longo da linha média dorsal, situadas no quinto, sexto, sétimo, oitavo e nono segmentos sendo o sexto o maior seguimento, a placa suranal acompanha a coloração do corpo sendo mais escura e recoberta por pequenas cerdas. As

cápsulas cefálicas das larvas do quinto são semelhantes as do quarto, exceto pela coloração, e por serem densamente recobertas por pequenas cerdas (CLEARE, 1926; SOUZA, 2006; CASAGRANDE, 2008). Dependendo da aglomeração, qualidade e variação do alimento e condições climáticas o período médio da eclosão ao início da fase pupal varia de 40-69 dias (CASAGRANDE, 1979; GÓMEZ; LASTRA BORJA, 1998). As pupas apresentam coloração amarronzada, que pode ser confundida com a coloração das folhas secas, nesta espécie é observado, à presença dos orifícios genitais, que é a principal estrutura para a diferenciação sexual na fase pupal (CASAGRANDE, 1979). Os indivíduos adultos da espécie *Caligo illioneus illioneus* são borboletas grandes que apresentam dimorfismo sexual, o macho diferencia-se da fêmea pela coloração mais intensa e pela presença de área brilhante na margem interna no ângulo anal das asas posteriores (CLEARE, 1926; CASAGRANDE, 2004). Em seu dorso apresentam diferenças que evidenciam seu dimorfismo sexual, como: tamanho e forma do abdômen, presença de escamas modificadas na região dorsal das asas posteriores (CASAGRANDE, 1979).

2.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E ECOLÓGICA

Os estudos desenvolvidos com o gênero *Caligo* de lepidópteras têm sido direcionados à taxonomia (MIELKE; CASAGRANDE 2006), sistemática (WAHLBERG et al., 2003; FREITAS; BROWN JR., 2004; PENZ, 2007) e morfologia (CASAGRANDE; MIELKE, 2008; SOUZA et al., 2006), no Brasil, nenhum estudo detalhado foi realizado com *C. i. illioneus*, apesar de a espécie ser considerada uma das principais pragas da bananeira (GALLO et al., 2002).

No caso destas lagartas de lepidópteras, elas apresentam hábitos polifágicos, podendo alimentar-se de muitas espécies de plantas (KITCHING; CADIOU, 2000; CAMARGO, SCHMIDT, 2009), e possuem hábitos gregários (COSTA-LIMA, 1950; LEMAIRE, MINET, 1998). As larvas de *Caligo* consomem grande quantidade foliar principalmente em seu quarto e quinto e último instar larval, consequentemente interferindo no desenvolvimento das plantas (CASAGRANDE, 1979). Dentre as preferências alimentares, destaca-se a espécie *Heliconia* L. (Heliconiaceae), uma

planta comercializada como ornamental, de fácil adaptação, cultivo, beleza exótica e resistência pós-colheita (LORENZI, SOUZA 2001; SANTOS et al., 2006). Contudo, com a infestação das espécies do gênero *Caligo*, há uma diminuição no produto comercializado. Tendo os estudos direcionados a este gênero valiosos indicadores para o manejo das populações em desequilíbrio, como nos casos de surtos populacionais nos campos de cultivo (MARCICANO et al., 2007). Tem sido constatada a infestação de larvas de *C. i. illioneus* em plantas de *Heliconia latispatha*, plantadas próximas à cultura de bananeiras em Jaguariúna, SP, sendo a primeira observação do ataque de *C. i. illioneus* nesta espécie no país (WATANABE, 2007). Aproximadamente nove espécies do gênero *Caligo* utilizam indivíduos do gênero *Heliconia* para ovoposição e alimentação. Além da família Heliconiaceae, as larvas desfolhadoras são encontradas em outras famílias de monocotiledôneas como Arecaceae, Cannaceae, Cyclanthaceae, Musaceae, Marantaceae, Poacea e Zingiberaceae (MALO; WILLIS, 1961; SILVA et al., 1968; CASAGRANDE, 1979; ACKERY, 1988; GÓMEZ; LASTRA BORJA, 1998; PENZ et al., 1999; SOUZA et al., 2006), apresentando maior voracidade no cultivo das seguintes espécies: bananeira *Musa* spp. (CLEARE, 1926; SILVA et al., 1968; GALLO et al., 2002), *Heliconia latispatha* (WATANABE, 2007), *H. bihai* (ASSIS et al., 2002); e cana-de-açúcar *Saccharum officinarum* (GUAGLIUMI, 1972; GÓMEZ; LASTRA BORJA, 1995).

Estudos sobre o desenvolvimento embrionário, biologia, ecologia e controles biológicos de infestações têm sido muito valorizados, através da associação às práticas comuns na agricultura sustentável, contribuindo para a minimização dos riscos de intervenções no meio ambiente, decorrentes da utilização não controlada de agrotóxicos (ALTIERI et al., 2003).

2.3 CONTROLE DE PRAGAS E VETORES DE DOENÇAS

Insetos representam o maior número de espécies no reino animal. Entretanto, não é uma surpresa que a situação onde há uma competição por recursos entre algumas espécies de insetos, apresente um efeito negativo importante sobre a vida humana, sendo mais de 90% das doenças vinculadas ao homem por insetos

ocorrem nas regiões tropicais, esses insetos podem ameaçar a agricultura humana e a saúde animal, através de danos diretos, como insetos praga ou como vetores de doenças (MICHIGAN STATE UNIVERSITY, 2015). Algumas larvas de lepidópteras são de importância agrícola, por serem hóspedes de plantas nativas e por danificarem também plantas cultivadas. (GALLO, 2002; SANCHEZ-SOTO; NAKANO, 2003; BITTENCOURT et al., 2003). Já foram relatadas larvas de lepidópteras se alimentando de plantas de importância econômica como a batatinha, berinjela, corticeira, erva-mate, oliveira, pereira e, mais recentemente, a bananeira (COSTA-LIMA, 1936; SILVA et al., 1968; SANTANA et al., 2005). Outras larvas polífagas, ou seja, que se alimentam de diversas plantas, cultivadas ou não pelo homem, podem ser hospedeiras, como: cafeeiro, cajueiro, cana-de-açúcar, abacateiro, ameixeira-do-japão, amendoeira-da-praia, amoreira, araçazeiro, aroeira, aroeira-preta, aroeira-vermelha, branquilha-de-assobio, bananeira, cedro, corticeira, goiabeira, jaqueira, macieira, mamoneira, mangueira, milho, molho, pau-ferro, pereira, bananeira, roseira, salso-chorão, sarandi, tamarindeiro, mandioca, citros, assa-peixe, cafezinho tóxico, entre outras centenas de plantas de importância humana (SILVA et al., 1968; TREVISAN et al., 2004). Algumas espécies de lepidópteras apresentam um conjunto de características que despertam interesse fitossanitário, pois tem altíssimo potencial de praga agrícola: fêmeas adultas podem depositar cerca de 200 ovos na planta alimento; o estágio de larva tem duração, em média, de 34 dias; alimentam-se da folha da planta alimento, algumas espécies podem atingir mais de 20 cm de comprimento, podem ser encontradas lepidópteras com hábito gregário em grandes populações de até 150 larvas por planta alimento, consumindo toda a folhagem (PARRA et al., 2002; TREVISAN et al., 2004). Há ainda outras famílias de insetos de importância na área da medicina humana e medicina veterinária. Dentro das suas inúmeras espécies, algumas são sinantrópicas, que estão ligadas a transmissão de ovos de helmintos, oócitos de protozoários, bactérias, vírus, fungos e, ainda, produzem miíases tanto nos homens quanto em animais domésticos, em centros urbanos e periferias (BATISTA-DA-SILVA et al., 2009). Além de fatores climáticos e da flora e fauna regionais, os fatores que afetam a alimentação, oviposição e sobrevivência de uma espécie incluem determinantes ambientais que podem estar associados a ambas as atividades humanas e as alterações no uso da terra (KOIFMAN, 2001; DUARTE; FONTES, 2002;

VASCONCELOS et al., 2006; SILVA-NUNES et al., 2008; KATSURUGAWA et al., 2009). Por inúmeras décadas, os inseticidas tem sido a principal tentativa para controlar as pragas de insetos, contudo, a forte seleção natural imposta pelo uso generalizado de inseticidas, resultou na evolução de resistência em pelo menos 500 espécies (MICHIGAN STATE UNIVERSITY, 2015). Este fenômeno, por sua vez, foi causado por um aumento no uso de inseticida de baixa eficácia. Apesar da pesquisa exaustiva, apenas um número limitado de inseticidas químicos tem sido desenvolvido para a liberação comercial (WARE; WHITACRE, 2004). Esses inseticidas localizam, ainda, poucas proteínas (FFRENCH-CONSTANT, 1993; CASIDA, 2009) e apresentam toxicidade para outras espécies, importantes nos biomas. Como a grande maioria dos inseticidas atinge uma única proteína do inseto, mutações, que levam à sua modificação apropriada ou eliminação, resultam em níveis muito elevados de resistência (MOTA-SANCHEZ et al., 2002; BIELZA et al., 2007; PERRY et al., 2007; WANG et al., 2009).

Para aperfeiçoar a longevidade dos inseticidas como controle de agentes, é desejado que os seus alvos e possíveis modos de resistência sejam entendido antes do lançamento comercial (PERRY et al., 2011). Tal conhecimento prévio pode ser utilizado para parar ou atrasar a evolução da resistência, ou facilitar a melhor gestão se acaso a resistência evoluir (MCKENZIE; BATTERHAM, 1998).

Hoje o método usado para realizar o controle dos insetos é através de pesticidas a base de produtos químicos, que acabam agravando o nível de intoxicação para o próprio homem, além de agravar o nível de poluição existente. Buscando novos métodos de controle, pesquisas vindo sendo realizadas como um meio alternativo ao controle de insetos, visando o bem-estar do homem e animal. As informações geradas pelos estudos epidemiológicos fundamentam as decisões de intervenção em saúde. Nada pode ser feito em vigilância epidemiológica ou mesmo em vigilância entomológica sem a obtenção da informação, é necessário conhecer o que se tem para que a partir daí possa haver planejamento de estratégias e assim ter a ação e obtenção de resultados positivos e de caráter efetivo (PEREIRA, 2002).

No Brasil muitas pesquisas estão sendo realizadas com o uso de patógenos como é o caso do baculovírus, que causam doenças fatais em insetos. Baculovírus são partes integrantes do ecossistema e têm importância significativa na regulação da população de insetos (SANDERSON, et al., 1999).

Para estudar insetos praga e insetos vetores de doenças, é de interesse analisar as células tronco visando observar tal processo celular de caracterização. (ZAGO; COVAS, 2006). Neste sentido, a obtenção e caracterização de células tronco de insetos poderão, no futuro, condicionar, com seletividade e especificidade, alvos para o desenvolvimento e controle biológico de vetores e pragas, e seu efeito adverso nos demais elementos do ecossistema.

2.4 CÉLULAS TRONCO

Células tronco são tipos de células indiferenciadas, sem função específica nos tecidos, capazes de multiplicar-se mantendo-se indiferenciadas por longos períodos (tanto *in vitro* como *in vivo*), mas que diante de estímulos específicos podem se diferenciar em células maduras e funcionais dos tecidos. As células tronco tem a propriedade fundamental de divisão assimétrica, ou seja, ao mesmo tempo em que originam células precursoras com capacidade de diferenciação restrita a um determinado tecido, produzem células indiferenciadas que repõem a população de células tronco (ZAGO; COVAS, 2006). As características que singularizam as células tronco em relação às demais células são: a capacidade de se diferenciarem e de se converterem em distintos tecidos no organismo, e a propriedade de autorreplicação; ou seja, a capacidade que têm de produzirem cópias idênticas de si mesmas. Tais características não se manifestam com a mesma intensidade em todas as células tronco (BARROSO, 2007). Assim, células tronco são definidas como células indiferenciadas, com grande capacidade de autorrenovação e de produzir pelo menos um tipo celular altamente especializado. Existem duas categorias de células tronco: as embrionárias pluripotentes e a linhagem de células multipotentes, denominadas células tronco adultas, que residem em tecidos diferenciados (ODORICO et al., 2001).

Durante o desenvolvimento embrionário, a célula inicial divide-se até formar uma pequena esfera de células das quais cada uma, separada das outras, pode restituir um embrião inteiro, estas primeiras células embrionárias são ditas totipotentes. Em seguida, há separação entre aquilo que irá formar o embrião

propriamente dito e o que irá formar os anexos e membranas extraembrionárias, como a placenta. As células do embrião no estágio blastocisto não têm mais o potencial de formar completamente o embrião e as membranas extraembrionárias, mas cada uma delas tem o potencial de formar todos os tipos de células do organismo: elas são ditas pluripotentes e chamadas de células tronco embrionárias (FAGOT-LARGEAULT, 2004).

As células indiferenciadas ou com baixo grau de diferenciação, encontradas em tecidos embrionários e extra embrionários, podem permanecer em estado quiescente até a fase adulta, através da autorreplicação ou diferenciação em diversos tecidos, a partir da expressão de determinados genes, e exercer funções específicas (SOUZA, et al., 2003).

Segundo Watt; Hogan (2000), o termo células tronco, do inglês *stem cells*, diz respeito a células precursoras que possuem a capacidade de diferenciação e autorrenovação ilimitada, podendo dar origem a uma variedade de tipos teciduais.

Muitos tecidos, incluindo as células do sangue, pele, intestino e células germinativas são continuamente mantidos por tecido de células tronco. Sob certas condições, outros órgãos podem ser reparados utilizando células tronco progenitores gerados através de desdiferenciação (KAI; SPRADLING, 2004).

A regulação do nicho tem sido um dos conceitos chave a emergir no entendimento da autorrenovação das células tronco (SPRADLING et al., 2001; FUCHS et al., 2004; NYSTUL; SPRADLING, 2007). Um nicho de células tronco tem sido definido como “um local específico no qual as células tronco podem residir por um período indeterminado e produzir células descendentes, enquanto ocorre autorrenovação” (OHLSTEIN et al., 2004). No sentido mais restrito, isso significa que uma região na qual é mantida estável, mesmo na ausência de células tronco (OHLSTEIN et al., 2004). O controle do nicho das células tronco pode ser realizado por mecanismos homeostáticos que controlem o potencial proliferativo das células tronco, ainda, proporcionando a plasticidade tão necessária às respostas das mudanças de condições (PEARSON et al., 2009).

2.5 CÉLULAS TRONCO DE INSETOS

As tentativas iniciais dos cultivos de células de insetos tinham enfoques muito diferentes dos atuais. O interesse pela cultura celular estava no estudo da fisiologia do inseto, como por exemplo, estudos da gametogênese, morfogênese e diferenciação, seguidos do estudo da atuação de hormônios em insetos, dentre outros. Cogitou-se o uso de células de insetos como hospedeiras para o cultivo de parasitas (CESTARI; SIMÕES, 1978). Tendo também o interesse nas células de inseto a perspectiva da produção de inseticidas seletivos como uma alternativa ecologicamente importante ao uso de compostos químicos para o controle de pragas.

Posteriormente, o atrativo destas células passou a ser o desenvolvimento de vetores de baculovírus para a alta expressão de genes heterólogos (AGUILAR, 2010). Identificadas por Goodman et al. (2001), algumas dessas linhagens de células estabelecidas foram susceptíveis à baculovirose. Desde então o número de pesquisas com insetos tem aumentado consideravelmente, sendo do filo dos artrópodes o maior grupo de pesquisa na atualidade (FORRATTINI, 2002).

O primeiro estudo que obteve cultura de linhagem de célula de um Artrópode foi realizado por Grace (1962), que estudou a pupa de um inseto, mais precisamente da mariposa australiana *Antheraea aeucalypti* (SCOTT, 1864). Cinquenta anos após este evento, já foram estabelecidas mais de 500 linhas de células e cerca 260 destas foram obtidas de 60 espécies de Lepidoptera (LYNN, 2000; LYNN, 2001). Vários tecidos têm sido utilizados com êxito para o desenvolvimento de cultura de células, dentre eles os do ovário, de hemócitos, tecido adiposo, intestino médio, cutícula, tecido nervoso, sistema endócrino e tecido muscular (LYNN, 2001).

Muitas aplicações são dadas as linhagens de células de insetos obtidas através de culturas, as que se destacam são a utilização como ferramenta de investigação em virologia, em estudo de mecanismos de sinalização, expressão gênica e na produção de inseticidas com maior eficiência específica (SMAGGHE et al., 2009).

Estudos em *Drosophila* têm resultados que identificam inúmeras populações de células tronco (DOE et al., 1998; FULLER; SPRADLING, 2007; KIRILLY; XIE,

2007). Entre elas a retenção de células tronco germinativas durante a maior parte de sua vida adulta (SPRADLING et al., 2001), armazenadas no testículo (MATUNIS et al., 2012), ovário (WONG et al., 2005; KIRILLY; XIE, 2007) e intestino (MICCHELLI; PERRIMON, 2006; OHLSTEIN; SPRADLING, 2006). Esse modelo de nicho mostrou que é uma base valiosa para estudos das células tronco em várias espécies, com inúmeras populações de células tronco, que parecem ser mantidas em nichos com propriedades semelhantes (FUCHS et al., 2004). Durante a obtenção dessas células, foram identificadas características importantes na geração específicas de tecidos e de estruturas, entre elas as células tronco neurais, o neuroblasto (YU et al., 2006) e hematopoiéticas (CROZATIER; MEISTER, 2007; MARTINEZ-AGOSTO et al., 2007).

A população de células tronco da *Drosophila* é um modelo potencial para melhor compreensão da autorrenovação das células tronco, nichos celulares, vias de sinalização e divisão assimétrica (PEARSON et al., 2009), especialmente o modelo linfático nas células obtidas em estágios larvais (KRZEMIEN et al., 2007; MANDAL et al., 2007). A maioria das linhagens de células de insetos foi reportada de tecidos indiferenciados (GOODMAN; MCINTOSH, 1994). Entretanto, foram descritas algumas linhagens de células diferenciadas, tais como a de hemócitos (MILTENBURGER et al., 1984) e tecidos nervoso (UI et al., 1994), epitelial (LYNN; OBERLANDER, 1983) e adiposo (MITSUHASHI, 1984; GOODMAN et al., 2001).

Como citado no início, outros trabalhos de linhagens de células de insetos investigaram as interações entre a célula e o vírus. Entre eles houve a aplicação dessas linhagens de células para produção em massa de pesticidas virais, como o baculovírus (GOODMAN; MCLINTOSH, 1994; MURHAMMER, 1996; BLACK et al., 1997) e o arbovírus (REY et al., 2000).

Numerosas linhagens de células, obtidas de pragas de insetos, com importância agrícola, foram estabelecidas com o propósito primário de estudar ou aperfeiçoar a produção do baculovírus (MCINTOSH; IGNOFFO, 1981; GELERNTER; FEDERICI, 1986; LYNN; SHAPIRO, 1998; MCKENNA et al., 1998; KARIUKI et al., 2000).

Atualmente, existem relatos na literatura com estudos de células tronco de insetos do gênero *Drosophila*, que possui na extremidade anterior do ovário uma estrutura chamada germário, que abriga as linhagens germinativas e célula tronco

somáticas. No germário, as células germinativas dividem-se assimetricamente e dão origem a cistoblastos (SPRADLING, 1997).

Em insetos adultos do gênero *Drosophila* como modelo experimental, o intestino médio é mantido por células tronco pluripotentes (OHLSTEIN; SPRADLING, 2006). O ovo de *Drosophila* é constituído por dois tipos de células: células germinativas e células foliculares da linhagem somáticas (ROTH, 2001). O estudo com células tronco de *Drosophila* também forneceu uma visão sobre o mecanismo pela qual uma população saudável de células tronco é mantida ao longo de sua vida adulta. Vários temas surgiram dos estudos envolvendo células tronco de *Drosophilas* do folículo do ovário (FSC) e de células tronco intestinais (ISC) do intestino médio posterior, a partir desses estudos pode-se notar que estas células podem ativar vias como a via do fator de crescimento e da epiderme, renovando assim tecidos epiteliais de mamíferos (SAHAI-HERNANDEZ, et al., 2012). O interesse em células de insetos para a produção de proteínas complexas se deve a sua maior facilidade de cultivo e ao padrão equivalente de glicosilação quando comparado aos sistemas com células de mamíferos.

2.6 CULTURA DE CÉLULAS TRONCO DE INSETOS

As primeiras tentativas de se cultivar células de insetos ocorreram aproximadamente em 1915, sendo que até 1959 ainda não se havia conseguido uma linhagem permanente de células, observando-se apenas o crescimento e a sobrevivência de prolongamentos de tecidos (GRACE, 1959).

A principal dificuldade estava na inexistência de uma formulação de meio de cultivo adequado que permitisse a manutenção celular *in vitro*. Trabalhos realizados neste campo, como o desenvolvido por Wyatt (1961) sobre a bioquímica da hemolinfa (fluido circulatório de insetos) e mais recentemente por Maranga et al. (2003), viabilizaram o desenvolvimento de meios de cultura nos quais as células de insetos se desenvolvem com maior eficiência, e rapidamente as células de insetos passaram a ser muito interessante por produzirem proteínas complexas com

precisão e usem um meio de cultura mais simples que as células de mamíferos (AGUILAR, 2010).

O uso dessas linhagens de células na produção em larga escala de pesticidas ou de proteínas recombinantes envolve a suspensão da cultura com condições com meio ausente de soro (GOODMAN; MCINTOSH, 1994; MURHAMMER, 1996; BLACK et al., 1997). Outros estudos demonstraram que as linhagens iniciais de células de insetos indiferenciadas também podem ser cultivadas na ausência de soro (STILES et al., 1992; MCKENNA et al., 1998). Entretanto, alguns tipos celulares não obtiveram sucesso no estabelecimento da cultura quando havia a ausência de soro, estudos futuros adicionou rotineiramente o soro ao meio. Goodman et al. (2001) citaram que a provável ausência de sucesso seja pela utilização de tecidos larvais diferenciados pelas iniciações originais, apesar de identificarem linhagens de células a partir do tecido reprodutivo em meio ausente de soro.

Goodman et al. (2001) estabilizaram e caracterizaram 36 linhagens de células de insetos de 10 espécies do gênero Lepidóptero. A maioria dessas células foi gerada do tecido embrionário ou tecido reprodutivo, embora algumas linhagens de células tenham sido estabelecidas a partir de tecidos diferenciados no estágio larval ou estágio adulto. Dentro das 36 linhagens de células identificadas, 13 foram adaptadas ao meio sem soro, somada à adaptação da redução do meio em três linhagens. Em sequência, duas linhagens de células cresceram bem em cultura de suspensão, possivelmente com a utilização de biorreatores de suspensão.

Quando se iniciou a cultura de células em insetos, a metodologia utilizada era similar à estabilização da cultura celular de mamíferos (HSU et al., 1972). Entretanto, condições particulares necessitavam de modificação e padronização para cada espécie, dependendo do tipo do explante do tecido inicial, do meio de cultura, adição de suplemento nutricional, pH, temperatura de incubação e mecanismos de remoção de células, entre outros (FRESHNEY, 1987).

O sucesso no cultivo de células indiferenciadas depende da remoção das células do seu microambiente natural e mantê-las em um meio de cultura tecidual diferente do seu meio de origem. Para isso, é importante ressaltar que o nicho das células tronco deve interagir com seu microambiente para poder manter suas propriedades (FUCHS, et al., 2004). A osmolaridade pode variar no decorrer do crescimento como resultado de fatores como o acúmulo de produtos metabólicos, a

adição de agentes antiespumantes, a alimentação de nutrientes, etc. O emprego de meios com osmolaridade superior a 400mOsm/kg costuma resultar em forte estresse osmótico para as células (TONSO, 2000).

Dentre os diversos meios de cultivo que podem ser empregados no desenvolvimento e proliferação de células de insetos, destaca-se o meio Grace. Este meio, quando adequadamente suplementado com soro fetal bovino, pode ser empregado na cultura de células de insetos, exemplos Lepidópteros e Dípteros (BATISTA, 2003). Este meio apresenta elevada quantidade de carboidratos (27g/L de sacarose), empregados na manutenção adequada da pressão osmótica do meio, de cerca de 300mOsm/kg. Isso mostra que as células de inseto podem também tolerar altas concentrações de açúcares. Os meios de cultura são formulados normalmente para apresentar valores entre 260 a 330mOsm/kg.

Os efeitos dos suplementos, concentração de extrato de levedura e a concentração do concentrado proteico de soro de leite bovino ao meio Grace foram avaliados com o intuito de se minimizar o percentual de soro fetal bovino, estudou-se também o efeito da concentração de glicose, concentração de Pluronic F68, um detergente não iônico que protege as células contra danos hidrodinâmicos, no crescimento e na viabilidade celular. A seleção dos níveis das variáveis independentes na estratégia de planejamento fatorial fracionário preliminar foi baseada em análise de literatura pertinente. Nestas, variou-se a concentração de extrato de levedura de 0 a 8 g/L (DREWS et al., 1995, WU et al., 1998), a concentração de glicose de 1,8 a 2,7 g/L (MENDONÇA et al., 1999, WANG et al., 1993), a concentração de Pluronic F68 de 0 a 0,2%(m/v), a concentração de concentrado proteico de soro de leite bovino de 0 a 5% (m/v) e a concentração de soro fetal bovino de 1 a 3% (VAN DER POL; TRAMPER, 1998).

O cultivo de células de inseto apresenta vantagens em relação à obtenção *in vitro* de vírus para bioinseticida, o que proporciona um controle melhor ambientalmente bem como condições fisiológicas, maior homogeneidade da amostra e economia global, destacando-se também a mais fácil caracterização da amostra. Entretanto, ao contrário de alguns microrganismos, as células de inseto não são capazes de sobreviver de maneira independente em um ambiente que não conserve as condições do tecido original do qual as mesmas são obtidas, o que aumenta a

complexidade no entendimento das necessidades do sistema e no diagnóstico de problemas.

Em adição, é válido ressaltar que o cultivo *in vitro* de células de insetos deve ser realizado de forma criteriosa, mantidas as condições assépticas, principalmente porque estas células crescem mais lentamente que contaminantes como fungos e bactérias (BATISTA, 2003). Células de insetos, geralmente, são cultivadas em suspensão. Em vista disto, não necessitam de suporte sólido, desenvolvendo-se livremente no meio de cultura (BATISTA, 2003).

3 JUSTIFICATIVA

Embora existam muitas linhagens celulares estabelecidas de várias espécies da Classe Insecta, nossas pesquisas e investigações realizadas sobre o tema do presente projeto demonstra o escasso número de informações sobre insetos da ordem Lepidóptera, especificamente correlacionados à obtenção e caracterização de células tronco embrionárias indiferenciadas da espécie *Caligo illioneus illioneus*.

Estudos demonstram que os notáveis avanços na utilização de células de insetos podem facilitar a adaptação para o crescimento em culturas em suspensão, permitindo que estas sejam ferramentas importantes para estudos nas áreas das ciências biológicas e biomédicas.

Um completo entendimento da expressão de marcadores e dos fatores ou condições de cultura de células tronco embrionárias a médio e longo prazo sem comprometer sua pluripotência e suas características genéticas é muito importante para produção e manutenção de células tronco embrionárias de diferentes espécies de animais. Dessa forma, obter e caracterizar células tronco embrionárias de espécies da fauna brasileira é o primeiro passo para estabelecer um conjunto de conhecimentos com altíssimo potencial para a compreensão dos fatores relacionados à conservação da fauna brasileira, patogenicidade, controle biológico de pragas e a produção de proteínas recombinantes com importância na medicina, medicina veterinária e ciências agrárias.

4 OBJETIVO

4.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo obter e caracterizar células tronco indiferenciadas de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* obtidas a partir de culturas primárias para a criação e estabilização de um protocolo de culturas celulares de Lepidópteras e armazenamento em nitrogênio líquido para a criação de um banco de células de insetos. Apresentar e descrever a morfologia externa dos ovos de *Caligo illioneus illioneus*, diferenciando esta subespécie das outras presentes em seu gênero através de suas ultraestruturas presentes no cório do ovo.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter massas de ovos embrionados específicos de *Caligo illioneus illioneus*;
- Analisar os aspectos morfológicos dos ovos embrionados por microscopia eletrônica de varredura;
- Descrever as ultraestruturas presente no cório do ovo;
- Estabelecer um protocolo de cultivo de células tronco indiferenciadas para lepidópteras em meio de cultivo específico;
- Cultivar as células tronco, em culturas primárias e subculturas, para expansão e armazenamento em nitrogênio líquido. (constituição de um banco de células tronco);
- Analisar a expressão específica de células tronco por citometria de fluxo e de marcadores de pluri e totipotência.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a elaboração e produção desta pesquisa, foram utilizados ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* em quatro períodos gestacionais, sendo respectivamente quatro, três, dois e um dia para a eclosão. Todo o desenvolvimento do projeto esta de acordo com as normas do comitê de bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), conforme o número de protocolo N° 2931/2013.

5.1 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

Os ovos foram coletados pelo biólogo Sandro Eduardo Bezerra Santana, CRBio 61636/01-D, chefe da Divisão de Educação Ambiental do Borboletário de Diadema Laerte Bristtes de Oliveira, Secretaria Municipal do Meio Ambiente, coletados a partir da postura observada da espécie *Caligo illioneus illioneus* associados na superfície adaxial e abaxial das folhas de Heliconeas (Heliconeaceae), (Viveiro de borboletas de 190m²), do Jardim Botânico de Diadema, localizado na cidade de Diadema, São Paulo, Brasil, 23.719185"S, 46.610369"W. Após a coleta, os ovos foram acondicionados em temperatura ambiente e transportados em placas de Petri estéreis até o Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan para a análise do padrão de coloração de acordo com o desenvolvimento, mensuradas as suas dimensões e foto documentados e o processamento do material biológico para a obtenção das células.

5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Foram utilizados para a análise morfológica 28 ovos coletados a partir da postura observada da espécie *Caligo illioneus illioneus* associados na superfície

adaxial das folhas de *Heliconias* (*Heliconiaceae*), realizou-se a lavagem dos ovos com solução de Tampão fosfato, PBS (phosphate buffered saline) 1X por duas vezes consecutivas durante 10 minutos, em seguida, adicionado o fixador glutaraldeído a 2.5% tamponado com fosfato de sódio a 0.1 M e pH 7.4.

Após 24h, tempo necessário de fixação, os ovos foram lavados em PBS 1X e água destilada, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% tamponado com fosfato de sódio a 0.1 M e pH 7.4, e desidratados em uma série gradual de etanol. A secagem do material foi realizada em aparelho de ponto crítico, usando CO₂. Após a secagem, os ovos foram recobertos com cobertura metálica (ouro) por “sputtering” e após o término do processamento, o material foi analisado no microscópio eletrônico de varredura, modelo FEI QUANTA 250. Os aspectos ultraestruturais e morfológicos foram observados e aferidos pelas imagens obtidas no microscópio eletrônico de varredura e sua barra micrométrica inserida.

Para a descrição dos ovos, utilizou-se a nomenclatura proposta e utilizada por Dell'Erba et al. (2005).

5.3 CITOLOGIA

Com a cultura celular confluenta, foi coletado do meio de cultura com as células em suspensão 10µl por amostragem. As lâminas estéreis para microscopia foram lavadas com álcool 70% e a amostra distribuída sobre as lâminas e o material deixado para secar em temperatura de 22°C. Após o meio de cultura com as células secas sobre a lâmina, foram submersas 5 vezes no corante panótico nº1 (Kit-LB/Laborclin) contendo solução de triarilmetano a 0,1% durante 5 segundos, ao fim do processo deixando escorrer bem o excesso. Posteriormente as lâminas foram submersas 5 vezes no corante panótico nº2 (Kit-LB/Laborclin) contendo solução de xantenos a 0,1% durante 5 segundos, ao fim do processo deixando escorrer bem o excesso. Por fim as lâminas foram submersas 5 vezes no corante panótico nº3 (Kit-LB/Laborclin) contendo solução de tiazinas a 0,1% durante 5 segundos (1 segundo por submersão), ao fim do processo deixou-se escorrer bem o excesso. Após a aplicação dos corantes panóticos as lâminas foram lavadas com água deionizada

recente (tamponada a pH 7,0), colocadas para secar em estufa a 22°C, em posição vertical e com a amostra voltada para cima. As lâminas encontravam-se prontas para leitura ao final da secagem.

5.4 CULTURA PRIMÁRIA DA MASSA DE OVOS EMBRIONADOS

Os ovos de *Caligo illioneus illioneus* foram coletados e depositados em placa de Petri estéril e após a coleta, acondicionados em geladeira a 5°C. Posteriormente, os ovos foram lavados com solução Tween a 20% e 10% por duas vezes respectivamente, agitando-se bem antes de cada lavagem, objetivando-se a retirada da camada de sujeira que se encontrava sobre os ovos. O estabelecimento de três protocolos foi produzido, o que demonstrou ser o mais funcional no cultivo celular e na viabilidade das células: Quando o material biológico obtido do tecido embrionário retirado para cultura foi composto por cerca de 3 a 4 ovos. Os ovos foram separados manualmente com o auxílio de uma pinça estéril dentro de uma câmara com fluxo laminar.

Separados por tempos gestacionais em grupos de: 4 dias para a eclosão, 3 dias para a eclosão, 2 dias para a eclosão, 1 dia para a eclosão. Após a separação, os ovos foram refrigerados a temperatura de 5°C por 6 horas. Os ovos foram colocados em um cadinho porcelanado estéril e imersos em Anfotericina B durante 5 minutos, posteriormente realizadas 4 lavagens com 5 mL de PBS suplementado 1mL de Anfotericina B, sendo agitadas repetidamente por 5 minutos em cada lavagem. Após os ovos foram lavados três vezes com meio de cultura DMEM-High (Gibco) suplementado com 2% de Anfotericina B.

O rompimento das cascas dos ovos foi realizado manualmente, através da maceração mecânica com a utilização do embolo de seringa estéril em adição de 5 mL de meio de cultura DMEM-High suplementado com 25% de soro fetal bovino (SFB), 5% de piruvato de sódio e 2% de antibiótico (Anfotericina, Estreptomicina, Gentamicina e Penicilina).

O material biológico extraído dos ovos em suspensão no meio foi acondicionado em garrafas de cultura celular de 10 cm², em estufa estéril, com variação de temperatura de 22 a 25° C sem adição de CO₂.

Para a avaliação do melhor meio de cultura a suspensão celular foi centrifugada, e lavada nos diferentes tipos de meio de cultura: Grace, MEN/ALFA, DEMEN-High e DEMEN. Todos suplementados com 25% de SFB, 5% de piruvato de sódio e 2% de antibiótico. Posteriormente, foram acondicionados em estufa estéril por 48 horas, com temperatura de 22 a 25°C sem CO₂, para o estabelecimento da melhor condição de obtenção, rendimento e expansão dos clones celulares. As células isoladas, foram colocadas em garrafas de cultura de 10cm², contendo 5 mL de cada respectivo meio de cultura com o pH de cada meio ajustado entre 6,4 e 6,9.

5.5 SUBCULTURAS

Pelo fato da cultura celular não ser aderente do substrato da garrafa de cultura, não há a necessidade da remoção mecânica para a ruptura das monocamadas e não há necessidade da cultura ser tripsinizada.

As células na garrafa de cultura foram ressuspensas, misturadas vigorosamente por pipetagem e a solução retirada e transferida para tubos Falcon estéreis de 15 mL. Centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm, posteriormente o sobrenadante foi descartado, o pellet restante da centrifugação lavado com solução de lavagem contendo 10% de antibiótico (Gentamicina, Estreptomicina, Penicilina e Anfotericina B) e 90% de PBS, centrifugado novamente por mais 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante da lavagem foi descartado, e com o pellet restante realizada a expansão de subculturas que foram passadas na proporção de 1:3. Nos 3 novos frascos de cultura celular estéreis de 10 cm², foi transferido o material biológico e adicionado 5 mL de cada tipo de meio de cultura celular estéril fresco: MEN/ALFA, DEMEN-High ou DEMEN; suplementados com 10% de SFB, 2% de antibiótico e por sua vez o piruvato não foi utilizado nas subculturas por demonstrar não ser mais necessário. As subculturas foram mantidas em temperatura de 22 a 25°C em estufa

sem adição de CO₂. Todas as passagens foram realizadas na proporção de 1:3 para cada subcultura com uma duração média de 4 a 5 dias entre cada passagem.

5.6 CARACTERIZAÇÕES DA MORFOLOGIA CELULAR

Para a caracterização da morfologia celular as culturas foram observadas e fotografadas utilizando microscópio invertido NIKON ECLIPSE TS-100 com fase de contraste "Leitz" no aumento de 40 a 1000 vezes de ampliação. A cultura celular foi observada e foto registrada a cada 24 horas do cultivo.

5.7 CONGELAMENTO E ARMAZENAMENTO

Foram interrompidas as culturas semiconfluentes em suspensão (~70%), retiradas dos frascos de cultura celular por pipetagem e transferidas para tubos Falcon de 15 mL, sendo centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet restante foi acondicionado em meio de congelamento contendo (50% meio de cultura Grace, 40% soro fetal bovino e 10% dimetilsulfóxido-DMSO).

As células suspensas foram acondicionadas em criotubos estéreis e refrigeradas a -20°C por 80 minutos, congeladas a -80°C durante 12 horas, antes do armazenamento permanente em nitrogênio líquido em container a -190°C. Esse material está mantido e estocado no banco de células pelo Professor Doutor Durvanei Augusto Maria (Laboratório de Bioquímica e Biofísica, Instituto Butantan).

5.8 ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR

Para a realização das análises das fases do ciclo celular foram utilizadas aproximadamente um milhão de células por amostragem; utilizaram-se amostras em triplicatas. As células em cultivo foram retiradas por pipetagem dos frascos de cultura, transferidas para tubos Falcon de 15 mL e centrifugadas durante 10 minutos a 1500 rpm, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 1 mL de tampão para citometria FACSFlow BD. Novamente as células foram centrifugadas durante 3 minutos a 2000 rpm e descartado o sobrenadante. As células foram cuidadosamente ressuspensas em 1 mL de etanol 70% RNase (invitrogen, 10777-019, concentração 0,3 mg/mL) e transferidas para microtubos e armazenadas a uma temperatura de -20°C.

Posteriormente para a leitura acrescentava-se 10 µL de Triton X e 5 µL de Iodeto de Propídeo 1,8 µg/mL (Sigma, P4170, 1 mg/mL). As amostras foram envoltas por papel alumínio e levadas para leitura no Citômetro de Fluxo FACS Calibur e analisadas pelo programa Modfit 2.9.

5.9 ANÁLISES DE MARCADORES POR CITOMETRIA DE FLUXO

Após o crescimento e expansão celular, as células em cultura foram tripsinizadas e inativadas com soro bovino, o material acondicionado em criotubos de 1,5 mL em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada com álcool 70% e ultravioleta durante 20 minutos.

Em seguida centrifugado à 1700rpm durante 10 minutos, para a formação do precipitado celular. Após a centrifugação, foi descartado o sobrenadante e acrescentado o tampão FACSFlow BD contendo 1% de BSA. A suspensão foi transferida para tubos de citometria, e adicionados os anticorpos específicos.

Os anticorpos específicos utilizados para a determinação da origem das células tronco, potencial proliferativo e morte celular foram: Anti RAB 5 (1:100 rabbit-polyclonal, abcam ab: 31261); Anti GM 130 (1:100, rabbit-polyclonal, abcam ab:

30637); Anti drosófila FMR1 (1:100, mouse-monoclonal abcam ab: 10299); Anti-Axons BP102 (1:100, mouse-monoclonal abcam ab: 12455); Caspase 3 (1:100, mouse-monoclonal Santa Cruz, sc 271759); Stro-1 (1:100, Mouse-monoclonal Santa Cruz IgG-sc47733); Sox2 (1:100, goat polyclonal,y-17 Santa Cruz sc 17320); Oct 3/4 (1:100, rabbit-policlonal abcam ab: 137427); CD117 (1:100 mouse-monoclonal stemcell Clone ACK2); Vimentina (1:100, mouse monoclonal Leica Biosystems antibody: RTU-Vim V9); HSP70 (1:100, mouse-monoclonal, SAS antibody abcam ab: 2787); CD90 (1:100, mouse-monoclonal, Santa Cruz sc 53456).

A expressão dos receptores de superfície e marcadores celulares foram realizados em Citômetro de Fluxo FACS Calibur e analisadas pelo programa WinMdi 2.9, tendo como parâmetros FSC (tamanho) e SSC (granulosidade/complexidade), em escala linear, e FL1 e FL2, em escalas logarítmicas, que detecta a fluorescência da reação antígeno/anticorpo conjugado à PE ou FITC. A expressão destes marcadores foi determinada pela comparação com um isótopo controle marcada com o fluorocromo FITC inespecífico.

5.10 ANÁLISE DO POTENCIAL ELÉTRICO MITOCONDRIAL

Foi utilizado o fluorocromo Rodamina 123 (Invitrogen), as células foram tripsinizadas, transferidas para falcom estéril de 15 mL e centrifugadas a 1500 rpm, por 10 minutos, o sobrenadante descartado e adicionado 5 µL de Rodamina 123 (5 mg/mL). A seguir, as células foram incubadas em a 28° C, sem CO₂ por 40 minutos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspendido em 10µL de solução tampão para citometria FACSFlow BD. A análise da marcação com a Rodamina 123 nas células tronco embrionárias foi realizada em citômetro de fluxo FACS CALIBUR pela aquisição de 10.000 eventos. Os dados foram analisados pelo programa WinMdi versão 2.9.

5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software Graphpad Prism 5. Os valores expressos em média $\pm$ desvio padrão, considerando-se como valores com um nível de significância em 5%.

6 RESULTADOS

6.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE *CALIGO ILLIONEUS ILLIONEUS*

Os ovos da subespécie *Caligo illioneus illioneus* obtidos no Borboletário Tropical Conservacionista Laerte Brittes de Oliveira de Diadema foram coletados logo após a postura pela fêmea (Figura 1- A) em superfícies adaxial e abaxial (Figura 1- C) de folhas de *Heliconias*, e observados agrupamentos de 3 a 7 ovos (Figura 1- E), em poucas ocasiões agrupamentos de 3 e 9 ovos (Figura 1- B e D). Ovos de coloração escura parasitados por *Drosófilas* (Figura 1- D seta branca), perfurações nos ovos parasitados (Figura 1- E), presença de *Drosófilas* perto dos ovos de *Caligo illioneus illioneus*, (Figura 1- D seta preta).

Figura 1 – Fotos de agrupamentos de ovos ovipostos por *Caligo illioneus illioneus*

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Fotos de agrupamentos de ovos ovipostos por *Caligo illioneus illioneus* em *Heliconias*: A= Oviposição; B= Ovos recém ovipostos; C = Folha Maternidade (Folha com grande número de ovos); D= Em destaque seta branca ovo parasitado por Drosófila, em destaque por seta preta Drosófila; E= Ovos parasitados por Drósófila (Em destaque orifícios feitos pelas Drosófilas para a sua oviposição e parasitismo). Barras: A- 3cm; B- 2mm; C- 3cm; D- 4mm; E- 2mm.

Os ovos logo após a oviposição apresentaram coloração branco leitoso (Figura 2- A). Ovos no final do período embrionário apresentaram a coloração marrom ou carmim (Figura 2- B) e ovos de coloração preta demonstraram estar parasitados por Drosófilas (Figura 2- C).

Figura 2 – Ovos de *Caligo illioneus illioneus*

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Fotos de ovos de *Caligo illioneus illioneus*, vista do polo superior: A= Ovo recém oviposto; B= Ovo no final do período embrionário (Capsula cefálica indicado por seta preta); C= Ovo parasitado por *Drosófila*.

Barras: A- 1mm; B- 1mm; C- 1mm.

Após a eclosão dos ovos, as lagartas no primeiro instar apresentaram média de $5\text{ cm} \pm 1,2\text{ mm}$, coloração branca e listras marrons no dorso (Figura 3- B), podendo ser observado a presença de cerdas escuras na cápsula cefálica (Figura 3- A).

Figura 3 – Primeiro instar da lagarta de *Caligo illioneus illioneus*

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Fotos de lagarta de *Caligo illioneus illioneus* no primeiro instar: A= Destaque da cápsula cefálica da lagarta em seu primeiro instar; B= Lagarta em seu primeiro instar, posição dorsal.

Barras: A- 500µm; B- 1mm.

Em seu segundo instar, a lagarta apresentou média de $3\text{ cm} \pm 86\text{ mm}$, coloração verde clara após a sua alimentação (Figura 4- B), podendo ser observado a presença de três pares de escolos em sua cápsula cefálica (Figura 4- A).

Figura 4 – Segundo instar da lagarta de *Caligo illioneus illioneus*

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Fotos de lagarta de *Caligo illioneus illioneus* no segundo instar: A= Destaque da cápsula cefálica da lagarta em seu segundo instar; B= Lagarta em seu segundo instar, posição dorsolateral.

Barras: A- 1mm; B- 2mm.

No terceiro instar das lagartas de *Caligo illioneus illioneus* seu corpo apresentou média de $4,5 \text{ cm} \pm 1 \text{ cm}$, possuindo projeções dorsais recobertas por cerdas (Figura 5- B), sua cápsula cefálica apresentou quatro pares de escolos (Figura 5- A).

Figura 5 – Terceiro instar da lagarta de *Caligo illioneus illioneus*

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Fotos de lagarta de *Caligo illioneus illioneus* no terceiro instar: A= Destaque da cápsula cefálica da lagarta em seu terceiro instar; B= Lagarta em seu terceiro instar, posição dorsal.

Barras: A- 3mm; B- 5mm.

Observou-se a presença de linhas longitudinais de coloração verde oliva e marrom na lateral da lagarta de *Caligo illioneus illioneus* no quarto instar (Figura 6- C), uma linha longitudinal de coloração verde em seu dorso (Figura 6- B), a lagarta

apresentou média de 6,3 cm $\pm$ 1,2 cm, possuindo o par de escolos dorsais de coloração marrom e os demais escolos de coloração creme (Figura 6- A).

Figura 6 – Quarto instar da lagarta de *Caligo illioneus illioneus*

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Fotos de lagarta de *Caligo illioneus illioneus* no quarto instar: A= Destaque da cápsula cefálica da lagarta em seu quarto instar; B= Lagarta de *Caligo illioneus illioneus* em seu quarto instar, posição dorsal; C= Lagarta em seu quarto instar, posição lateral. Barras: A- 2,5mm; B- 1cm; C- 1cm.

Em seu quinto e último instar, a lagarta de *Caligo illioneus illioneus* apresentou média 11,5 cm $\pm$ 1,6 cm, com linhas longitudinais bem marcadas em coloração de marrom escuro (Figura 7- B e C), tendo cinco projeções cuticulares na linha dorsal média (Figura 7- B e C), a cápsula cefálica apresentou grande quantidade de cerdas (Figura 7- A).

Figura 7 – Quinto instar da lagarta de *Caligo illioneus illioneus*

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Fotos de lagarta de *Caligo illioneus illioneus* no quinto instar: A= Destaque da cápsula cefálica da lagarta em seu quinto instar; B= Lagarta de *Caligo illioneus illioneus* em seu quinto instar posição dorsal; C= Lagarta em seu quinto instar, posição lateral. Barras: A- 4mm; B- 1cm; C- 1cm.

As pupas apresentaram coloração em tons de marrons (Figuras 8- A, B e C), sendo descrita uma estrutura prismática em sua lateral (Figura 8- B, seta). Presença de orifício genital, sendo a pupa da figura 8-D macho, possuindo o orifício genital mais curto e a pupa da figura 8-E fêmea, possuindo o orifício genital mais alongado.

Figura 8 – Pupa de *Caligo illioneus illioneus*

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Fotos da pupa de *Caligo illioneus illioneus*: A= Pupa, posição ventral; B= Pupa, posição lateral (seta em estrutura prismática); C= Pupa, posição dorsal; D= Orifício genital masculino; E= Orifício genital feminino.
Barras: A- 1cm; B-1cm; C- 1cm; D- 5mm; E- 5mm.

Os adultos de *Caligo illioneus illioneus* apresentaram coloração padrão da espécie, azul no dorso das asas (Figura 9- B) e padrões manchados de marrom no ventre das asas (Figura 9- A).

Figura 9 – Adulto de *Caligo illioneus illioneus*

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Fotos de adultos *Caligo illioneus illioneus*: A= Borboleta *Caligo illioneus illioneus*, posição ventral; B= Borboleta *Caligo illioneus illioneus*, posição dorsal.
Barras: A- 5cm; B-5cm.

Os indivíduos adultos da espécie *Caligo illioneus illioneus* apresentaram dimorfismo sexual, o macho (Figura 10- A) possui o abdômen relativamente mais estreito do que a fêmea (Figura 10- B). O macho apresentou escamas modificadas na margem interna do ângulo anal das asas posteriores indicado por seta na figura 10-C, enquanto, a fêmea não possui essa estrutura e apresenta seu abdômen mais delgado (Figura 10- D) do que o macho.

Figura 10 – Dimorfismo em adultos de *Caligo illioneus illioneus*

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Fotos do dimorfismo sexual de *Caligo illioneus illioneus*: A= Macho, posição dorsal; B= Fêmea, posição dorsal; C= Abdômen do macho, posição lateral (Escamas modificadas no abdômen em destaque por seta preta); D= Abdômen da fêmea, posição lateral.

Barras: A- 1cm; B-1cm; C- 1cm; D- 1cm.

Relatamos a presença de alterações no formato da coloração padrão da espécie nas asas, do lado ventral, na estrutura que possui a forma de um olho, a qual nomeia popularmente a espécie. Alteração que denominamos como “lágrima”, nota-se o surgimento de um ponto amarelado, o qual gradativamente torna-se cada vez maior como demonstrado e indicado por seta subsequente nas figuras 11 A, B, C, D, E e F.

Figura 11 – Alteração da forma e coloração das asas de *Caligo illioneus illioneus*

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Fotos A; B; C; D; E e F: estrutura “Olho” nas asas, posição ventral (Surgimento da estrutura denominada “Lágrima” em destaque por seta branca).

Barras: A- 2,5cm; B-2,5cm; C-2,5cm; D- 2,5cm; E- 2,5cm; F- 2,5cm.

6.2 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DOS OVOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Os ovos apresentaram formato esférico arredondado, pouco achatado no polo superior (Figura 12- A), com coloração branco leitoso (Figuras 12- A e B). Obtivemos uma variação do diâmetro de 1.9 mm a 2.1 mm com média de 2.0 mm (Figura 12- B) e variação da altura entre 1.8 mm a 2.0 mm com média de 1.9 mm (Figura 12- A), com os desvios padrões assim como demonstrado no quadro-1.

Quadro 1 - Tabela de morfometria do ovo contendo: Diâmetro, Altura, Carenas verticais e Carenas horizontais com respectivos, Maximo, Mínimo, Média com desvio padrão. -São Paulo-2015

	Diâmetro (mm)	Altura (mm)	Carena vertical (Vr)	Carena horizontal (Hr)
Máxima	2,1	1,8mm	35	72
Mínima	1,9	2,0mm	32	54
Média ± D.P.	2,0 ± 0,051	1,9 ± 0,054	33 ± 0,920	64 ± 4,298

Figura 12- Foto do ovo embrionado de *Caligo illioneus illioneus*

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – A= Vista lateral do ovo de *Caligo illioneus illioneus* por microscopia eletrônica de varredura, (Em destaque Vr = Carena vertical; Pp = Polo posterior; Ap = Polo anterior). B= Polo anterior do ovo de *Caligo illioneus illioneus* por microscopia eletrônica de varredura (Em destaque Vr = Carena vertical).

As espécies e subespécies do gênero *Caligo* apresentam no cório ranhuras ventro-dorsais identificadas como carenas verticais (Vr) (Figuras 12- A, B, 13- A, B e 15), interligadas entre si por irregulares e delgadas linhas transversais identificadas como carenas horizontais (Hr) (Figuras 13- A, B e 15), formando entre si placas retangulares chamadas células inferiores (Lc) (Figuras 13- B e 15). Na superfície do polo posterior (Pp), foi detectada a presença de uma substância de origem lipídica, responsável pela fixação do ovo ao substrato.

Figura 13- Foto ultraestrutural do ovo embrionado de *Caligo illioneus illioneus*

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda - A= Cório do ovo embrionado de *Caligo illioneus illioneus* por microscopia eletrônica de varredura, (Em destaque Vr = Carena vertical; Hr = Carena horizontal). B= Cório do ovo embrionado de *Caligo illioneus illioneus* por microscopia eletrônica de varredura, (Em destaque Vr = Carena vertical; Hr = Carena horizontal; Ac = Aerópila; Lc = Células inferiores).

O número de carenas verticais variou de 32 a 35 (Figuras 12- A, B, 13- A, B e 15), partindo da área micropilar do polo anterior (Ap) e iniciando sua organização nas células superiores (Uc) (Figuras 14 e 15). Quanto às carenas horizontais (Hc) (Figuras 13- A, B e 15), seu número não é exato, há uma grande variação. Entre 54 a 72 carenas horizontais, com média de 64. Na porção da região central do polo anterior do cório encontra-se a micrópila (Mp) (Figuras 16- A, B e C), cercada pela roseta (Figuras 14, 15, 16- A e B) e ânulo (Figuras 14 e 15), formando a região micropilar, diretamente em contato com a micrópila (Mp) está a roseta (Ro) (Figuras 14, 15, 16- A e B).

Figura 14 – Foto ultraestrutural do ovo embrionado de *Caligo illioneus illioneus*

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Polo superior do cório de ovo embrionado de *Caligo illioneus illioneus* por microscopia eletrônica de varredura, (Em destaque An = Ânulo; Ro = Roseta; Uc = Células superiores).

Figura 15 – Foto ultraestrutural do ovo embrionado de *Caligo illioneus illioneus*

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Polo superior do cório do ovo embrionado de *Caligo illioneus illioneus* por microscopia eletrônica de varredura, (Em destaque An = Ânulo; Ro = Roseta; Uc = Células superiores; Vr = Carenas verticais; Hr = Carenas horizontais; Lc = Células inferiores).

Subsequente à roseta encontra-se o ânulo (An) encerrando sua região, quando em contato com as células superiores (Uc) (Figuras 14 e 15).

Figura 16 – Foto ultraestrutural do ovo embrionado de *Caligo illioneus illioneus*

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – A= Polo superior do cório do ovo embrionado de *Caligo illioneus illioneus* por microscopia eletrônica de varredura, (Em destaque Ro = Roseta; Mp = Micrópila). B= Polo superior do cório do ovo embrionado de *Caligo illioneus illioneus* por microscopia eletrônica de varredura, (Em destaque Ro = Roseta; Mp = Micrópila). C= Polo superior do cório do ovo embrionado de *Caligo illioneus illioneus* por microscopia eletrônica de varredura, (Em destaque Mp = Micrópila).

Sobre as carenas verticais (Vr) (Figuras 12- A, B, 13- A, B, 15), situam-se as aerópilas (Ac) (Figuras 17- A e B).

Figura 17 – Foto ultraestrutural do ovo embrionado de *Caligo illioneus illioneus*

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – A= Cório do ovo embrionado de *Caligo illioneus illioneus* por microscopia eletrônica de varredura, (Em destaque Lc = Células inferiores; Ac = Aerópilas). B= Cório do ovo embrionado de *Caligo illioneus illioneus* por microscopia eletrônica de varredura, (Em destaque Ac = Aerópilas).

A eclosão do ovo ocorre na parte anterior do cório, aproximadamente na altura da intersecção das células superiores (Uc) e das células inferiores (Lc), através de um corte contínuo realizado pela larva, apresentando uma aparência de “tampa” (Figura 18- A). Observamos duas camadas celulares justapostas distintas e de aspectos diferenciados, a primeira camada celular externa do cório (Os) apresenta uma largura maior. (Figura 18- B), já a segunda camada celular interna do cório (Is) apresenta a largura inferior à camada (Os). Sendo a organização da camada Is contínua e de formato estratificado (Figura 18- B).

Figura 18 – Foto ultraestrutural do cório do ovo de *Caligo illioneus illioneus*

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – A= Cório pós-eclosão por microscopia eletrônica de varredura. B= Camadas do cório (Em destaque: Is = Camada celular interna do cório; Os = Camada celular externa do cório) por microscopia eletrônica de varredura.

A primeira camada celular externa do cório (Os), apresentando uma microbiota composta em sua maior parte por bactérias e fungos fixados por toda a sua extensão (Figuras 19- B e C). A camada celular interna do cório (Is) apresenta superfície lisa e sem arestas e encontra-se sem a contaminação de patógenos (Figura 19- A).

Figura 19 – Foto ultraestrutural do cório do ovo de *Caligo illioneus illioneus*

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – A= Face interna do cório do ovo de *Caligo illioneus illioneus* pós-eclosão por microscopia eletrônica de varredura. B e C= Camada externa do cório do ovo de *Caligo illioneus illioneus* e sua microbiota por microscopia eletrônica de varredura.

Os embriões dos ovos de *Caligo illioneus illioneus*, mediante a microdissecção do ovo, apresentaram 2 seguimentos distintos, cápsula cefálica, denominada Cb (Figuras 20- A e B) e o tórax ainda fundido ao abdômen denominado tórax-abdômen (At) (Figura 20- B). É possível observar na figura 20-C os 3 pares de patas no lado ventral do seguimento At, primeiro par: 1 e 2; segundo par: 3 e 4; terceiro par 5 e 6. Na figura 20-A identifica-se o aparato bucal (Ab) do tipo mastigador localizado na parte Antero inferior da cápsula cefálica. Tanto a cápsula cefálica quanto o seguimento tórax-abdômen é recoberto por cerdas táteis (Cd) espalhadas pelo corpo da lagarta. Na figura 20-D, observam-se algumas destas cerdas táteis em destaque no seguimento tórax-abdômen.

Figura 20 – Foto ultraestrutural do embrião de *Caligo illioneus illioneus*

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – A= Vista frontal da cápsula cefálica do embrião por microscopia eletrônica de varredura (Ab= Aparato bucal). B= Embrião por microscopia eletrônica de varredura (Cb= cápsula cefálica e At= seguimento tórax-abdômen). C= Patas do embrião por microscopia eletrônica de varredura, (1 e 2 = 1° par de patas; 3 e 4 = 2° par de patas; 5 e 6 = 3° par de patas). D= Seguimento At por microscopia eletrônica de varredura, (Cd = Cerdas táteis).

6.3 ASPECTOS CITOLÓGICOS DAS CULTURAS DE OVOS EMBRIONADOS

As células obtidas do cultivo celular na primeira passagem (Figura 21- A) apresentaram menor volume celular, tendo seu formato globóide, podendo ser observado seu núcleo localizado na extremidade próximo da membrana celular. As células apresentaram grande dispersão e sem a formação de aglomerados. Nas células do cultivo celular obtidas da terceira passagem (Figura 21- B), seu tamanho manteve-se com menor volume celular e de formato globóide, porém podem-se observar algumas células com um maior volume celular. Na terceira passagem (Figura 21- C) já podemos observar uma semiconfluência e a formação de colônias. Nas células obtidas do cultivo celular na quarta passagem (Figura 21- D), observa-se células com volume celular variado e de formatos diferenciados, distribuídas pelo meio de cultura celular com total confluência do cultivo.

Figura 21 – Citologia das culturas celulares

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Citologia das culturas celulares de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus*:

A= Primeira passagem (P1); B= Segunda passagem (P2); C= Terceira passagem (P3);

D= Quarta passagem.

Nas culturas primárias obtidas pelos tecidos do explante dificilmente podemos observar as células, como demonstrado na figura 22-A. Observa-se um explante proveniente do material biológico com algumas células agrupadas, célula durante sua divisão como ilustrado na figura 22-B, bem como uma célula de formato globóide e com o núcleo bem delimitado na figura 22-C.

Figura 22 – Citologia das culturas celulares

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Citologia das culturas celulares de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus*. A= Explante de cultura primária; B= Célula durante divisão celular; C= Célula de formato globóide apresentando núcleo bem delimitado.

6.4 CARACTERIZAÇÃO CELULAR

As células provenientes da cultura celular de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* foram identificadas quanto ao formato. As Células apresentaram um baixo volume celular, formato padrão globóide e iniciando seu crescimento a partir do explante do material biológico nas culturas primárias. Possuem um desenvolvimento sem adesão ao substrato (Figura 23). As culturas celulares apresentaram o seu crescimento aumentado, influenciado diretamente pela temperatura. Sendo: quanto maior a temperatura, mais rápido se dá a multiplicação celular, em temperatura controlada de 22°C o cultivo necessita ser expandido para uma nova passagem a cada 96 horas.

Figura 23 – Cultura celular de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus*

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Cultura celular de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* apresentando formato globóide, com baixo volume celular e alta confluência.

As culturas foram separadas por períodos gestacionais do embrião, sendo quatro culturas diferentes: (1^a) cultura com ovos com período restante de 4 dias para a eclosão da lagarta; (2^a) cultura com ovos com período restante de 3 dias para a eclosão da lagarta; (3^a) cultura com ovos com período restante de 2 dias para a eclosão da lagarta; (4^a) cultura com ovos com um período restante de 1 dia para a eclosão da lagarta.

Como observado na figura 24-A as células de terceira passagem da 1^a amostra, pode-se averiguar indicados por setas, partes do explante do material biológico obtido da cultura primária, assim como na figura 24-D, correspondente à cultura celular na terceira passagem da 4^a amostra.

Pode ser constatado um aumento da quantidade de material biológico nas amostras subsequentes 1^a (Figura 24- A), 2^a (Figura 24- B), 3^a (Figura 24- C) e 4^a (Figura 24- D).

Figura 24 – Cultura celular de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus*

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Cultura celular de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus*: A= 1ª amostra em terceira passagem (P3); B= 2ª amostra em terceira passagem (P3); C= 3ª amostra em terceira passagem (P3); D= 4ª amostra em terceira passagem (P3).

Nas culturas celulares apresentadas na figura 25-A, cultura celular da 1ª amostra na quarta passagem, a figura 25-B cultura celular da 2ª amostra na quarta passagem, a figura 25-C cultura celular da 3ª amostra na quarta passagem e a figura 25-D sendo cultura celular da 4ª amostra na quarta passagem. Todas apresentam total confluência e células de formato globóide e com baixo volume celular, com exceção da 4ª amostra (Figura 25-D), onde as células apresentaram um volume celular levemente superior ao das culturas celulares das outras amostras.

Figura 25 – Cultura celular de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus*

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Cultura celular de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus*: A= 1ª amostra em quarta passagem (P4); B= 2ª amostra em quarta passagem (P4); C= 3ª amostra em quarta passagem (P4); D= 4ª amostra em quarta passagem (P4).

As figuras 26 A, B, C e D. São respectivamente das amostras de cultivo celular da 1ª amostra na quinta passagem, 2ª amostra na quinta passagem, 3ª amostra na quinta passagem e 4ª amostra na quinta passagem. As figuras 26-A e 26-B respectivas culturas celulares da 1ª e 2ª amostra demonstraram estar perdendo confluência. A figura 26-C da 3ª amostra, apresenta formação de aglomerados e a figura 26-D da 4ª amostra não apresenta confluência após aproximadamente 25 dias.

Figura 26 – Cultura celular de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus*

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Cultura celular de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus*: A= 1ª amostra em quinta passagem (P5); B= 2ª amostra em quinta passagem (P5); C= 3ª amostra em quinta passagem (P5); D= 4ª amostra em quinta passagem (P5).

6.5 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

As amostras analisadas das culturas celulares de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* demonstraram a presença de tipos celulares distintos, em volume celular e granulosidade, possuindo uma população heterogênia nas passagens iniciais. As figuras 27-A e 27-B, respectivamente 1ª amostra na P3 e 2ª amostra na P3 apresentaram granulosidade e volume celular mais distintos com uma baixa densidade. Nas figuras 27-C e 27-D respectivamente 3ª amostra na P3 e 4ª

amostra na P3, apresentaram volume celular e granulosidade mais equilibrado com uma densidade superior ao das amostras anteriores, sendo o eixo SSC-H granulosidade e FSC-H volume celular.

Figura 27 – Morfologia celular por citometria de fluxo

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Morfologia celular: 1^a, 2^a, 3^a e 4^a amostras em terceira passagem (P3), respectivamente Figuras 27 A, 27 B, 27 C, e 27 D.

As amostras analisadas das culturas celulares de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* em quarta passagem (P4) apresentaram um tipo celular dominante, sendo assim uma população heterogênea porém com uma densidade similar entre as amostras, tendo, volume celular e granulosidade similar entre si em todas as amostras em P4, como observamos nas figuras 28-A, 28-B, 28-C e 28-D,

sendo respectivamente 1ª amostra em P4, 2ª amostra em P4, 3ª amostra em P4 e 4ª amostra em P4, sendo o eixo SSC-H granulosidade e FSC-H volume celular.

Figura 28 – Morfologia celular por citometria de fluxo

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Morfologia celular: 1ª, 2ª, 3ª e 4ª amostras em quarta passagem (P4), respectivamente Figuras 28 A, 28 B, 28 C, e 28 D.

As amostras analisadas das culturas celulares de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* em quinta passagem (P5), permaneceram apresentando um tipo celular predominante, sendo assim uma população celular com maior homogeneidade. As figuras 29-B e 29-D representando respectivamente 2ª amostra e 4ª amostra, ambas em P5, demonstram que possuem densidade inferior as figuras 29-A e 29-C representando respectivamente a 1ª e 3ª amostras, as células de volume celular, granulosidade e homogeneidade similar, sendo o eixo SSC-H granulosidade e FSC-H volume celular.

Figura 29 – Morfologia celular por citometria de fluxo

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Morfologia celular: 1^a, 2^a, 3^a e 4^a amostras em quinta passagem (P5), respectivamente Figuras 29 A, 29 B, 29 C, e 29 D.

6.6 ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR

As fases do ciclo celular da 1^a amostra na P3 (Figura 30-A) apresentaram 77,9% na fase G0/G1, 10,8% na fase G2/M e 11,1% na fase S, sendo separado do quadrante gate R1, 82,8% do total da amostra eram de DNA fragmentado e debris.

Na P4 da 1^a amostra, as fases do ciclo celular representadas pela figura 30-B, apresentaram 25,1% na fase G0/G1, 41,7% na fase G2/M e 33,1% na fase S, sendo, 26,8% do total da amostra eram de DNA fragmentado e debris separado do quadrante gate R1.

A P5 da 1ª amostra, suas fases do ciclo celular representadas pela figura 30-C, obteve-se 26,7% na fase G0/G1, 10,5% na fase G2/M e 62,7% na fase S, sendo posteriormente separado do quadrante gate R1, 22,9% do total da amostra eram de DNA fragmentado e Debris.

Já as fases do ciclo celular das células da 2ª amostra na P3 (Figura 31-A) apresentaram 76,2% na fase G0/G1, 7,7% na fase G2/M e 15,9% na fase S, sendo separado do quadrante gate R1, 76,5% do total da amostra eram de DNA fragmentado e debris.

Na P4 da 2ª amostra, as fases do ciclo celular representadas pela figura 31-B, apresentaram 34,7% na fase G0/G1, 26,0% na fase G2/M e 39,1% na fase S, sendo, 23,8% do total da amostra eram de DNA fragmentado e debris separado do quadrante gate R1.

A P5 da 2ª amostra, suas fases do ciclo celular representadas pela figura 31-C, obteve-se 39,3% na fase G0/G1, 5,6% na fase G2/M e 55,0% na fase S, sendo posteriormente separado do quadrante gate R1, 17,4% do total da amostra eram de DNA fragmentado e debris.

Nas fases do ciclo celular das células da 3ª amostra na P3 (Figura 32-A) apresentaram 35,8% na fase G0/G1, 4,9% na fase G2/M e 59,1% na fase S, sendo separado do quadrante gate R1, 63,0% do total da amostra eram de DNA fragmentado e Debris.

A P4 da 3ª amostra, as fases do ciclo celular representadas pela figura 32-B, apresentaram 27,3% na fase G0/G1, 18,5% na fase G2/M e 54,1% na fase S, sendo, 27,6% do total da amostra eram de DNA fragmentado e debris separado do quadrante gate R1.

A P5 da 3ª amostra, suas fases do ciclo celular representadas pela figura 32-C, apresentaram 31,9% na fase G0/G1, 10,6% na fase G2/M e 5,40% na fase S, sendo separado do quadrante gate R1, 3,21% do total da amostra eram de DNA fragmentado e debris.

Por fim, A P3 da 4ª amostra, as fases do ciclo celular representadas pela figura 33-A, obteve-se 85,1% na fase G0/G1 e 14,8% na fase S, sendo separado do quadrante gate R1, 18,5% do total da amostra eram de DNA fragmentado e Debris.

As fases do ciclo celular das células da 4ª amostra na P4 (Figura 33-B) apresentaram 76,6% na fase G0/G1, 6,1% na fase G2/M e 17,1% na fase S, sendo

posteriormente separado do Gate R1, 16,1% do total da amostra eram de DNA fragmentado e Debris.

A P5 da 4^a amostra, suas fases do ciclo celular representadas pela figura 33-C, obtivemos 33,1% na fase G0/G1, 2,8% na fase G2/M e 64,0% na fase S, sendo, 54,6% do total da amostra eram de DNA fragmentado e debris separado do quadrante gate R1.

Figura 30 – Ciclo celular por citometria de fluxo

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Ciclo celular 1ª amostra, (P3) terceira passagem; (P4) quarta passagem; (P5) quinta passagem, respectivamente Figura 30 A, 30 B e 30 C. Destaca-se a direita composição da população celular presente no quadrante gate R1.

Figura 31 – Ciclo celular por citometria de fluxo

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Ciclo celular 2ª amostra, (P3) terceira passagem; (P4) quarta passagem; (P5) quinta passagem, respectivamente Figura 31 A, 31 B e 31 C. Destaca-se a direita composição da população celular presente no quadrante gate R1.

Figura 32 – Ciclo celular por citometria de fluxo

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Ciclo celular 3ª amostra, (P3) terceira passagem; (P4) quarta passagem; (P5) quinta passagem, respectivamente Figura 32 A, 32 B e 32 C. Destaca-se a direita composição da população celular presente no quadrante gate R1.

Figura 33 – Ciclo celular por citometria de fluxo

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Ciclo celular 4ª amostra, (P3) terceira passagem; (P4) quarta passagem; (P5) quinta passagem, respectivamente Figura 33 A, 33 B e 33 C. Destaca-se a direita composição da população celular presente no quadrante gate R1.

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Graphpad prism5, os resultados do ciclo celular em células da amostra 1 (ovos com 4 dias para a eclosão) na terceira passagem (P3), quarta passagem (P4) e quinta passagem (P5) (Figura 34), As taxas de células na fase G0/G1 do ciclo celular foram altas na P3 havendo diferença significativa entre P4 e P5. Na fase G2/M houve menor quantidade nas passagens P3 e P5, sendo a maior expressão na P4. Em relação ao índice de células na fase S do ciclo celular, apresentou um crescimento progressivo entre a P3, P4 e P5.

Figura 34 - Análise estatística das fases do ciclo celular da amostra 1

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Gráfico de barras da análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo da amostra 1 (ovo com 4 dias para a eclosão) em P3, P4 e P5.

As análises estatísticas do ciclo celular em células da amostra 2 (ovos com 3 dias para a eclosão) na terceira passagem (P3), quarta passagem (P4) e quinta passagem (P5) (Figura 35) apresentou taxas de células no estágio G0/G1 do ciclo celular altas na P3 havendo diferença significativa entre ela e as passagens P4 e P5. Na fase G2/M houve poucas células nas passagens P3 e P5, sendo a passagem P4 pouco significativa maior que em P3 e P5. O índice de células na fase S do ciclo celular apresentou crescimento progressivo entre a P3, P4 e P5.

Figura 35 - Análise estatística das fases do ciclo celular da amostra 2

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Gráfico de barras da análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo da amostra 2 (ovo com 3 dias para a eclosão) em P3, P4 e P5.

As análises estatísticas do ciclo celular em células da amostra 3 (ovos com 2 dias para a eclosão) na terceira passagem (P3), quarta passagem (P4) e quinta passagem (P5) (Figura 36), As taxas de células no estágio G0/G1 do ciclo celular apresentaram valores equilibrados nas passagens P3, P4 e P5. Na fase G2/M houve poucas células na P3 e P5. Tendo a maior expressão, porém com pouca significância na passagem P4. Em relação ao índice de células na fase S do ciclo celular, apresentou a ocorrência de equilíbrio entre as passagens P3, P4 e P5.

Figura 36 - Análise estatística das fases do ciclo celular da amostra 3

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Gráfico de barras da análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo da amostra 3 (ovo com 2 dias para a eclosão) em P3, P4 e P5.

As análises estatísticas do ciclo celular em células da amostra 4 (ovos com 1 dia para a eclosão) na terceira passagem (P3), quarta passagem (P4) e quinta passagem (P5) (Figura 37), As taxas de células no estágio G0/G1 do ciclo celular apresentaram valores decrescentes entre as passagens P3, P4 e P5. Na fase G2/M houve baixos valores com não significantes nas passagens P4 e P5, sendo que a passagens P3 não apresentou células na fase G2/M. As células na fase S do ciclo celular nas passagens P3 e P4 foram baixas em relação a passagem P5 com valores de significância superior a 60% da amostra.

Figura 37 - Análise estatística das fases do ciclo celular da amostra 4

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Gráfico de barras da análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo da amostra 4 (ovo com 1 dia para a eclosão) em P3, P4 e P5.

As análises estatísticas do DNA fragmentado e debris (Figura 38), demonstraram que nas amostras 1 e amostra 2, a quantidade de DNA fragmentado e Debris decaíram ao longo do período da cultura. A amostra 3 obteve um decaimento durante as passagens P3 e P4, tendo um pequeno aumento na passagem P5. Já a amostra 4 demonstrou um resultado onde em suas primeiras passagens P3 e P4, apresentaram menores quantidades de DNA fragmentado e debris, posteriormente tendo um aumento significativo na passagem P5.

Figura 38 - Análise estatística do DNA fragmentado e Debris

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Gráfico de barras da análise do DNA fragmentado das fases do ciclo celular por citometria de fluxo das amostras 1, 2, 3 e 4, na terceira passagem (P3), quarta passagem (P4) e quinta passagem (P5).

6.7 ANÁLISE DE IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO

A imunofenotipagem dos marcadores realizada por citometria de fluxo, foram uteis na determinação, caracterização e desenvolvimento das culturas celulares das amostras 1, 2, 3 e 4 dos diferentes estágios de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* na passagem P3 e passagem P5. Para a realização do experimento utilizou-se os marcadores descritos no quadro 2.

Quadro 2 - Marcadores celulares e respectivas funções -São Paulo-2015

Marcadores	Fluorescência	Função
Anti Rab-5	FL-2	Marcador de vesículas endossômicas
GM 130	FL-2	Marcador de proteínas do Complexo de Golgi
Dro. FMR1	FL-1	Marcador de células do sistema nervoso
Axons BP 102	FL-1	Marcador de axônios
Caspase 3	FL-1	Marcador de morte celular por apoptose
Stro-1	FL-1	Marcador de células de origem mesenquimal
Sox2	FL-1	Marcador de células pluripotentes
Oct 3/4	FL-1	Marcador de células pluripotentes
Vimentina	FL-1	Marcador de células de origem mesenquimal
CD 90	FL-1	Marcador de células de origem mesenquimal
HSP 70	FL-1	Marcador de morte celular por apoptose

Os resultados das análises dos experimentos em porcentagem para a amostra 1 (ovos com 4 dias para a eclosão), em terceira passagem (P3), apresentaram o nível de expressão de que cada marcador em média percentual, de: Ant Rab-5 (40,1%), GM 130 (40,0%), Dro. FMR1 (28,2%), Axons BP 102 (26,5%), Caspase 3 (32,5%), Stro-1 (20,8%), Sox2 (17,9%), Oct 3/4 (28,1%), Vimentina (32,0%), CD 90 (15,8%), HSP 70 (39,1%), a figura 39 mostra os gráficos representativos do tipo DotPlot dos marcadores obtidos pelo programa WinMdi 2.9 da população de células indiferenciadas de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus*.

Figura 39 – Análise de expressão dos marcadores por citometria da amostra 1 em P3

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Gráficos representativos do tipo DotPlot dos marcadores, obtidos pelo programa WinMdi 2.9, de cultura celular de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* da amostra 1 (ovos em 4 dias para a eclosão) em terceira passagem (P3), por citometria de fluxo.

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Graphpad Prism versão 5 para as diferenças da intensidade de fluorescência de cada marcador na amostra 1 (ovo com 4 dias para a eclosão) na terceira passagem (P3), sendo diferencialmente expressos como apresentados no gráfico representativo de barra do modelo $\pm$ DP na figura 40.

Figura 40 - Análise estatística dos marcadores na amostra 1 (ovos com 4 dias para a eclosão) em terceira passagem (P3)

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Gráfico de barras dos marcadores por citometria de fluxo na amostra 1 (ovos com 4 dias para a eclosão) em terceira passagem (P3).

Os resultados da amostra 1 na quinta passagem (P5), obtidas de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* apresentaram o nível de expressão de que cada marcador em média percentual, de: Anti Rab-5 (40,1%), GM 130 (39,7%), Dro. FMR1 (23,7%), Axons BP 102 (25,8%), Caspase 3 (28,3%), Stro-1 (20,8%), Sox2 (30,2%), Oct 3/4 (25,7%), Vimentina (38,1%), CD 90 (8,9%), HSP 70 (37,0%), a figura 41 mostra os gráficos representativos do tipo DotPlot dos marcadores obtidos pelo programa WinMdi 2.9 da população de células indiferenciadas de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus*.

Figura 41 – Análise de expressão dos marcadores por citometria da amostra 1 em P5

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Gráficos representativos do tipo DotPlot dos marcadores, obtidos pelo programa WinMdi 2.9, de cultura celular de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* da amostra 1 (ovos em 4 dias para a eclosão) em quinta passagem (P5), por citometria de fluxo.

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Graphpad Prism versão 5 para as diferenças da intensidade de fluorescência de cada marcador na amostra 1 (ovo com 4 dias para a eclosão) na quinta passagem (P5), sendo diferencialmente expressos como apresentados no gráfico representativo de barra do modelo $\pm$ DP na figura 42.

Figura 42 - Análise estatística dos marcadores na amostra 1 (ovos com 4 dias para a eclosão) em quinta passagem (P5)

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Gráfico de barras dos marcadores por citometria de fluxo na amostra 1 (ovos com 4 dias para a eclosão) em quinta passagem (P5).

Os resultados da amostra 2 na terceira passagem (P3), obtidas de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* apresentaram o nível de expressão de que cada marcador em média percentual, de: Anti Rab-5 (38,7%), GM 130 (40,1%), Dro. FMR1 (23,1%), Axons BP 102 (25,3%), Caspase 3 (27,4%), Stro-1 (35,0%), Sox2 (23,5%), Oct 3/4 (25,3%), Vimentina (39,1%), CD 90 (12,0%), HSP 70 (35,5%), a figura 43 mostra os gráficos representativos do tipo DotPlot dos marcadores obtidos pelo programa WinMdi 2.9 da população de células indiferenciadas de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus*.

Figura 43 – Análise de expressão dos marcadores por citometria da amostra 2 em P3

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Gráficos representativos do tipo DotPlot dos marcadores, obtidos pelo programa WinMdi 2.9, de cultura celular de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* da amostra 2 (ovos em 3 dias para a eclosão) em terceira passagem (P3), por citometria de fluxo.

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Graphpad Prism versão 5 para as diferenças da intensidade de fluorescência de cada marcador na amostra 2 (ovo com 3 dias para a eclosão) na terceira passagem (P3), sendo diferencialmente expressos como apresentados no gráfico representativo de barra do modelo $\pm$ DP na figura 44.

Figura 44 - Análise estatística dos marcadores na amostra 2 (ovos com 3 dias para a eclosão) em terceira passagem (P3)

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Gráfico de barras dos marcadores por citometria de fluxo na amostra 2 (ovos com 3 dias para a eclosão) em terceira passagem (P3).

Os resultados da amostra 2 na quinta passagem (P5), obtidas de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* apresentaram o nível de expressão de que cada marcador em média percentual, de: Anti Rab-5 (40,9%), GM 130 (38,6%), Dro. FMR1 (24,0%), Axons BP 102 (20,3%), Caspase 3 (22,1%), Stro-1 (24,1%), Sox2 (29,6%), Oct 3/4 (29,6%), Vimentina (38,6%), CD 90 (9,2%), HSP 70 (33,7%), a figura 45 mostra os gráficos representativos do tipo DotPlot dos marcadores obtidos pelo programa WinMdi 2.9 da população de células indiferenciadas de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus*.

Figura 45 – Análise de expressão dos marcadores por citometria da amostra 2 em P5

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Gráficos representativos do tipo DotPlot dos marcadores, obtidos pelo programa WinMdi 2.9, de cultura celular de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* da amostra 2 (ovos em 3 dias para a eclosão) em quinta passagem (P5), por citometria de fluxo.

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Graphpad Prism versão 5 para as diferenças da intensidade de fluorescência de cada marcador na amostra 2 (ovo com 3 dias para a eclosão) na quinta passagem (P5), sendo diferencialmente expressos como apresentados no gráfico representativo de barra do modelo $\pm$ DP na figura 46.

Figura 46 - Análise estatística dos marcadores na amostra 2 (ovos com 3 dias para a eclosão) em quinta passagem (P5)

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Gráfico de barras dos marcadores por citometria de fluxo na amostra 2 (ovos com 3 dias para a eclosão) em quinta passagem (P5).

Os resultados da amostra 3 (ovos com 2 dias para a eclosão) em terceira passagem (P3), obtidas de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* apresentaram o nível de expressão de que cada marcador em média percentual, sendo respectivamente: Anti Rab-5 (41,1%), GM 130 (41,0%), Dro. FMR1 (24,7%), Axons BP 102 (39,3%), Caspase 3 (23,0%), Stro-1 (21,7%), Sox2 (23,9%), Oct 3/4 (26,1%), Vimentina (40,7%), CD 90 (8,0%), HSP 70 (31,2%), a figura 47 mostra os gráficos representativos do tipo DotPlot dos marcadores obtidos pelo programa WinMdi 2.9 da população de células indiferenciadas de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus*.

Figura 47 – Análise de expressão dos marcadores por citometria da amostra 3 em P3

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Gráficos representativos do tipo DotPlot dos marcadores, obtidos pelo programa WinMdi 2.9, de cultura celular de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* da amostra 3 (ovos em 2 dias para a eclosão) em terceira passagem (P3), por citometria de fluxo.

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Graphpad Prism versão 5 para as diferenças da intensidade de fluorescência de cada marcador na amostra 3 (ovo com 2 dias para a eclosão) na terceira passagem (P3), sendo diferencialmente expressos como apresentados no gráfico representativo de barra do modelo $\pm$ DP na figura 48.

Figura 48 - Análise estatística dos marcadores na amostra 3 (ovos com 2 dias para a eclosão) em terceira passagem (P3)

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Gráfico de barras dos marcadores por citometria de fluxo na amostra 3 (ovos com 2 dias para a eclosão) em terceira passagem (P3).

Os resultados da amostra 3 em quinta passagem (P5), obtidas de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* apresentaram o nível de expressão de que cada marcador em média percentual, sendo respectivamente: Anti Rab-5 (40,8%), GM 130 (39,9%), Dro. FMR1 (29,4%), Axons BP 102 (36,8%), Caspase 3 (25,0%), Stro-1 (33,0%), Sox2 (25,5%), Oct 3/4 (31,1%), Vimentina (41,6%), CD 90 (6,1%), HSP 70 (27,7%), a figura 49 mostra os gráficos representativos do tipo DotPlot dos marcadores obtidos pelo programa WinMdi 2.9 da população de células indiferenciadas de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus*.

Figura 49 – Análise de expressão dos marcadores por citometria da amostra 3 em P5

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Gráficos representativos do tipo DotPlot dos marcadores, obtidos pelo programa WinMdi 2.9, de cultura celular de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* da amostra 3 (ovos em 2 dias para a eclosão) em quinta passagem (P5), por citometria de fluxo.

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Graphpad Prism versão 5 para as diferenças da intensidade de fluorescência de cada marcador na amostra 3 (ovo com 2 dias para a eclosão) na quinta passagem (P5), sendo diferencialmente expressos como apresentados no gráfico representativo de barra do modelo $\pm$ DP na figura 50.

Figura 50 - Análise estatística dos marcadores na amostra 3 (ovos com 2 dias para a eclosão) em quinta passagem (P5)

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Gráfico de barras dos marcadores por citometria de fluxo na amostra 3 (ovos com 2 dias para a eclosão) em quinta passagem (P5).

Os resultados da amostra 4 (ovos com 1 dia para a eclosão) em terceira passagem (P3), obtidas de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* apresentaram o nível de expressão de que cada marcador em média percentual, sendo respectivamente: Anti Rab-5 (39,8%), GM 130 (39,3%), Dro. FMR1 (27,6%), Axons BP 102 (28,2%), Caspase 3 (25,5%), Stro-1 (22,6%), Sox2 (25,3%), Oct 3/4 (25,8%), Vimentina (36,5%), CD 90 (5,9%), HSP 70 (32,5%), a figura 51 mostra os gráficos representativos do tipo DotPlot dos marcadores obtidos pelo programa WinMdi 2.9 da população de células indiferenciadas de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus*.

Figura 51 – Análise de expressão dos marcadores por citometria da amostra 4 em P3

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Gráficos representativos do tipo DotPlot dos marcadores, obtidos pelo programa WinMdi 2.9, de cultura celular de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* da amostra 4 (ovos com 1 dia para a eclosão) em terceira passagem (P3), por citometria de fluxo.

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Graphpad Prism versão 5 para as diferenças da intensidade de fluorescência de cada marcador na amostra 4 (ovo com 1 dia para a eclosão) na terceira passagem (P3), sendo diferencialmente expressos como apresentados no gráfico representativo de barra do modelo $\pm$ DP na figura 52.

Figura 52 - Análise estatística dos marcadores na amostra 4 (ovos com 1 dia para a eclosão) em terceira passagem (P3)

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Gráfico de barras dos marcadores por citometria de fluxo na amostra 4 (ovos com 1 dia para a eclosão) em terceira passagem (P3).

Os resultados da amostra 4 em quinta passagem (P5), obtidas de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* apresentaram o nível de expressão de que cada marcador em média percentual, sendo respectivamente: Anti Rab-5 (39,4%), GM 130 (38,8%), Dro. FMR1 (27,6%), Axons BP 102 (32,8%), Caspase 3 (26,2%), Stro-1 (25,7%), Sox2 (35,2%), Oct 3/4 (23,5%), Vimentina (49,0%), CD 90 (9,4%), HSP 70 (32,6%), a figura 53 mostra os gráficos representativos do tipo DotPlot dos marcadores obtidos pelo programa WinMdi 2.9 da população de células indiferenciadas de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus*.

Figura 53 – Análise de expressão dos marcadores por citometria da amostra 4 em P5

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Gráficos representativos do tipo DotPlot dos marcadores, obtidos pelo programa WinMdi 2.9, de cultura celular de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* da amostra 4 (ovos com 1 dia para a eclosão) em quinta passagem (P5), por citometria de fluxo.

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Graphpad Prism versão 5 para as diferenças da intensidade de fluorescência de cada marcador na amostra 4 (ovo com 1 dia para a eclosão) na quinta a passagem (P5), sendo diferencialmente expressos como apresentados no gráfico representativo de barra do modelo $\pm$ DP na figura 54.

Figura 54 - Análise estatística dos marcadores na amostra 4 (ovos com 1 dias para a eclosão) em quinta passagem (P5)

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Gráfico de barras dos marcadores por citometria de fluxo na amostra 4 (ovos com 1 dia para a eclosão) em quinta passagem (P5).

6.8 POTENCIAL ELÉTRICO E FUNCIONAL DA MEMBRANA MITOCONDRIAL

A Rodamina-123 (Rh-123) é um fluocromo catiônico carregado positivamente específico para marcação mitocondrial em células vivas, assim permitindo que seja atraído pelo elevado potencial elétrico negativo presente na membrana mitocondrial, incorporando-se no interior destas organelas.

Alterações na integridade mitocondrial podem ser detectadas através do aumento da fluorescência verde citosólica, indicando uma difusão da Rh-123 da mitocôndria para o citosol (JOHNSON et al., 1980). A aquisição dos histogramas do

potencial elétrico da membrana mitocondrial avaliados pela incorporação da Rh-123 foram realizadas em citômetro de fluxo e as imagens da intensidade de fluorescência FL-1 analisadas no programa WinMdi 2.9.

Foram analisadas e comparadas as culturas celulares em sua cultura primária (CP), comparando as amostras 1, 2, 3 e 4, apresentados pela porcentagem de células metabolicamente ativas (AT) e células metabolicamente inativas (IN) (Figura 55). Os resultados da Amostra 1 na CP representados pela figura 55-A. AT (63,5%) e IN (36,4%); Amostra 2 na CP figura 55-B. AT (56,5%) e IN (43,4%); Amostra 3 na CP figura 55-C. AT (62,4%) e IN (37,5%); Amostra 4 na CP figura 55-D. AT (58,4%) e IN (41,6%).

Figura 55 – Histogramas representativos da análise do potencial elétrico mitocondrial

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Potencial elétrico mitocondrial obtido por citometria de fluxo: A. cultura primária da amostra 1 (ovos com 4 dias para a eclosão); B. cultura primária da amostra 2 (ovos com 3 dias para a eclosão); C. cultura primária da amostra 3 (ovos com 2 dias para a eclosão); D. cultura primária da amostra 4 (ovos com 1 dia para a eclosão).

Os resultados obtidos não evidenciaram diferenças significativas na atividade do potencial elétrico mitocondrial das células de cultura primária das amostras 1, 2, 3 e 4 como demonstrados nos gráficos de barras representativos modelo $\pm$ DP da figura 56.

Figura 56 - Análise estatística do potencial elétrico da membrana mitocondrial em cultura primária (CP) das amostras 1, 2, 3 e 4

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Gráfico de barras do modelo $\pm$ DP da atividade do potencial elétrico da membrana mitocondrial em cultura primária das amostras 1, 2, 3 e 4 por citometria de fluxo.

Posteriormente foram analisadas e comparadas as passagens P3 e P5 das culturas celulares da amostra 1 (ovo com 4 dias para a eclosão), sendo apresentados pela porcentagem de células metabolicamente ativas (AT) e células metabolicamente inativas (IN), tendo os seguintes resultados: Amostra 1 cultura celular na terceira passagem (P3) (Figura 57-A): AT (66,8%) e IN (33,1%). Amostra 1, cultura celular na quinta passagem (P5): AT (65,2%) e IN (34,7%) (Figura 57-B).

Figura 57 – Histograma da análise do potencial elétrico mitocondrial

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Histogramas representativos do potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo sendo: (A) terceira passagem (P3) da amostra 1 (ovos com 4 dias para a eclosão) e (B) quinta passagem (P5) da amostra 1.

Os resultados obtidos não evidenciaram diferenças significativas na atividade do potencial elétrico mitocondrial entre as culturas celulares da amostra 1 na terceira passagem (P3) e quinta passagem (P5) como demonstrado no gráfico de barras do modelo $\pm$ DP da figura 58.

Figura 58 - Análise estatística do potencial elétrico da membrana mitocondrial da amostra 1 em terceira passagem (P3) e quinta passagem (P5)

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Gráfico de barras modelo $\pm$ DP da atividade do potencial elétrico da membrana mitocondrial da amostra 1 em terceira passagem (P3) e quinta passagem (P5) por citometria de fluxo.

Foram analisadas e comparadas as passagens P3 e P5 das culturas celulares da amostra 2 (ovo com 3 dias para a eclosão), sendo apresentados pela porcentagem de células metabolicamente ativas (AT) e células metabolicamente inativas (IN), tendo os seguintes resultados: Amostra 2, cultura celular na P3: AT (68,1%) e IN (31,8%) (Figura 59-A). Amostra 2, cultura celular na P5: AT (65,8%) e IN (34,1%) (Figura 59-B).

Figura 59 – Histograma da análise do potencial elétrico mitocondrial

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Histogramas representativos do potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo sendo: (A) terceira passagem (P3) da amostra 2 (ovos com 3 dias para a eclosão) e (B) quinta passagem (P5) da amostra 2.

Os resultados obtidos não evidenciaram diferenças significativas na atividade do potencial elétrico mitocondrial entre as culturas celulares da amostra 2 em terceira passagem (P3) e quinta passagem (P5) como demonstrado no gráfico de barras do modelo $\pm$ DP figura 60.

Figura 60 - Análise estatística do potencial elétrico da membrana mitocondrial da amostra 2 em terceira passagem (P3) e quinta passagem (P5)

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Gráfico de barras do modelo $\pm$ DP da atividade do potencial elétrico da membrana mitocondrial da amostra 2 em terceira passagem (P3) e quinta passagem (P5) por citometria de fluxo.

Foram analisadas e comparadas as passagens P3 e P5 das culturas celulares da amostra 1 (ovo com 4 dias para a eclosão), sendo apresentados pela porcentagem de células metabolicamente ativas (AT) e células metabolicamente inativas (IN), tendo os seguintes resultados: Amostra 3, cultura celular na P3 (Figura 61-A): AT (68,2%) e IN (31,7%). Amostra 3, cultura celular na P5: AT (71,3%) e IN (28,6%) (Figura 61-B).

Figura 61 – Histograma da análise do potencial elétrico mitocondrial

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Histogramas representativos do potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo sendo: (A) terceira passagem (P3) da amostra 3 (ovos com 2 dias para a eclosão) e (B) quinta passagem (P5) da amostra 3.

Os resultados obtidos não evidenciaram diferenças significativas na atividade do potencial elétrico mitocondrial entre as culturas celulares da amostra 3 em terceira passagem (P3) e quinta passagem (P5) como demonstrado no gráfico de barras do modelo $\pm$ DP da figura 62.

Figura 62 - Análise estatística do potencial elétrico da membrana mitocondrial da amostra 3 em terceira passagem (P3) e quinta passagem (P5)

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Gráfico de barras do modelo $\pm$ DP da atividade do potencial elétrico da membrana mitocondrial da amostra 3 em terceira passagem (P3) e quinta passagem (P5) por citometria de fluxo.

Foram analisadas e comparadas as passagens P3 e P5 das culturas celulares da amostra 4 (ovo com 1 dia para a eclosão), sendo apresentados pela porcentagem de células metabolicamente ativas (AT) e células metabolicamente inativas (IN), tendo os seguintes resultados: Amostra 4, cultura celular em P3: AT (70,45%) e IN (29,55%) (Figura 63-A). Amostra 4, cultura celular em P5: AT (69,86%) e IN (30,14%) (Figura 63-B).

Figura 63 – Histograma da análise do potencial elétrico mitocondrial

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Histogramas representativos do potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo sendo: (A) terceira passagem (P3) da amostra 4 (ovos com 1 dia para a eclosão) e (B) quinta passagem (P5) da amostra 4.

Os resultados obtidos não evidenciaram diferenças significativas na atividade do potencial elétrico mitocondrial entre as culturas celulares da amostra 4 em terceira passagem (P3) e quinta passagem (P5), como demonstrado no gráfico de barras do modelo $\pm$ DP da figura 64.

Figura 64 - Análise estatística do potencial elétrico da membrana mitocondrial da amostra 4 em terceira passagem (P3) e quinta passagem (P5)

Fonte: (CRIVELLARI-DAMASCENO, W. T., 2015)

Legenda – Gráfico de barras do modelo $\pm$ DP da atividade do potencial elétrico da membrana mitocondrial da amostra 4 em terceira passagem (P3) e quinta passagem (P5) por citometria de fluxo.

7 DISCUSSÃO

Os espécimes utilizados e analisados neste estudo foram confirmados como pertencente à subespécie *Caligo illioneus illioneus* através de suas características anatômicas, morfológicas, assim como, os aspectos biológicos relacionados ao seu desenvolvimento, como os já descritos por Malo; Willis (1961) na *C. eurylochus*, Casagrande (1979) na *C. beltrão*, Casagrande, Mielke (2000) na *C. martia*, Souza et al. (2006) na *C. teucer*, na *C. brasiliensis brasiliensis* segundo Casagrande; Mielke (2008), e por fim observado por Cleare (1926) para a mesma subespécie deste trabalho, a *Caligo illioneus illioneus*.

Foram observadas sua alimentação e oviposição em espécies *Heliconia*, assim como descrito por Cleare (1926); Brown (1992); Casagrande (1979); Young; Muyschondt (1985) e Srygley; Penz (1999). Os ovos da subespécie *Caligo illioneus illioneus* foram coletados da superfície adaxial e abaxial das folhas de espécies de Heliconias, em agrupamentos de 3, 5, 6, 7 e 9 ovos corroborando com a descrição de Cleare (1926) para a subespécie *C. illioneus illioneus*. Os ovos apresentaram formato esférico, pouco achatado no polo anterior e pouco mais achatado no polo posterior, com diâmetros entre 1,9 e 2,1 mm, dados similares aos relatados por Souza et al. (2006). A coloração apresentada pelo ovo no momento da oviposição foi branco leitoso, posteriormente semitransparente com um tom levemente acinzentado próximo ao período de eclosão, sendo possível a visualização da cabeça da larva e do corpo já formados através do cório, assim como relatado por Cleare (1926) sobre *Caligo illioneus illioneus*, Penz et al. (1999) a respeito da coloração dos ovos da subespécie *Caligo illioneus oberon* e por Souza et al. (2006) sobre *Caligo teucer*. Foram encontrados ovos de coloração preta o que demonstrou a presença de parasitismo por Drosófila, corroborando com Aguilar et al. (2010).

As espécies e subespécies do gênero *Caligo* apresentam no cório ranhuras ventro-dorsais identificadas como carenas verticais, sendo que o diâmetro do ovo e número de carenas de *C. i. illioneus* é similar ou superior ao de outras espécies do gênero, corroborando com Casagrande (1979). O número de carenas verticais variou de 32-35, resultados semelhantes aos de Specht; Paluch (2009) que descreveram 33-36 carenas verticais para *Caligo illioneus illioneus*. Casagrande

(1979) observou 31 carenas para *Caligo beltrao*, Souza et al. (2006) descreveram 28-30 carenas para *C. teucer* e Malo; Willis (1961) observaram 26-27 carenas para *Caligo eurilochus*. Já as carenas horizontais, seu número não é exato, há uma grande variação. No presente estudo obtivemos uma variação de 54 a 72 de carenas horizontais, esta variação deve-se ao fato de que no início da organização das carenas verticais que partem da área micropilar no polo anterior em direção ao polo posterior do cório há várias bifurcações ou junções dando uma descontinuidade nas carenas verticais, influenciando assim sua quantidade exata, semelhante ao encontrado por Muysshondt et al. (1973); Tavares et al. (2002) e Dell'Erba et al. (2005).

Na porção da região central do polo anterior do cório encontra-se a micrópila (Mp), cercada pela roseta e ânulo, formando a região micropilar dada pela ausência de carenas e por todas as células desta região apresentarem formas com ângulos muito agudos, similar ao observado em *Dione moneta moneta* (HÜBNER, 1825) por Dell'Erba et al. (2005). Na região micropilar, diretamente em contato com a micrópila (Mp), encontra-se a roseta (Ro), formada por células hexagonais, variando entre 8 células simétricas e organizadas ou 10 células assimétricas e disformes. Subsequente à roseta encontra-se o ânulo (An), formado por células pentagonais, hexagonais e heptagonais, com ângulos agudos e delimitados, encerrando sua região quando em contato com as células superiores (Uc).

As células superiores apresentam um formato arredondado com marcações levemente hexagonais em sua margem interna, delimitam o início das carenas verticais. Em suas intersecções, sempre na altura das carenas horizontais (Hr), situam-se as aerópilas (Ac), de formato circular e com leve elevação no peritrema, responsáveis pelas trocas gasosas do ovo, corroborando com resultados de Hinton (1970); Downey; Allyn (1981) e Dell'Erba et al. (2005). As células inferiores (Lc), apresentam formato retangular, uniformemente distribuída, com ângulos levemente arredondados, como os encontrados por Dell'Erba et al. (2005) para *Agraulis vanillae maculosa* (STICHEL, 1907).

As células distribuídas pelo cório são de superfície lisa, semelhantes às de *Dione juno juno* (CRAMER, 1779) Dell'Erba et al. (2005), apresentando na região micropilar células com ângulos agudos e na região Lc e Uc, células com ângulos arredondados. Observamos a presença de duas camadas celulares justapostas

distintas e de aspectos diferenciados. A primeira camada celular externa do cório (Os) apresenta uma largura maior. Sua organização é descontínua e rústica, provavelmente para a proteção externa do ovo, apresentando uma microbiota composta em sua maior parte por bactérias e fungos fixados em sua extensão.

A segunda camada celular interna do cório (Is) apresenta a largura inferior à camada (Os). Possui uma organização contínua de formato estratificado. Sua superfície interna é lisa com leves elevações em forma de canaletas ou ranhuras, sendo uma superfície lisa provavelmente para a acomodação do embrião durante o desenvolvimento em seu estágio embrionário. Observa-se que, diferente da camada externa do cório, a camada interna é totalmente livre de patógenos o que permite o desenvolvimento do embrião e a possibilidade da obtenção de células para cultivo. A microdissecção realizada em ovos embrionados, observou-se embriões entre 1 e 4 dias para a eclosão, e apresentando características similares as lagartas em primeiro instar larval.

O período embrionário, da postura do ovo à eclosão da lagarta, variou de 4 a 10 dias dependendo da umidade relativa do ar e das variações de temperatura, dados semelhantes descritos por Malo; Willis (1961); Casgrande (1979) e Otero; Casagrande (1992). A espécie *Caligo illioneus illioneus* apresentou cinco instares larvais, a lagarta recém eclodida, em seu primeiro instar apresentou aproximadamente 5 milímetros de comprimento, seu corpo é cilíndrico, não podendo observar-se os segmentos, corpo de coloração amarelada com quatro linhas longitudinais e de coloração carmim ou verde, apresentaram cápsulas cefálicas arredondadas, de coloração marrom, recobertas por cerdas de coloração preta, sem escolos, corroborando com (CLEARE, 1926).

Em seu segundo instar, a lagarta apresentou média de 3 cm, coloração verde clara após a sua alimentação, podendo ser observado a presença de três pares de escolos em sua cápsula cefálica, sendo os escolos dorsais, mais pronunciados, de coloração marrom, e os outros amarelos, corroborando com (CLEARE, 1926).

Em seu terceiro instar, as lagartas de *Caligo illioneus illioneus* apresentou média de 4,5 cm, possuindo projeções dorsais recobertas por cerdas, sua cápsula cefálica apresentou quatro pares de escolos, desaparecimento da coloração preta das terminações da placa suranal, corroborando com (CLEARE, 1926).

No quarto instar observou-se a presença de linhas longitudinais de coloração verde oliva e marrom na lateral da lagarta de *Caligo illioneus illioneus*, uma linha longitudinal de coloração verde em seu dorso, a lagarta apresentou média de 6,3 cm, possuindo o par de escolos dorsais de coloração marrom e os demais escolos de coloração creme.

Em seu quinto e último instar, a lagarta de *Caligo illioneus illioneus* apresentou média de 11,5 cm, com linhas longitudinais bem marcadas em coloração de marrom escuro, tendo cinco projeções cuticulares na linha dorsal média situadas no quinto, sexto, sétimo, oitavo e nono segmentos sendo o sexto o maior seguimento, a placa suranal acompanha a coloração do corpo sendo mais escura e recoberta por pequenas cerdas, a cápsula cefálica apresentou grande quantidade de cerdas, corroborando com Cleare (1926); Souza (2006) e Casagrande (2008).

O período médio da eclosão ao início da fase pupal variou de 38 a 72 dias dependendo do clima, alimentação e umidade relativa do ar, corroborando com dados obtidos por Casagrande, (1979) e GÓMEZ; LASTRA BORJA, (1998). As pupas apresentaram coloração em tons de marrons, sendo descrita uma estrutura prismática em sua lateral, que tem uma função refletiva da luz, provavelmente relacionada à distração de predadores. Presença de orifício genital, sendo a pupa macho possuindo o orifício genital mais curto e a pupa fêmea possuindo o orifício genital mais alongado, dados também citados por Casagrande (1979).

Os adultos de *Caligo illioneus illioneus* apresentaram coloração padrão da espécie, azul no dorso das asas e padrões manchados de marrom no ventre das asas, apresentaram dimorfismo sexual, o macho possui o abdômen relativamente mais estreito do que a fêmea, dados corroborando com os descritos por Casagrande (1979). O macho apresentou escamas modificadas na margem interna do ângulo anal das asas posteriores, A fêmea não possui essa estrutura e apresenta seu abdômen mais delgado do que o macho, resultados semelhantes a relatados por Cleare (1926) e Casagrande (2004). Relatamos a presença de alterações no formato e coloração padrão da espécie nas asas, do lado ventral, na estrutura que possui a forma de um olho, a qual nomeia popularmente a espécie (olho-de-coruja). Alteração que denominamos como “lágrima”, observamos o surgimento de um ponto amarelado, o qual gradativamente torna-se cada vez maior, tornando-se semelhante a uma segunda gravura de “olho” nas asas, tal fato deve-se provavelmente pela não

seleção natural que existe dentro do borboletário e/ou pela continua reprodução entre indivíduos que possuem um parentesco próximo.

Para a realização deste trabalho, optou-se pela utilização de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* em quatro períodos gestacionais diferentes, 4 dias para a eclosão, 3 dias para a eclosão, 2 dias para a eclosão e 1 dia para a eclosão. Esta opção foi escolhida devido ao fato dos ovos nestes quatro períodos gestacionais possuírem grande quantidade de material biológico obtido do embrião e para a comparação da viabilidade e quantidade de células tronco embrionárias. As células obtidas dos embriões de *Caligo illioneus illioneus* apresentaram menor volume celular, tendo seu formato globóide, podendo ser observado seu núcleo localizado mais na extremidade próximo da membrana celular. As células apresentaram grande dispersão e sem a formação de aglomerados, tendo em suas passagens posteriores uma confluência em aproximadamente 96 horas após a cultura primária, dados semelhantes ao observado por Lynn (1996).

As células obtidas dos ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* em cultivo apresentou características como o desenvolvimento sem adesão ao substrato, tendo seu crescimento aumentado e influenciado diretamente pela temperatura. O aumento da temperatura, acelera a rapidez da multiplicação celular. Em temperatura controlada de 22°C o cultivo necessita ser expandido para uma nova passagem a cada 96 horas.

O explante proveniente do material biológico apresentou algumas células agrupadas, e em divisão celular, tendo formato globóide e com o núcleo bem delimitado. As culturas celulares apresentaram quantidades diferentes de células correlacionadas com a amostra utilizada na cultura. O aumento da quantidade de células em cultura foi comparado ao período gestacional do embrião, as culturas com ovos em período gestacional mais próximo da eclosão possuíam maior quantidade de células e menor quantidade de DNA fragmentado e debris, porém com sua viabilidade e período de cultura menor, apresentando também menos quantidade de células tronco viáveis. Os aspectos destes resultados reflete que, quanto mais próximo da eclosão, na fase final do período embrionário, há uma quantidade maior de células tronco diferenciadas.

As culturas celulares na terceira passagem apresentaram partes do explante do material biológico obtido da cultura primária em semiconfluência, na quarta passagem, todas as culturas apresentam total confluência e células de formato globóide e com baixo volume celular. Em quinta passagem, as culturas apresentaram formação de aglomerados e com perda da confluência.

O sucesso com o cultivo celular em insetos já foi demonstrado em várias linhagens celulares. O desenvolvimento de uma nova linhagem celular, em novas espécies, necessita de adaptações de protocolos, adequando, assim um protocolo distinto para cada material (LINN, 2001). No cultivo celular de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus*, as adaptações necessárias para o estabelecimento e obtenção de cultura primária e subculturas foram realizados e descritos neste estudo. A Cultura primária, coleta do material, acondicionamento em geladeira a 5°C, lavagem com solução Tween à 20% e 10% por duas vezes, agitação, lavagem, objetivando-se a retirada da camada de sujeira com contaminantes que se encontrava sobre os ovos. O protocolo com rendimento e maior viabilidade celular foi obtido a partir de 3 a 4 ovos.

O rompimento das cascas dos ovos foi realizada por maceração mecânica com a utilização do embolo de seringa estéril e adição de 5 mL de meio de cultura DMEM-High suplementado com 25% de soro fetal bovino (SFB), 5% de piruvato e 2% de antibiótico, estudos realizados por Stiles et al. (1992) e Mckenna et al. (1998) demonstraram que as linhagens iniciais de células de insetos indiferenciadas podem ser isentas de soro, diferentemente dos estabelecidos neste estudo que corrobora com Goodman et al. (2001) que também suplementou com SFB alguns de seus meios de cultura com utilizou de 1% a 3% de SFB, obtivemos resultados mais favoráveis com 25 % de suplementação de SFB em culturas primárias e 10% de suplementação em subculturas. Segundo Aguilar (2010) algumas culturas celulares de insetos utilizam um meio de cultura mais simples que as células de mamíferos.

Para a avaliação do melhor meio de cultura, rendimento e expansão dos clones celulares, as células isoladas foram colocadas em garrafas de cultura de 10 cm², contendo 5 mL de cada respectivo meio de cultura (Grace, MEN/ALFA, DEMEN-High e DEMEM) com o pH de cada meio ajustado entre 6,4 e 6,9. Trabalhos desenvolvidos por Wyatt (1961) sobre a bioquímica da hemolinfa (fluido circulatório de insetos) e mais recentemente por Maranga et al. (2003), viabilizaram o

desenvolvimento de meios de cultura nos quais as células de insetos se desenvolvem com maior eficiência. Sendo assim os meios de cultura celular com maior viabilidade na utilização para as células obtidas de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus* foram os meios DMEN-High e Grace, sendo que o meio utilizado neste trabalho foi o DMEN-High.

Fuchs et al. (2004) afirmaram que para melhor manutenção das células de insetos há a necessidade de manter o nicho celular similar ao original, para isso as células na garrafa de cultura foram resuspensas, misturadas vigorosamente por pipetagem e a solução retirada transferida para tubos Falcon estéril. As subculturas foram mantidas em temperatura de 22 a 25°C em estufa estéril sem adição de CO₂, assim como relatado por Batista (2003) que afirma haver uma maior facilidade na manutenção de células de insetos por não haver a necessidade da utilização do CO₂. Todas as passagens foram realizadas na proporção de 1:3 para cada subcultura com uma variação de 4 a 5 dias entre cada passagem. O cultivo in vitro de células de insetos deve ser realizado de forma criteriosa, mantidas as condições assépticas, principalmente porque estas células crescem lentamente do que os contaminantes existentes, como fungos e bactérias (BATISTA, 2003), e em temperatura superior a 30°C, favorece muito o desenvolvimento de patógenos do que a propriamente dita cultura das células.

As células obtidas do cultivo celular apresentaram menor volume celular, tendo seu formato globóide, podendo ser observado seu núcleo localizado mais na extremidade próximo a membrana celular, apresentando grande dispersão e sem a formação de aglomerados, pode-se observar algumas células com um maior volume celular, corroborando com Sudeep et al. (2005) em estudo realizado com linhagens celulares de *Aedes aegypti*, que descreveram três tipos celulares: células epiteliais, fibroblastóides e células gigantes.

A vida de uma célula é ritmada pelo ciclo celular, onde cada célula de um organismo sofre modificações cíclicas que a conduzem à divisão celular e à formação de duas células-filhas. O ciclo celular está dividido em 4 fases: a fase G1 (G para gap, que significa intervalo) durante a qual a célula cresce devido às sínteses protéicas, a fase S (S para síntese) durante a qual a célula duplica seu DNA, a fase G2 que é uma outra fase de crescimento e a fase M (M para mitose) que representa a divisão celular propriamente dita (ALBERTS et al. 2002). Em

organismos pluricelulares, os mecanismos de divisão celular são para permitir a embriogênese e o crescimento. Além disso, a divisão celular assegura a reparação tecidual ou celular após um ferimento que tenha promovido uma perda de células, e para a substituição de células mortas (POIRIER et al., 2003). Resultados do ciclo celular em células da amostra 1 e 2 demonstraram taxas de células na fase G0/G1 altas em P3 tendo portanto, uma quantidade maior de celular em síntese proteica, havendo diferença significativa entre ela e a P4 e P5, que apresentou quantidade menor de células em síntese proteica, possuindo assim um ciclo celular equilibrado. Na fase G2/M houve menor quantidade nas passagens P3 e P5, sendo a maior expressão na P4, possuindo esta fase um processo de divisão celular equilibrado. Em relação ao índice de células na fase S, este apresentou um crescimento progressivo de síntese e duplicação de DNA em P3, P4 e P5, e a quantidade de DNA fragmentado e debris apresentou um decaimento, havendo alta quantidade nas culturas de P3, demonstrando que durante as passagens houve uma estabilização da cultura celular havendo uma maior quantidade de células viáveis na P4 e P5.

A amostra 3 no estágio G0/G1 apresentou valores equilibrados de síntese proteica nas passagens P3, P4 e P5. Na fase G2/M houve poucas células na P3 e P5, tendo a maior expressão, porém com pouca significância em P4, demonstrando em P3, P4 e P5 pouca, porém constante divisão celular. Em relação ao índice de células na fase S do ciclo celular, este apresentou um equilíbrio na síntese e duplicação de DNA entre as passagens P3, P4 e P5. A quantidade de DNA fragmentado e debris obteve um resultado semelhante as amostras 1 e 2, houve um decaimento entre as passagens P3 e P4, tendo posteriormente um pequeno aumento na P5, demonstrando o início da queda de viabilidade desta cultura. Diferenciando das amostras anteriores, a amostra 4 apresentou células no estágio G0/G1 com valores decrescentes de síntese proteica entre as passagens P3, P4 e P5. Na fase G2/M houve baixos valores de células em divisão celular, com extrema insignificância nas passagens P4 e P5, sendo que a passagens P3 não apresentou células na fase G2/M. As células em síntese e duplicação do DNA, na fase S do ciclo celular na P3 e P4 foram baixas em relação à P5 que apresentou um alto valor de significância, superior a 60% da amostra. Entretanto demonstrou resultados onde em suas primeiras passagens P3 e P4, apresentaram pouca quantidade de DNA fragmentado e debris, ou seja, uma maior quantidade de células viáveis para a

cultura, porém, posteriormente houve um aumento significativo de DNA fragmentado e debris em P5 demonstrando um período menor de viabilidade da cultura e quantidade menor de células embrionárias indiferenciadas.

Estes dados obtidos nas fases do ciclo celular demonstraram que as células estavam realizando os processos naturais de interfase e de divisão celular. Alberts (2002) afirma que o ciclo celular é necessário para produzir cópias celulares responsáveis pela manutenção de células mortas de um tecido e pelo desenvolvimento embrionário, no qual o indivíduo se forma a partir de uma única célula, onde ocorrem multiplicação e diferenciação celular.

Para a realização das análises de imunofenotipagem por citometria de fluxo, foram utilizados marcadores para a caracterização celular das culturas, os quais expressam proteínas presente em células de origem mesenquimal, células tronco embrionárias, células do sistema nervoso, apoptose, vesículas endossômicas, complexo de Golgi, axônios e marcadores específicos de insetos utilizados em mosca do Gênero *Drosophila*. Os marcadores de células mesenquimais utilizados neste trabalho foram: Stro-1, Vimentina e CD 90.

A expressão do marcador Stro-1 foi positiva acima de 25% nas culturas das amostras 2 em P3, amostra 3 em P5 e amostra 4 em P5. Diminuindo sua expressão nas amostras 1 em P3 e P5, amostra 2 em P5, amostra 3 em P3 e amostra 4 em P3. Portanto o marcador Stro-1 atinge maiores índices de expressão nas células que já iniciaram sua diferenciação. Estas células nos vertebrados podem ser diferenciadas em três tipos celulares: osteogênica, condrogênica e adipogênica (BYDLOWSKI et al., 2009), porém nos invertebrados a única linhagem que ela poderá se diferenciar é na adipogênica.

A expressão da Vimentina foi positiva em todas as passagens de todas as amostras, segundo Rivas et al. (2013) estas células por apresentar a alta capacidade de diferenciação celular são comumente utilizadas em pesquisas de regeneração tecidual.

O marcador CD 90 obteve menor expressão em todas as passagens de todas as amostras, apresentando sua melhor marcação nas primeiras passagens e menores marcações em últimas passagens, portanto marcando melhor células ainda não diferenciadas, corroborando com Loeb et al. (2003), que obteve células de monocamada epitelial, células caliciformes, colunares, células secretoras e células

tronco epiteliais em cultura celular de intestino de lagartas de lepidópteras (*Heliothis virescens*). Sendo assim, quando as células de intestino já estão diferenciadas, não apresentam células precursoras mesenquimais.

Dos dois marcadores de pluripotência avaliados neste trabalho, um obteve fraca marcação e o outro foi altamente expresso. O Oct 3/4 apresentou menor expressão. Já o marcador Sox2 foi altamente expresso nas quatro amostras em todas as passagens. Estes marcadores de pluripotencia celular, são expressos em células embrionárias (ZANG; CUI, 2014), possuindo estas células a capacidade de se diferenciar em qualquer tecido, assim tornando-se instáveis geneticamente (ABREU et al., 2008; CARRION et al., 2009; YARAK; OKAMOTO, 2010).

Os marcadores HSP 70 e Caspase 3 foram utilizados para a expressão de morte celular por apoptose. O marcador HSP 70 foi expresso em todas as amostras e em todas as passagens, neste processo, a morte por apoptose serve para manter a homeostase nos organismos multicelulares (MEÇA et al., 2010), Sendo assim, como existem células embrionadas que estão se diferenciando com o passar do tempo é comum encontrarmos algumas células em apoptose. A Caspase 3 ativado apresentou alta expressão, Schiestl; Wintersberger (1992) citam que a presença de células em apoptose estão sendo implicadas em vários processos de diferenciação celular. Assim, quando os tecidos embrionários sofrem involução estas proteínas se auto-degeneram (HENGARTNER, 2000).

O marcador Anti Rab-5 expressa em vesículas endossomícas, foi fortemente expresso em todas as amostras e em todas as passagens. Resultado semelhante ao apresentado por Zschätzsch et al. (2014), onde o marcador Anti RAB-5 obteve forte expressão nas regiões que se encontram os neurônios primários e Meli et al. (2014) no retículo endoplasmático de *Drosophila*.

Entre os marcadores específicos de linhagens celulares de insetos, o marcador Axons BP 102, que marca axônios, apresentou alta expressão na amostra 4, tal dado talvez tenha sido obtido pelo fato desta amostra se apresentar no período final do desenvolvimento embrionário. Fraichard et al. (2006) e Magalhães et al. (2007) apresentaram resultados semelhantes em células embrionárias de *Drosophila* e em matriz extracelular durante o desenvolvimento embrionário de *Drosophila*, o que reforça esta hipótese.

O segundo marcador específico de insetos foi o GM130, este marcador é expresso no grupo do complexo multimérico denominado complexo Retremer, envolvido no transporte de proteínas a partir de endossomos para a rede Trans-Golgi do Aparelho de Golgi. O complexo Retremer é necessário para reciclagem de rodopsina. E esta por sua vez é um receptor acoplado a uma proteína que funciona como sensor de luz em fotorreceptores dos olhos dos insetos. Os insetos apresentam olhos compostos, alguns insetos apresentam em média 800 unidades de olhos hexagonais, e cada unidade, destas pode possuir cerca de oito locais que expressam a rodopsina (WANG et al., 2014). O último marcador específico de insetos utilizado que se mostrou expresso foi o Dro. FMR1, marcador relacionado a células do sistema nervoso presentes em endossomos primários localizados próximos a membrana plasmática. No início da reciclagem dos endossomos encontra-se presente o fator EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), responsável pela localização de filopodia de neurônios primários em *Drosophila*, e a endocitose que regula a distribuição espacial de sinalização de EGFR em vários tipos de células epiteliais *in vitro*, e também de neurônios *in vivo* (ZSCHÄTZSCH et al., 2014).

Para realizar o experimento de potencial elétrico e funcional da membrana mitocondrial utilizou-se a Rodamina-123 (Rh-123), que é um fluocromo catiônico carregado positivamente específico para marcação mitocondrial em células vivas, assim permitindo que seja atraído pelo elevado potencial elétrico negativo presente na membrana mitocondrial, incorporando-se no interior destas organelas.

Alterações na integridade mitocondrial podem ser detectadas através do aumento da fluorescência verde citosólica, indicando uma difusão da Rh-123 da mitocôndria para o citosol (JOHNSON et al., 1980). Os resultados obtidos do potencial elétrico da membrana mitocondrial foram avaliados pela incorporação da Rh-123 através da intensidade de fluorescência FL-1, onde não evidenciaram diferenças significativas na porcentagem de células metabolicamente ativas (AT) e células metabolicamente inativas (IN) quando comparando as culturas primárias da amostra 1, 2, 3 e 4. Não apresentando também diferenças significativas quando comparando as amostras 1, 2, 3 e 4 em terceira passagem (P3) e quinta passagem (P5).

Muitos estudos de grande relevância estão sendo realizados com Lepidópteras como os de Gracia-Barros (1988); Miller (1991); Freitas; Oliveira (1992); Garcia-Barros (1999) e Freitas; Brown (2004). Sendo diversos relacionados ao Gênero *Caligo* como os trabalhos de Casagrande (2002); Wahlberg et al. (2003); Freitas; Brown (2004); Mielke; Casagrande (2006); Souza et al. (2006); Penz (2007) e Casagrande; Mielke (2008). A muito tempo percebeu-se que é de suma importância estudos relacionados à utilização de células obtidas de insetos (CESTARI; SIMÕES, 1978; LYNN; OBERLANDER, 1983; MITSUHASHI, 1984; DOE et al., 1998; LYNN, 2000; SPRADLING et al., 2001; GOODMAN et al., 2001; LYNN, 2001; MICCHELLI; PERRIMON, 2006; OHLSTEIN; SPRADLING, 2006; FULLER; SPRADLING, 2007; KIRILLY; XIE, 2007; AGUILAR, 2010; MATUNIS et al., 2012).

Ainda mais importante quando a espécie apresenta importância ecológica, médica e em controle de pragas nas ciências agrárias (CLEARE, 1926; MALO; WILLIS, 1961; SILVA et al., 1968; GUAGLIUMI, 1972; CASAGRANDE, 1979; ACKERY, 1988; GÓMEZ; LASTRA BORJA, 1995; GÓMEZ; LASTRA BORJA, 1998; PENZ et al., 1999; GALLO et al., 2002; SOUZA et al., 2006). Este estudo comparou as caracterizações e descreveu detalhes morfológicos da espécie *Caligo illioneus illioneus*, sendo ainda mais sucinto na descrição de aspectos morfométricos existentes no cório do ovo nunca antes descritos para esta espécie. Elaborou-se um protocolo funcional de cultivo de células de Lepidópteras com o intuito de padronizar e facilitar futuros estudos onde se faz necessário a utilização de células obtidas a partir de Lepidópteras, para isso realizou-se a obtenção e caracterização de células tronco indiferenciadas obtidas de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus*, para a possibilidade de futuros estudos com base em insetos vetores de doenças, insetos praga e insetos com importância ecológica em seu meio ambiente.

8 CONCLUSÃO

Conclui-se:

- Confirmou-se através da anatomia, morfologia e taxonomia, a espécie como sendo *Caligo illioneus illioneus*.
- Através das ultraestruturas presentes no cório do ovo, foi possível atribuir caracteres taxonômicos de diferenciação entre espécies e subespécies do Gênero *Caligo*.
- Foi possível estabelecer um protocolo de cultura celular para lepidópteras sem patógenos ou agentes contaminantes utilizando células tronco de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus*.
- Os ovos embrionados possuem células indiferenciadas e com grande potencial de proliferação celular.
- Os ovos com 3 e 4 dias para a eclosão apresentaram maior viabilidade e duração em cultura celular.
- Os marcadores utilizados neste trabalho apresentam expressão positiva para as células indiferenciadas de ovos embrionados de *Caligo illioneus illioneus*.

REFERÊNCIAS

- ACKERY, P. R. Hostplants and classification: a review of Nymphalid butterflies. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 33, p. 95-203, 1988.
- AGUILAR, M.A. **Estudo cinético de células de *Drosophila melanogaster* transfectadas para a produção de glicoproteína do vírus da raiva em biorreator**. 2010. 124 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 4 ed. New York: Garland Science, 2002. 1616 p.
- ALTIERI, M. A.; SILVA, E. N.; NICCHOLLS, C. I. **O Papel da biodiversidade no manejo de pragas**. Ribeirão Preto: Holos, 2003. 226 p.
- ASSIS, S. M. P.; MARIAN, R. R. L.; GONDIM JR., M. G. C.; MENEZES, M.; ROSA, R. C. T. **Doenças e pragas das helicônias: diseases and pests of heliconias**. Recife: UFRPE, 2002. 102 p.
- BARROSO, L. Gestação de fetos anencéfalos e pesquisas com células-tronco: dois temas acerca da vida e da dignidade na constituição. **Panóptica**, v. 1, n. 7, p. 1-6, 2007.
- BATISTA, F. R. X. **Desenvolvimento de meio de cultura para células de inseto e avaliação do potencial de replicação de baculovírus** 2003. 278 f. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
- BATISTA-DA-SILVA, J. A.; ABÁDIO, H. C.; QUEIROZ, M. M. C. Miíase humana por *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr.) (Diptera, Cuterebridae) e *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) (Diptera, Calliphoridae) em sucessão parasitária. **EntomoBrasilis**, v. 2, n. 2, p. 61-63, 2009.
- BELLOTTI, A. C.; SMITH, L.; LAPOINTE, L. S. Recent advances in cassava pest management. **Annual Review of Entomology**, v. 44, p. 343-370, 1999.
- BIELZA, P.; QUINTO, V.; FERNANDEZ, E.; GRAVALOS, C.; CONTRERAS, J. Genetics of spinosad resistance in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 100, n. 3, p. 916-920, 2007.
- BITTENCOURT, M. A. L.; BOARETTO, L.; SERAFIM, I.; FILHO, E. B. Fauna de lepidóptera associada a um ecossistema natural no estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, n. 1, p. 85-87, 2003.
- BLACK, B. C.; BRENNAN, L. A.; DIERKS, P. M.; GARD, I. E. Commercialization of baculoviral insecticides. In: MILLER, L.K. (ed.). **The Baculoviruses**, New York: Plenum Press, 1997, p. 341-387.
- BLACK, M.; FOLMER, O.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 294–299, 1994.

BLANK, U.; KARLSSON, G.; KARLSSON, S. Signaling pathways governing stem-cell fate. **Blood**, v.15, p. 492–503, 2008.

BROWN JR, K. S. Borboletas da Serra do Japi: diversidade, habitats, recursos alimentares e variação temporal. In: MORELLATO, L. (Ed.). **História Natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no sudeste do Brasil**, Campinas: UNICAMP, 1992. p. 142-187.

CAMARGO, A. J. A.; SCHMIDT, K. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**: Efeitos da fragmentação sobre a biodiversidade de Saturniidae (Lepidoptera) em isolados naturais e antrópicos de Cerrado. Distrito Federal: Embrapa Cerrados, 2009. 30 p.

CASAGRANDE, M. M. Brassolini. In: Lamas, G. **Atlas of neotropical lepidoptera, Checklist**. Florida: Scientific Publishers, 2004. p. 201-205.

_____. Naropini Stichel, taxonomia e imaturos (Lepidoptera, Nymphalidae, Brassolinae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 19, n. 2, p. 467-569, 2002.

_____. Sobre *Caligo beltrao* (Illiger). I: Taxonomia, biologia, morfologia das fases imaturas e distribuições espacial e temporal (Lepidoptera, Satyridae, Brassolinae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 39, n. 1, p. 173-193, 1979.

CASAGRANDE, M. M.; MIELKE, O. H. H. A note on the life history of *Caligo brasiliensis brasiliensis* (Lepidoptera, Nymphalidae, Morphinae). **Tropical Lepidoptera**, v. 18, p. 9-11, 2008.

_____. Larva de quinto estágio e pupa de *Caligo martia* (Godart). (Lepidoptera, Nymphalidae, Brassolinae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 17, p. 75-79, 2000.

CASIDA, J. E. Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticide action. **Chemical Research in Toxicology**, v. 22, n. 4, p. 609-619, 2009.

CESTARI, A. N., SIMÕES, L. C. G. Cultura de tecidos em insetos. **Anais do Simpósio sobre Cultura de Células**, v. 10, p. 143-191, 1978.

CLEARE, L. D. On the life-history of *Caligo illioneus illioneus*, Cram. (Lep., Morphidae). **Transactions of the Entomological Society of London**, v. 76, p. 361-366, 1926.

COSTA-LIMA, A. **Insetos do Brasil**. 6. ed. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agricultura, 1950. 420 p.

_____. **Terceiro catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil**. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, 1936. 460 p.

COSTA, E. L. N.; LUCHO, A. P. R.; FRITZ, L. L.; FIUZA, L. M. Artrópodes e bactérias entomopatogênicos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 38, p. 4-13, 2010.

CROZATIER, M.; MEISTER, M. Drosophila haematopoiesis. **Cell Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 1117-1126, 2007.

DELL'ERBA R.; KAMINSKI, L. A.; MOREIRA, G. R. P. O estágio de ovo dos Heliconiini (Lepidoptera, Nymphalidae) do Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Série Zoologia**, v. 95, n. 1, p. 29-46, 2005.

DOE, C. Q.; FUERSTENBERG, S.; PENG, C. Y. Neural stem cells: from fly to vertebrates. **Journal of Neurobiology**, v. 36, n. 2, p. 111-127, 1998.

DOWNEY, J. C.; ALLYN, A. C. Chorionic aculpturing in eggs of Lycaenidae: Part I. **Bulletin of the Allyn Museum**, v. 61, p. 1-29, 1981.

DREWS, M.; PAALME, T.; VILU, R. The growth and nutrient utilization of the insect cell line *Spodoptera frugiperda* Sf9 in batch and continuous culture. **Journal of Biotechnology**, v. 40, p. 187-198, 1995.

DUARTE, E. C.; FONTES, C. J. Associação entre a produção anual de ouro em garimpos e incidência de malária em Mato Grosso - Brazil, 1985-1996. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 665-668, 2002.

FAGOT-LARGEAULT, A. Embriões, células-tronco e terapias celulares: questões filosóficas e antropológicas. **Estudos Avançados**, v. 18, n. 51, p. 227-245, 2004.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; CAMPOS FILHO, M. D.; SANTIAGO, A. C. C.; FROTA, F. S. **Manejo Integrado do mandarová-da-mandioca *Erinnyis ello* (L.) (Lepidoptera, Shingidae): conceitos e experiências na Região do Vale do Rio Juruá**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2007. 45 p.

FFRENCH-CONSTANT, R.; ROUSH, R. T.; CARINO, F. A. *Drosophila* as a tool for investigating the molecular genetics of insecticide resistance. In: OAKESHOTT, J. G.; WHITTEN, M. J. (Ed.). **Molecular approaches to fundamental and applied entomology**. New York: Springer, 1993. p. 1-37.

FORRATTINI, O. P. **Culicidologia médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2002. v. 2, 549 p.

FRAICHARD, S. *Tenectin, a novel extracellular matrix protein expressed during *Drosophila melanogaster* embryonic development*. **Gene Expression Patterns**, v. 6, p. 772-776, 2006.

FREITAS, A. V. L.; BROWN, K. S. Phylogeny of the Nymphalidae (Lepidoptera). **Systematic Biology**, v. 53, n. 3, p. 1-25, 2004.

FREITAS, A. V. L.; OLIVEIRA, P. S. Biology and behavior of the neotropical butterfly *Eunica bechina* (Nymphalidae) with special reference to larval defence against ant predation. **Journal of Research on the Lepidoptera**, v. 31, n. 1-2, p. 1-11, 1992.

FRESHNEY, R. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 2. ed. New York: Wiley-Liss, 1987. 397 p.

FUCHS, E.; TUMBAR, T.; GUASCH, G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. **Cell**, v. 116, n. 6, p. 769-778, 2004.

FULLER, M. T.; SPRADLING, A. C. Male and female *Drosophila* germline stem cells: two versions of immortality. **Science**, v. 316, p. 402-404, 2007.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA-NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI-FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GARCÍA-BARROS, E. **Estudio comparativo de la biología y morfología de cuatro especies de *Hipparchia Fabricius* (Lepidoptera, Satyridae)**. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid, 1988. 379 p.

_____. Filogenia y evolución de Lepidoptera. **Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa**, v. 26, p. 475-483, 1999.

GELERTER, W. D.; FEDERICI, B. A. Continuous cell line from *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) that supports replication of nuclear polyhedrosis viruses from *Spodoptera exigua* and *Autographa californica*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 48, n. 2, p. 199-207, 1986.

GÓMEZ, L. A.; LASTRA BORJA, L. A. *Caligo illioneus*: el gusano cabrito. **Cenicaña**, v. 20, n. 1, p. 08-14, 1998.

_____. Insectos asociados con la caña de azúcar en Colombia. In: CENICAÑA, **El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia**. Cali: Cenicaña, 1995, 237-263 p.

GOODMAN, C. L.; MCINTOSH, A. H. Production of baculovirus for insect control using cell culture. In: MARAMOROSCH, K., MCINTOSH, A.H. (Ed.). **Insect cell biotechnology**. Florida: CRC Press, 1994. p. 33-56.

GOODMAN, C. L.; MCINTOSH, A. H.; EL SAYED, G. N.; GRASELA, J. J.; STILES, B. Production of selected baculoviruses in newly established Lepidopteran cell lines. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 37, n. 6, p. 374-379, 2001.

GRACE, T. D. C. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown *in vitro*. **Nature**, v. 195, p. 788-789, 1962.

_____. Prolonged survival and growth of insect ovarian tissue *In vitro* conditions. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 77, p. 275-282, 1959.

GUAGLIUMI, P. **Pragas da cana-de-açúcar do Nordeste do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto do Açúcar e do Alcool, 1972. 622 p. (Coleção Canavieira nº10).

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

HINTON, H. E. Insect eggshells. **Scientific American**, v. 223, n. 2, p. 84-91, 1970.

HSU, S. H.; LI, S. Y.; CROSS, J. H. A cell line derived from ovarian tissue of *Culex tritaenior hynchus* morosus Dyar. **Journal of Medical Entomology**, v. 9, p. 86-91, 1972.

HOSHINO, K.; HIROSE, M.; IWABUCHI, K. A new insect cell line from the longicorn beetle *Plagionotus christophi* (Coleoptera: Cerambycidae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 45, n. 1-2, p. 19-22, 2009.

IKONOMOU, L.; SCHNEIDER, Y. J.; AGATHOS, S. N. insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 6, p. 1-20, 2003.

JOHNSON, L. V.; WALSH, M. L.; BOCKUS, B. J.; CHEN, L. B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 77, p. 990-994, 1980.

KAI, T.; SPRADLING, A. Differentiating germ cells can revert into functional stem cells in *Drosophila melanogaster* ovaries. **Nature**, v. 428, p. 564-569, 2004.

KARIUKI, C. W.; MCINTOSH, A. H.; GOODMAN, C. L. *In vitro* host range studies with a new baculovirus isolate from the diamondback moth *Plutella xylostella* (L.) (Plutellidae: Lepidoptera). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 36, n. 4, p. 271-276, 2000.

KATSURUGAWA, T. H.; CUNHA, R. P. A.; SOUZA, D. C. A.; GIL, L. H. S.; CRUZ, R. B.; SILVA, A. A.; TADA, M. S.; SILVA, L. H. P. Malária e aspectos hematológicos em moradores da área de influência dos futuros reservatórios das hidrelétricas de Santo Antonio e Jirau, Rondônia, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, p. 1486-1492, 2009.

KIRILLY, D.; XIE, T. The *Drosophila* ovary: an active stem cell community. **Cell Research**, v. 17, n. 1, p. 15-25, 2007.

KITCHING, I. J.; CADIOU, J. M. **Hawkmoths of the World: an annotated and illustrated revisionary checklist (Lepidoptera: Sphingidae)**. 1 ed. New York: Natural History Museum, 2000, 226 p.

KOIFMAN, S. Geração e transmissão da energia elétrica: impacto sobre os povos indígenas no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, p. 413-423, 2001.

KRZEMIEN, J.; DUBOIS, L.; MAKKI, R.; MEISTER, M.; VICENT, A.; CROZATIER, M. Control of blood cell homeostasis in *Drosophila* larvae by the posterior signaling centre. **Nature**, v. 446, p. 325-328, 2007.

LEMAIRE, C.; MINET, J. The Bombycoidea and their Relatives. In: KRISTENSEN, N. P. (ed). **Handbook of Zoology**. Berlin: Walter de Gruyter, 1998, p. 321-343.

LOEB, M. J.; CLARK, E. A.; BLACKBURN, M.; HAKIM, R. S.; ELSIN, K.; SMAGGHE, G. Stem cells from midguts of Lepidoptera larvae: Clues to the regulation of stem cell fate. **Archives of Insects Biochemistry and Physiology**, v. 53, p. 186-198, 2003.

LORENZI, H.; H. M. SOUZA. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 3. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2001. 1087 p.

LYNN, D. E. Development and characterization of insect cell lines. **Cytotechnology**, v. 20, p. 3-11, 1996.

_____. Effects of long- and short-term passage of insect cells in different culture media on baculovirus replication. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 76, n. 3, p. 164-168, 2000.

_____. Novel techniques to establish new insect cell lines. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 37, n. 6, p. 319-321, 2001.

LYNN, D. E.; OBERLANDER, H. The establishment of cell lines from imaginal wing discs of *Spodoptera frugiperda* and *Plodia interpunctella*. **Journal of Insect Physiology**, v. 29, p. 591-596, 1983.

LYNN, D. E.; SHAPIRO, M. New cell lines from *Heliothis virescens*: characterization and susceptibility to baculoviruses. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 72, p. 276-280, 1998.

- MAGALHÃES, T. R.; PALMER, J.; TOMANCAK, P.; POLLARD, K.S. *Transcriptional control in embryonic Drosophila midline guidance assessed through a whole genome approach*. **BMC Neuroscience**, v. 8, p. 59, 2007.
- MALO, F.; WILLIS, E. R. Life history and biological control of *Caligo eurilochus*, a pest of banana. **Journal Economic Entomology**, v. 54, n. 3, p. 530-536, 1961.
- MANDAL, L.; MARTINEZ-AGOSTO, J. A.; EVANS, C. J.; HARTENSTEIN, V.; BANERJEE, U. A Hedgehog- and Antennapedia-dependent niche maintains Drosophila haematopoietic precursors. **Nature**, v. 446, p. 320-324, 2007.
- MANSENGH, F. C.; WRIDE, M. A.; RANCOURT, D. E. Neurons from stem cells: implications for understanding nervous system development and repair. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 78, p. 613-628, 2000.
- MARANGA, L.; MENDONÇA, R. Z.; BENGALA, A.; PEIXOTO, C. C.; MORAES, R. H. P.; PEREIRA, C. A.; CARRONDO, M. J. T. Enhancement of Cell Growth and Longevity Through Supplementation of Culture Medium with Hemolymph. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 58-63, 2003.
- MARCICANO, M. L.; LIMA, I. M. M.; TAVARES, M. T.; CASAGRANDE, M. M. Parasitism of *Brassolis sophorae laurentii* Stichel (Lepidoptera, Nymphalidae, Brassolini) pupae by *Conura morleyi* (Ashmead) (Hymenoptera, Chalcididae, Chalcidini), in the State of Alagoas, Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 36, p. 629-631, 2007.
- MARTINEZ-AGOSTO, J. A.; MIKKOLA, H. K.; HARTENSTEIN, V.; BANERJEE, U. The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view. **Genes & Development**, v. 21, n. 23, p. 3044-3060, 2007.
- MATUNIS, E. L.; STINE, R. R.; DE CUEVAS, M. Recent advances in Drosophila male germline stem cell biology. **Spermatogenesis**, v. 2, n. 3, p. 137-144, 2012.
- MCINTOSH, A. H.; IGNOFFO, C. M. Replication and infectivity of the single embedded nuclear polyhedrosis virus, baculovirus Heliopsis, in homologous cell lines. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 37, p. 258-264, 1981.
- MCKENNA, K. A.; HONG, H.; VANNUNEN, E.; GRANADOS, R. R. Establishment of new Trichoplusia in cell lines in serum-free medium for baculovirus and recombinant protein production. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 71, p. 82-90, 1998.
- MCKENZIE, J. A.; BATTERHAM, P. Predicting insecticide resistance: mutagenesis, selection and response. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 353, n. 1376, p. 1729-1734, 1998.
- MEÇA, K. K. O. L.; MARTINS, A. S.; DEL PUERTO, H. L.; VASCONCELOS, A. C. Apoptose e expressão de Bcl-2 e das caspases 3 e 8 em placenta bovina, em diferentes estádios de gestação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 2, p. 258-264, 2010.
- MELI G.; LECCI, M.; MANCA, A.; KRAKO, N.; ALBERTINI, V.; BENUSSI, L.; GHIDONI, R.; CATTANEO, A. Conformational targeting of intracellular A β oligomers demonstrates their pathological oligomerization inside the endoplasmic reticulum. **Nature Communications**, v. 5, p. 3867, 2014.

- MENDONÇA, R. Z; PALOMARES, L. A; RAMÍZES, O. T. An Insight into Insect Cell metabolism through selective nutrient manipulation. **Journal of Biotechnology**, v. 72, p. 61-75, 1999.
- MICCHELLI, C. A.; PERRIMON, N. Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. **Nature**, v. 439, p. 475-479, 2006.
- MICHAEL, M. P. **Insetos: guia prático**. São Paulo: Nobel, 1999. 64 p.
- MICHIGAN STATE UNIVERSITY. **Arthropod pesticide resistance database (APRD)**. 2015. Disponível: <http://www.pesticideresistance.com>. Acesso em: 15 de jun. de 2015.
- MIELKE, O. H. H.; CASAGRANDE, M. M. Catálogo Bibliográfico dos taxa superiores da Ordem Lepidoptera. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, p. 01-41, 2006.
- MILLER, J. S. Cladistics and classification of the notodontidae (Lepidoptera: Noctuoidea) based on larval and adult morphology. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 204, p. 1-230, 1991.
- MILTENBURGER, H. G. NASER, W. L.; HARVEY, J. P. The cellular substrate: a very important requirement for baculovirus in vitro replication. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 39, n. 9-10, p. 993-1002, 1984.
- MITSUHASHI, J. Isolation of continuous cell line from larval fat bodies of an arctiid moth, *Spilarctia seriatopuntata* (Insecta, Lepidoptera, Arctiidae). **Zoological Science**, v. 1, p. 415-419, 1984.
- MOTA-SANCHEZ, D.; BILLS, P. S.; WHALON, M. E. Arthropod resistance to pesticides: status and overview. In: WHEELER, W. B. (Ed.). **Pesticides in agriculture and the environmental**. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 241-272.
- MURHAMMER, D. W. Production of viral insecticides in cell culture and their use for pest control. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 59, p. 199-220, 1996.
- MUYSHONDT, A.; YOUNG, A. M.; MUYSHONDT JR, A. The biology of the butterfly *Dione juno huascama* (Nymphalidae: Heliconiinae) in El Salvador. **Journal of the New York Entomological Society**, v. 81, n. 3, p. 137-151, 1973.
- NETO, S. S.; NAKANO, O.; BARBIM, D.; NOVA, N. A. V. **Manual de ecologia dos insetos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1976. 419 p.
- NYSTUL, T. G.; SPRADLING, A. An epithelial niche in the *Drosophila* ovary undergoes long-range stem cell replacement. **Cell Stem Cell**, v. 1, n. 3, p. 277-285, 2007.
- ODORICO, J. S.; KAUFMAN, D. S.; THOMSON, J. A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. **Stem Cells**, v. 19, n. 3, p. 193-204, 2001.
- OHLSTEIN, B.; KAI, T.; DECOTTO, E.; SPRADLING, A. The stem cell niche: theme and variations. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, n. 6, p. 693-699, 2004.
- OHLSTEIN, B.; SPRADLING, A. The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. **Nature**, v. 439, p. 470-474, 2006.

OTERO, L. S.; CASAGRANDE, M. M. Hibridismo em Brassolinae (Lepidoptera, Nymphalidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 36, p. 723-728, 1992.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole Ltda., 2002. 635 p.

PEARSON, J.; LOPEZ-ONIEVA, L.; ROJAS-RIOS, P. GONZALEZ-REYES, A. Recent advances in Drosophila stem cell biology. **International Journal of Development Biology**, v. 53, n. 8-10, p. 1329-1339, 2009.

PENZ, C. M. Evaluating the monophyly and phylogenetic relationships of Brassolini genera (Lepidoptera, Nymphalidae). **Systematic Entomology**, v. 10, p. 1-22, 2007.

PENZ, C. M.; AIELLO, A.; SRYGLEY, R. B. Early stages of *Caligo illioneus* and *Caligo idomeneus* (Nymphalidae, Brassolinae) from Panama, with remarks on larval food plants for the subfamily. **Journal of Lepidopterists' Society**, v. 53, p. 142-152, 1999.

PEREIRA, S. E.; CHIARADIA, P. R. L. P.; FIGUEIREDO, R. M. percepção social, epidemiologia e condições de desenvolvimento da dengue na cidade de Jundiaí, SP. **Argumento**, v. 4, n. 8, p. 11-21, 2002.

PERRY, T.; BATTERHAM, P.; DABORN, P. J. The biology of insecticidal activity and resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 7, p. 411-422, 2011.

PERRY, T.; MCKENZIE, J. A.; BATTERHAM, P. A Dalpha6 knockout strain of *Drosophila melanogaster* confers a high level of resistance to spinosad. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 2, p. 184-188, 2007.

POIRIER, K.; CHALAS, C.; TISSIER, F.; COUVERT, P.; MALLET, V.; CARRIE, A.; MARCHIO, A.; SARLI, D.; GICQUEL, C.; CHAUSSADE, S.; BELJORD, C.; CHELLY, J.; KERJEAN, A.; TERRIS, B. Loss of parental-specific methylation at the IGF2 locus in human hepatocellular carcinoma. **Journal of Pathology**, v. 201, n. 3, p. 473-479, 2003.

REY, G. J.; FERRO, C.; BELLO, F. J. Establishment and characterization of a new continuous cell line from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and its susceptibility to infections with Arboviruses and *Leishmania chagasi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 1, p. 103-110, 2000.

REYA, T.; MORRISON, S. J.; CLARKE, M. F.; WEISSMAN, I. L. Stem cells, cancer and cancer stem cells. **Nature**, v. 414, p. 105-111, 2001.

ROTH, S. *Drosophila* oogenesis: coordinating germ line and soma. **Current Biology**, v.11, n.19, p. 779-781, 2001.

SAHAI-HERNANDEZ, P.; CASTANIETO, A.; NYSTUL, T. G. *Drosophila* models of epithelial stem cells and their niches. **Developmental Biology**, v. 1, n. 3, p. 447-457, 2012.

SANCHEZ-SOTO, S.; NAKANO, O. Novo registro de lepidoptera na cultura do milho no Brasil. **Neotropical Entomology**, v. 23, n. 2, p. 365-366, 2003.

SANDERSON, C. S.; BARFORD, J. P.; BARTON, G. W.; WONG, T. K. K.; REID, S. A Structure, Dynamic Model for Animal Cell Culture: Application to Baculovirus/Insect Cell System. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3, p. 219-229, 1999.

- SANTANA, H. R. G.; MARQUES, O. M.; TANGERINI, N. Ocorrência de *Leucanella memusae gardineri* Lemaire (Lepidoptera: Saturniidae) em bananeira (Musaceae). **Magistra**, v. 17, n. 3, p. 146-147, 2005.
- SANTOS, M. R. A.; TIMBÓ, A. L. O.; CARVALHO, A. C. P. P.; MORAIS, J. P. S. Estudo de adubos e substratos orgânicos no desenvolvimento de mudas micropropagadas de helicônia. **Horticultura Brasileira**, v. 24, p. 273-278, 2006.
- SCHIESTL, R. H.; WINTERSBERGER, U. DNA damage induced mating type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutation Research**, v. 284, p. 111-123, 1992.
- SCHULDINER, M.; YANUKA, O.; ISKOVITZ-ELDOR, J.; MELTON, D. A.; BENVENISTY, N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 97, p. 11307-11312, 2000.
- SEGURA, N. A.; SANTAMARIA, E.; CABRERA, O. L.; BELLO, F. Establishment and characterization of a new cell line derived from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 1, p. 89-95, 2012.
- SILVA-NUNES, M.; CODEÇO, C. T.; MALAFRONTTE, R. S.; SILVA, N.S.; JUNCANSEN, C.; MUNIZ, T. P. Malaria on the Amazonian frontier: transmission dynamics, risk factors, spatial distribution, and prospects for control. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, p. 624-35, 2008.
- SILVA, A. G. A.; GONÇALVES, C. R.; GALVÃO, D. M.; GONÇALVES, A. J. L.; GOMES, J.; SILVA, M. N.; SIMONI, L. **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil, seus parasitos e predadores**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1968. 622 p.
- SLACK, J. M. W. Stem cells in epithelial tissues. **Science**, v. 287, p.1431-1433, 2000.
- SMAGGHE, G.; GOODMAN, C. L.; STANLEY, D. Insect cell culture and applications to research and pest management. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, v. 45, p. 93-105, 2009.
- SOUZA, N. A.; VEIGA, A. F. S. L.; CASAGRANDE, M. M.; GONDIM JR, M. G. C. Morfologia externa dos imaturos de *Caligo teucer* (Linnaeus) (Lepidoptera, Nymphalidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n. 4, p. 1243-1250, 2006.
- SOUZA, V. F.; LIMA, L. M. C; REIS, S. R. A; RAMALHO, L. M. P; SANTOS, J. N. Células-tronco: uma breve revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 2, n. 2, p. 251-256, 2003.
- SPECHT, M. J. S.; PALUCH, M. Estágios Imaturos de *Caligo illioneus illioneus* (Cramer) (Nymphalidae: Morphinae: Brassolini). **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 6, p. 801-808, 2009.
- SPRADLING, A. C; CUEVAS, M.; DRUMMOND-BARBOSA, D.; KEYES, L.; LILLY, M.; PEPLING, M.; XIE, T. The *Drosophila* germarium stem cells, germ line cysts, and oocytes. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 62, p. 25-34, 1997.
- SPRADLING, A.; DRUMMOND-BARBOSA, D.; KAI, T. Stem cells find their niche. **Nature**, v. 414, p. 98-104, 2001.

SRYGLEY, R. B.; PENZ, C. M. Lekking in Neotropical Owl Butterflies, *Caligo illioneus* and *C. oileus* (Lepidoptera, Brassoliniæ). **Journal of Insect Behavior**, v. 12, n. 1, p. 81-103, 1999.

STILES, B.; MCDONALD, I. C.; GERST, J. W.; ADAMS, T. S.; NEWMAN, S. M. Initiation and characterization of five embryonic cell lines from the cotton boll weevil *Anthonomus grandis* in a commercial serum-free medium. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 28, p. 355-363, 1992.

STORER, T. I.; USINGER, R. L.; STEBBINS, R. C.; NYBAKKEN, J. W. Classe Insecta: insetos. In: _____. **Zoologia geral**. 6. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2003. cap. 25, p. 504-545.

SUDEEP, A. B.; MOURYA, D. T.; MISHRA, A. C. Insect cell culture in research: Indian scenario. **Indian Journal of Medical Research**, v. 121, n. 6, p. 725-738, 2005.

TAVARES, M.; KAMINSKI, L. A.; MOREIRA, G. R. P. Morfologia externa dos estágios imaturos dos heliconíneos neotropicais. II. *Dione juno juno* (Cramer) (Lepidoptera, Nymphalidae, Heliconiinae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 19, n. 4, p. 961-976, 2002.

TONSO, A. **monitoramento e operação de cultivos de células animais em sistemas de perfusão**. 2000. 136 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

TREVISAN, O.; COSTA, J. N. M.; AVILÉS, D. P. **Lagarta-dos-cafezais: o caso de Rondônia**. Rondônia: EMBRAPA, v. 68, 2004. 4 p. (Circular Técnica).

UI, K.; NISHIHARA, S.; SAKUMA, M.; TOGASHI, S.; UEDA, R.; MIYATA, Y.; MIYAKE, T. Newly established cell lines from *Drosophila* larval CNS express neural specific characteristics. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 30, n. 4, p. 209-216, 1994.

VAN DER POL, L.; TRAMPER, J. shear sensitivity of animal cells from a culture medium perspective. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 323-328, 1998.

VASCONCELOS, C. H.; NOVO, E. M.; DONALISIO, M. R. Uso do sensoriamento remoto para estudar a influência de alterações ambientais na distribuição da malária na Amazônia brasileira. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, p. 517-26, 2006.

WAHLBERG, N.; WEINGARTNER, E.; NYLIN, S. Towards a better understanding of the higher systematics of Nymphalidae (Lepidoptera, Papilionoidea). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 28, p. 473-484, 2003.

WANG, M.Y.; KMONG, S.; BENTLEY, W. E. effects of oxygen/glucose/glutamine feeding on insect cell baculovirus protein expression: a study on epoxide hydrolase production. **Biotechnology Progress**, v. 9, p. 355-361, 1993.

WANG, S.; TAN, K. L.; AGOSTO, M. A.; XIONG, B.; YAMAMOTO, S.; SANDOVAL, H.; MANISH JAISWAL, M.; BAYAT, V.; ZHANG, K.; CHARNG, W.; DAVID, G.; DURAIN, L.; VENKATACHALAM, K.; WENSEL, T. G.; BELLEN, H. J. The retromer complex is required for rhodopsin recycling and its loss leads to photoreceptor degeneration. **Plos Biology**, v. 12, n. 4, p. 1001-1023, 2014.

WANG, Z.; YAO, M.; WU, Y. Cross-resistance, inheritance and biochemical mechanisms of imidacloprid resistance in B-biotype *Bemisia tabaci*. **Pest Management Science**, v. 65, n. 11, p. 1189-1194, 2009.

WARE, G. W.; WHITACRE, D. M. **Insecticides. The pesticide book**. 6. ed. Ohio: MeisterPro Information Resources, 2004. 487 p.

WATANABE, M. A. Pragas da bananeira atacando *Heliconia latispatha* Benth. (Heliconiaceae). **Neotropical Entomology**, v. 36, p. 312-313, 2007.

WATT, F. M.; HOGAN, B. L. M. Out of the Eden: stem cells and their niches. **Science**, v. 287, p.1427-1430, 2000.

WONG, M. D.; JIN, Z.; XIE, T. Molecular mechanism of germline stem cell regulation. **Annual Review of Genetics**, v. 39, p. 173-195, 2005.

WU, J.; RUAN, Q.; LAM, H. Y. P. evaluation of spent medium recycle and nutrient feeding strategies for recombinant protein production in the insect cell baculovirus process. **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 109-116, 1998.

WYATT, G. R. The biochemistry of insect hemolymph. **Annual Review of Entomology**, v. 6, p. 75-102, 1961.

YU, F.; KUO, C. T.; JAN, Y. N. Drosophila neuroblast asymmetric cell division: recent advances and implications for stem cell biology. **Neuron**, v. 51, n. 1, p. 13-20, 2006.

YOUNG, A. M.; MUYSHONDT, A. Notes on *Caligo memnon* felder and *Caligo atreus* kollar. (Lepidoptera: Nymphalidae: Brassolini) in Costa Rica and El Salvador. **Journal of Research on the Lepidoptera**, v. 24, n. 2, p. 154-175, 1985.

ZAGO, M. A.; COVAS, T. D. **Células-tronco: A nova fronteira de medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006. 264 p.

ZHANG, X.; FENG, Y.; DING, W. F.; CHEN, X. M.; WANG, C. Y.; MA, T. Establishment and characterization of an embryonic cell line from *Gampsocleis gratiosa* (Orthoptera: Tettigoniidae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 47, n. 4, p 327–332, 2011.

ZSCHÄTZSCH, M.; OLIVA, C.; LANGEN, M.; DE GEEST, N.; OZEL, M. N.; WILLIAMSON, W. R.; LEMON, W. C.; SOLDANO, A.; MUNCK, S.; HIESINGER, P. R.; SANCHEZ-SORIANO, N.; HASSAN, B. A. Regulation of branching dynamics by axon-intrinsic asymmetries in tyrosine kinase receptor signaling. **eLife**, v. 3, p. 1-23, 2014.