JOSELEIDE TEIXEIRA CÂMARA

**Obtenção e caracterização de células embrionárias
indiferenciadas de *Syssphinx molina* (Cramer, 1780)
(Lepidoptera, Saturniidae)**

São Paulo – SP
2017

JOSELEIDE TEIXEIRA CÂMARA

**Obtenção e caracterização de células embrionárias
indiferenciadas de *Syssphinx molina* (Cramer) (Lepidoptera,
Saturniidae)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia de Animais Domésticos e Silvestre da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia de Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria

São Paulo

2017

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. 3477
FMVZ

Câmara, Joseleide Teixeira

Obtenção e caracterização de células embrionárias indiferenciadas de *Syssphinx molina* (Cramer) (Lepidoptera, Saturniidae) / Joseleide Teixeira Câmara. -- 2017.
98 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia de Animais Domésticos e Silvestre.

Área de concentração: Anatomia de Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria.

1. Insetos imaturos. 2. Células embrionárias. 3. Sistema hematopoiético. 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 embrionárias indiferenciadas de *Syssphinxmolina* (Cramer) (Lepidoptera, Saturniidae)", protocolado sob o nº 2961/2013, utilizando 60 (sessenta) insetos, sob a responsabilidade do 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 13/3/2013.

São Paulo, 03 de julho de 2015.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CÂMARA, Joseleide Teixeira

Titulo: **Obtenção e caracterização de células embrionárias indiferenciadas de *Syssphinx molina* (Cramer) (Lepidoptera, Saturniidae)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia de Animais Domésticos e Silvestre da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico a todos da minha família: pai (*in memoriam*), mãe, filhos, companheiro, irmãos, sobrinhos, cunhadas e enteados. Pelo incentivo e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria, por sua contagiante dedicação e entusiasmo pela Ciência e também por sua orientação, paciência e amizade durante o desenvolvimento desse trabalho;

À Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, por me oferecer a oportunidade de ser estudante do programa de Pós-Graduação em Anatomia de Animais Domésticos e Silvestre da FMZA/USP;

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação de Animais Domésticos e Silvestres, pela colaboração na minha formação durante o curso de Doutorado;

Ao Profa. José Roberto Kfourir Junior, pelas orientações referentes aos trâmites burocráticos do Programa de Pós-Graduação;

Aos secretários do programa da Pós-Graduação em Anatomia de Animais Domésticos e Silvestre, Maicon Barbosa, Jaqueline M. Santana e Daura Vaz, pela atenção e bons serviços prestados;

Ao Doutorando Arthur Cássio Lima Luna, pela ajuda com as análises das amostras na citometria de fluxo, mas principalmente pela amizade e apoio durante o curso de doutorado;

À técnica Beatriz Maurício e Dra. Marta Maria Antoniazzi, do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, pela ajuda na obtenção das imagens com MEV;

À Dra. Rose Eli Grace Rici, pelo o apoio durante o uso do Laboratório de Imagens da Anatomia-FMVZ, mas principalmente pelo incentivo e amizade durante os momentos difíceis;

Ao Técnico de Laboratório Ronaldo Agostinho, pela ajuda durante uso do Laboratório de Histologia da Anatomia-FMVZ;

À Dra. Ana Paula Miranda Mundun Pombo, pela parceria indispensável durante o cultivo das amostras, mas também pela amizade e companheirismo;

A todos os integrantes do Laboratório de Bioquímica e Bifísica do Instituto Butantan, especialmente a Manuella Laveli, pela ajuda e amizade durante a realização desse estudo;

Às minhas ex-alunas Claudia Barros e Tauanny Maria Lima, pela coleta do material biológico e ajuda na organização dos dados desse trabalho;

À amiga Ana Alice Tôrres de Sousa, pela ajuda na formatação desse documento;

Aos Drs. Phelipe Oliveira Favaron e Lígia Pereira Gomes, por suas contribuições nesse estudo durante meu exame de qualificação.

Ao casal Bruno Gomes Vasconcelos e Amanda Olivotti Ferreira, por todo apoio, ajuda e acolhimento quando cheguei a São Paulo;

À Luzia Gaoiso, pelo apoio fraterno e disponibilidade em me hospedar durante minhas várias viagens a São Paulo;

Aos Professores da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Deusiano Bandeira de Almeida, Maria Claudene Barros e Maria Cleoneide da Silva, pela compreensão e flexibilidade na organização dos meus horários de aulas durante o tempo que estive simultaneamente ministrando aulas no Curso de Ciências Biológicas da UEMA (campus Caxias) e cumprindo meus créditos do Doutorado.

A todos que contribuíram direto ou indiretamente para realização desse trabalho.

“Todas as vitórias ocultam as abdicações.”

(Simone de Beauvoir)

RESUMO

CÂMARA, J. T. Obtenção e caracterização de células embrionárias indiferenciadas de *Syssphinx molina* (Cramer) (Lepidoptera, Saturniidae). [Collection and characterization of undifferentiated embryonic cells of *Syssphinx molina* (Cramer) (Lepidoptera, Saturniidae)]. 2017. 135 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-graduação em Anatomia de Animais Domésticos e Silvestre da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Syssphinx molina (Cramer) é considerada uma espécie de interesse fitossanitário, pois pode ser praga de algumas plantas cultivadas pelo homem, além disso, em lavouras de monoculturas podem ocorrer acidentes com as larvas dessa espécie, causando dermatites nos trabalhadores. O principal objetivo desse estudo é obter e caracterizar as células embrionárias indiferenciadas de *Syssphinx molina*. Ovos da espécie serão obtidos através de mariposas fêmeas grávidas, coletadas pela equipe da Coleção Zoológica do Maranhão (CZMA), da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Campus Caxias. Os ovos foram caracterizados e comparados com ovos de outras espécies filogeneticamente próximas à *S. molina*. Culturas primárias de células embrionárias de *S. molina* foram cultivadas por 20 dias, ocorreram duas passagens e procedeu-se com o congelamento. Após descongelamento das células ocorreram 10 passagens. Foram analisadas amostras de células de cada passagem para obter dados do ciclo celular e características das células através de uso de marcadores: Anti-Axons, Anti-Caspase 3 ativa, Anti-CD105, Anti-CD117, Anti-CD24, Anti-CD43, Anti-CD73, Anti-CD90/Thy1, Anti-Ciclina D1, Anti GM 130, Anti-HLA DR, Anti-HSP47, Anti-HSP70, Anti-KI67, Anti-MCP1, Anti-Oct 3/4, Anti-p53, Anti RAB 5, Anti-SSEA4, Anti-Stro-1, Anti-TGF beta 1, Anti-Vimentina e Schneider L2. Pela primeira vez é determinado um protocolo para resfriamento de ovos de *S. molina*, assim como protocolo para cultura primária e secundária de células embrionárias dessa espécie. São analisadas também as idades gestacionais dos ovos de *S. molina* e comparadas com ovos de outras espécies de mariposas da mesma subfamília. A análise de ciclo celular e marcadores confirmam a alta taxa de proliferação das células, no entanto, a análise com os anticorpos Anti-Caspase 3 ativa e Anti-P53 mostrou o percentual de morte celular programada (apoptose) é, geralmente, maior que 25% nas populações de células analisadas. Os marcadores Anti GM130 e Anti RAB 5, que participam, respectivamente, do recrutamento de proteínas pela fase cis do aparelho de Golgi e do processo de maturação do endossoma, marcaram mais de 50% das células das amostras analisadas. Anti-HLA-DR, que revela proteínas da membrana do linfócito T, com um percentual geralmente superior a 30% de marcação. Dentre os marcadores de células multi e pluripotentes, aquele que marcou maior taxa de células foi Anti-CD117, que se liga em células estaminais hematopoiéticas. Todos os anticorpos utilizados para marcar células do sistema hematopoiético (Anti-CD24, Anti-CD43, Anti-CD73, Anti-CD90/Thy1, Anti-HLA DR e Anti-MCP1) foram expressos nas células cultivadas de *S. molina*. Portanto, entende-se que os insetos, a exemplo de *S. molina*, são um grupo que possui atividades metabólicas complexas e o entendimento dessas atividades permitirá, no futuro, delinear novas formas de controle biológico. Além disso, os

dados inéditos sobre o sistema hamatopoiético dos insetos apresentado nesse trabalho, além constitui um subsídio fundamental para estabelecer futuros modelos importantes para estudos de estratégias de controle biológico, como também poderá auxiliar no desenvolvimento de técnicas para combater doenças transmitidas por insetos.

Palavras-chave: Insetos imaturos, Células embrionárias, Sistema hematopoiético.

ABSTRAT

CÂMARA, J. T. **Collection and characterization of undifferentiated embryonic cells of *Syssphinx molina* (Cramer, 1871) (Lepidoptera, Saturniidae).** [Obtenção e caracterização de células embrionárias indiferenciadas de *Syssphinx molina* (Cramer, 1871) (Lepidoptera, Saturniidae)]. 2017. 135 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-graduação em Anatomia de Animais Domésticos e Silvestre da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Syssphinx molina (Cramer) is considered a species of phytosanitary interest, it can be curse of some plants cultivated by man, in addition, in monoculture plantations, accidents may occur with the larvae of this species, causing dermatitis in workers. The main objective of this study is to obtain and characterize the undifferentiated embryonic cells of *Syssphinx molina*. Eggs of the species will be obtained through pregnant female moths, collected by the team of the Coleção Zoológica do Maranhão (CZMA), Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), *Campus Caxias-MA*. The eggs were characterized and compared with eggs of other phylogenetically close species of *S. molina*. Primary cultures of *S. molina* embryonic cells were cultured for 20 days, Two passes occurred and proceeded with freezing. After thawing of the cells, there were 10 passes. Cell samples from each passage were analyzed to obtain cell cycle data and cell characteristics through the use of markers: Anti-Axons, Anti-Caspase 3 ativa, Anti-CD105, Anti-CD117, Anti-CD24, Anti-CD43, Anti-CD73, Anti-CD90/Thy1, Anti-Ciclina D1, Anti GM 130, Anti-HLA DR, Anti-HSP47, Anti-HSP70,. Anti-KI67, Anti-MCP1, Anti- Oct 3/4, Anti-p53, Anti RAB 5, Anti-SSEA4, Anti-Stro-1, Anti-TGF beta 1, Anti-Vimentina e Schneider L2. For the first time a protocol for cooling eggs of *S. molina* is determined, as well as protocol for primary and secondary culture of embryonic cells of this species. The gestational age of *S. molina* eggs and compared to eggs of other species of moths of the same subfamily. Cell cycle analysis and markers confirm the high rate of cell proliferation, however, analysis with the active Anti-Caspase 3 and Anti-P53 antibodies showed the percentage of programmed cell death (apoptosis) is generally greater than 25 % in the analyzed cell populations. Markers Anti GM130 and anti RAB 5, which participate respectively, recruitment of proteins by cis phase of the Golgi apparatus and endosome maturation process, scored more than 50% of the cells in the samples analyzed. Anti-HLA-DR, which reveals T lymphocyte membrane proteins, with a percentage generally greater than 30% labeling. Among the multi- and pluripotent cell markers, the one that scored the highest cell rate was Anti-CD117, which binds to hematopoietic stem cells. All antibodies used to label cells from the hematopoietic system (Anti-CD24, Anti-CD43, Anti-CD73, Anti-CD90 / Thy1, Anti-HLA DR and Anti-MCP1) were expressed in the cultured cells of *S. molina*. Therefore, it is understood that insects, like *S. molina*, are a group that has complex metabolic activities and the understanding of these activities will, in the future, outline new forms of biological control. In addition, the unpublished data on the hamatopoietic system of insects presented in this work, beyond is a key benefit to establish future important models for studies of biological control

strategies, but may also assist in the development of techniques to combat diseases transmitted by insects.

Keywords: Immature insects, Embryonic cells, Hematopoietic system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A-D, Vista dorsal dos espécimes adultos. **A,** *Adeloneivaia catoxantha*. **B,** *Eacles imperialis*. **C,** *Othorene hodeva*. **D,** *Syssphinx molina*. **E-G,** ovos de *Adeloneivaia catoxantha*. **E,** 24 horas após postura. **F,** 48 horas após postura. **G,** 8 dias após postura. **H-J,** ovos de *Eacles imperialis*. **H,** 24 horas após postura. **I,** 5 dias após postura. **J,** 9 dias após postura. **K-N,** ovos de *Syssphinx molina*. **K,** 24 horas após postura. **L,** 5 dias após postura. **M,** 8 dias após postura. **N,** ovo imerso em álcool 70%, com 8 dias após postura. **emb,** esclerotinização inicial do embrião; **ie,** ovo infértil, **gb,** germ band43

Figura 2. - A-H, Vista geral dos ovos. **A-B,** *Adeloneivaia catoxantha*. **C-D,** *Eacles imperialis*. **E-F,** *Othorene hodeva*. **G-H,** *Syssphinx molina*. **b.** bordas da face achatada do ovo; **rc.** região central; **pm.** polo da micrópila44

Figura 3. A-B, *Adeloneivaia catoxantha*: **A,** vista da borda; **B,** vista da região central. **C-D,** *Eacles imperialis*: **C,** vista da borda; **D,** vista da região central. **E-F,** *Othorene hodeva*: **E,** vista da borda; **F,** vista da região central **G-H,** *Syssphinx molina*: **G,** vista da borda; **H,** vista da região central. **a.** aerópila; **c.** célula; **ca.** carena45

Figura 4. A-D, região da micrópila: **A,** *Adeloneivaia catoxantha*. **B,** *Eacles imperialis*. **C,** *Othorene hodeva*. **D,** *Syssphinx molina*46

Figura 5. Cultura de células de *Syssphinx molina*. **A,** células obtidas de embriões jovens (EJ) aos três dias de cultivo; **B,** células obtidas de embriões maduros (EM) aos três dias; **C,** células obtidas de EJ aos seis dias; **D,** células obtidas de EM aos seis dias; **E,** células obtidas de EJ aos 10 dias; **F,** células obtidas de EM aos 10 dias; **G,** células obtidas de EJ aos 15 dias; **H,** células obtidas de EM aos 15 dias49

Figura 6. Dados sobre a morfologia das células em cultura célula primária de embriões jovens (2-3 dias após a postura) de *Syssphinx molina*50

Figura 7. Dados sobre a morfologia das células em cultura célula primária de embriões maduros (7-8 dias após a postura) de *Syssphinx molina*50

Figura 8. Citometria de fluxo e histograma de avaliação das culturas. **A-B,** gráfico de granulosidade (SSC) versus tamanho (FSC); **A,** população celular obtida de embriões jovens (EJ); **B,** população celular obtida de embriões maduros (EM); **C-D,** gráficos das atividades do ciclo celular; **C,** população celular obtida de EJ; **D,** população celular obtida de EM; **E,** histograma do percentual de células em atividade proliferativa, segundo fases do ciclo celular51

Figura 9. Gráficos com médias e desvio padrão dos eventos de sincronização do ciclo células nas passagens de 0-10, de células cultivadas a partir de embriões precoce de *S. molina*: **A=P0, B=P1, C=P2, D=P3, E=P4, F=P5, G=P6, H=P7, I=P8, J=P9, K=P10**53

Figura 10. Ciclo celular de células aderentes de embriões jovens, pós congelamento: **A=P0, B=P1, C=P2, D=P3, E=P4, F=P5, G=P6, H=P7, I=P8, J=P9, K=P1**54

Figura 11. Ciclo celular de células do sobrenadante de embriões jovens, pós congelamento: A=P0, B=P1, C=P2, D=P3, E=P4, F=P5, G=P6, H=P7, I=P8, J=P9, K=P10	55
Figura 12. Gráficos com médias e desvio padrão dos eventos de sincronização do ciclo células nas passagens de 0-10, de células cultivadas a partir de embriões maduros de <i>S. molina</i> : A=P0, B=P1, C=P2, D=P3, E=P4, F=P5, G=P6, H=P7, I=P8, J=P9, K=P10	57
Figura 13. Ciclo celular de células aderentes de embriões maduros, pós congelamento: A=P0, B=P1, C=P2, D=P3, E=P4, F=P5, G=P6, H=P7, I=P8, J=P9, K=P10	58
Figura 14. Ciclo celular de células do sobrenadante de embriões maduros, pós congelamento: A=P0, B=P1, C=P2, D=P3, E=P4, F=P5, G=P6, H=P7, I=P8, J=P9, K=P10	59
Figura 15. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de <i>Syssphinx molina</i> marcadas com anticorpos específicos para <i>Drosophila</i> : A, C, E e G , células aderentes de embriões precoce na passagem zero; B, D, F e H células aderentes de embriões precoce na sexta passagem	62
Figura 16. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de <i>Syssphinx molina</i> marcadas com anticorpos específicos para <i>Drosophila</i> : A , células aderentes de embriões precoce na passagem zero; B , células aderentes de embriões precoce na sexta passagem; C, E e G células do sobrenadante de embriões precoce na passagem zero; D, F e G , células do sobrenadante de embriões precoce na sexta passagem.....	63
Figura 17. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de <i>Syssphinx molina</i> marcadas com anticorpos específicos para <i>Drosophila</i> : A, C , células do sobrenadante de embriões precoce na passagem zero; B, D , células do sobrenadante de embriões precoce na sexta passagem	64
Figura 18. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de <i>Syssphinx molina</i> marcadas com anticorpos específicos para <i>Drosophila</i> : A, C, E, G , células do sobrenadante de embriões maduros na passagem zero; B, D, F, H , células do sobrenadante de embriões maduros na sexta passagem	65
Figura 19. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de <i>Syssphinx molina</i> marcadas com anticorpos específicos para <i>Drosophila</i> : A , células aderentes de embriões maduros na passagem zero; B , células aderentes de embriões maduros na sexta passagem; C, E e G células do sobrenadante de embriões maduros na passagem zero; D, F e G , células aderentes de embriões maduros na sexta passagem	66
Figura 20. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de <i>Syssphinx molina</i> marcadas com anticorpos específicos para <i>Drosophila</i> : A, C , células do sobrenadante de	

embriões maduros na passagem zero; **B, D**, células do sobrenadante de embriões maduros na sexta passagem67

Figura 21. Comparação de expressão diferencial em células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos específicos para *Drosophila*68

Figura 22. Comparação de expressão diferencial em células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos específicos para *Drosophila*68

Figura 23. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos determinar células multi e pluripotentes: **A, C, E e G**, células aderentes de embriões precoce na passagem zero; **B, D, F e H** células aderentes de embriões precoce na sexta passagem71

Figura 24. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos determinar células multi e pluripotentes: **A**, células aderentes de embriões precoce na passagem zero; **B**, células aderentes de embriões precoce na sexta passagem; **C, E e G** células do sobrenadante de embriões precoce na passagem zero; **D, F e G**, células do sobrenadante de embriões precoce na sexta passagem72

Figura 25. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos determinar células multi e pluripotentes: **A, C**, células sobrenadantes de embriões precoce na passagem zero; **B, D**, células sobrenadantes de embriões precoce na sexta passagem73

Figura 26. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos determinar células multi e pluripotentes: **A, C, E e G**, células sobrenadantes de embriões maduros na passagem zero; **B, D, F e H**, células sobrenadantes de embriões maduros na sexta passagem74

Figura 27. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos determinar células multi e pluripotentes: **A**, células aderentes de embriões maduros na passagem zero; **B**, células aderentes de embriões maduros na sexta passagem; **C, E e G** células sobrenadantes de embriões maduros na passagem zero; **D, F e G**, células aderentes de embriões maduros na sexta passagem75

Figura 28. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos determinar células multi e pluripotentes: **A, C**, células sobrenadantes de embriões maduros na passagem zero; **B, D**, células sobrenadantes de embriões maduros na sexta passagem76

Figura 29. Comparação de expressão diferencial em células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas anticorpos para determinar células multi e pluripotentes77

Figura 30. Comparação de expressão diferencial em células de embriões maduros de <i>Syssphinx molina</i> marcadas anticorpos para determinar células multi e pluripotentes	77
Figura 31. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de <i>Syssphinx molina</i> marcadas com anticorpos para determinar diferenciação celular: A, C, E e G , células aderentes de embriões precoce na passagem zero; B, D, F e H células aderentes de embriões precoce na sexta passagem	80
Figura 32. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de <i>Syssphinx molina</i> marcadas com anticorpos para determinar diferenciação celular: A , células aderentes de embriões precoce na passagem zero; B , células aderentes de embriões precoce na sexta passagem; C, E e G células do sobrenadante de embriões precoce na passagem zero; D, F e G , células do sobrenadante de embriões precoce na sexta passagem	81
Figura 33. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de <i>Syssphinx molina</i> marcadas com anticorpos para determinar diferenciação celular: A, C , células sobrenadantes de embriões precoce na passagem zero; B, D , células do sobrenadante de embriões precoce na sexta passagem	82
Figura 34. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de <i>Syssphinx molina</i> marcadas com anticorpos para determinar diferenciação celular: A, C, E e G , células sobrenadantes de embriões maduros na passagem zero; B, D, F e H , células do sobrenadante de embriões maduros na sexta passagem	83
Figura 35. Comparação de expressão diferencial em células de embriões precoces de <i>Syssphinx molina</i> marcadas com anticorpos para determinar diferenciação celular	84
Figura 36. Comparação de expressão diferencial em células de embriões maduros de <i>Syssphinx molina</i> marcadas com anticorpos para determinar diferenciação celular	85
Figura 37. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de <i>Syssphinx molina</i> marcadas com anticorpos para determinar morte e proliferação celular: A, C, E e G células aderentes de embriões precoces na passagem zero; B, D, F e H células aderentes de embriões precoces na sexta passagem	87
Figura 38. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de <i>Syssphinx molina</i> marcadas com anticorpos para determinar morte e proliferação celular: A , células aderentes de embriões precoces na passagem zero; B , células aderentes de embriões precoces na sexta passagem; C, E e G células do sobrenadante de embriões precoces na passagem zero; D, F e H , células do sobrenadante de embriões precoces na sexta passagem	88
Figura 39. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de <i>Syssphinx molina</i> marcadas com anticorpos para determinar morte e proliferação celular: A e C células do	

sobrenadante de embriões precoces na passagem zero; B e D, células do sobrenadante de embriões precoces na sexta passagem89

Figura 40. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar morte e proliferação celular: A, C, E e G células aderentes de embriões maduros na passagem zero; B, D, F e H células aderentes de embriões maduros na sexta passagem90

Figura 41. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar morte e proliferação celular: A, células aderentes de embriões maduros na passagem zero; B, células aderentes de embriões maduros na sexta passagem; C, E e G células do sobrenadante de embriões maduros na passagem zero; D, F e H, células do sobrenadante de embriões maduros na sexta passagem91

Figura 42. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar morte e proliferação celular: A e C células do sobrenadante de embriões maduros na passagem zero; B e D, células do sobrenadante de embriões maduros na sexta passagem92

Figura 43. Análise de células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar morte e proliferação celular93

Figura 44. Análise de células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar morte e proliferação celular93

Figura 45. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para avaliar a expressão de chaperonas: A, C, e E, células aderentes de embriões precoce na passagem zero; B, D, e F células aderentes de embriões precoce na sexta passagem; G, célula do sobrenadante de embriões precoce de passagem zero; H, células do sobrenadante de embriões precoce na sexta passagem96

Figura 46. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para avaliar a expressão de chaperonas: A e C, células do sobrenadante de embriões precoce na passagem zero; B e D, células do sobrenadante de embriões precoce na sexta passagem97

Figura 47. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para avaliar a expressão de chaperonas: A, C, e E células aderentes de embriões maduros na passagem zero; B, D e F células aderentes de embriões maduros na sexta passagem; G, célula do sobrenadante de embriões maduros de passagem zero; H, células do sobrenadante de embriões precoce na sexta passagem98

Figura 48. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para avaliar a expressão de chaperonas: A e C, células do

sobrenadante de embriões maduros na passagem zero; **B** e **D**, células do sobrenadante de embriões maduros na sexta passagem99

Figura 49. Comparação de expressão diferencial em células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para avaliar a expressão de chaperonas 100

Figura 50. Comparação de expressão diferencial em células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para avaliar a expressão de chaperonas 100

Figura 51. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar sistema hematopoiético: **A**, **C**, **E** e **G**, células aderentes de embriões precoce na passagem zero; **B**, **D**, **F** e **H** células aderentes de embriões precoce na sexta passagem 102

Figura 52. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar sistema hematopoiético: **A**, **C**, e **E**, células aderentes de embriões precoce na passagem zero; **B**, **D** e **F** células aderentes de embriões precoce na sexta passagem, **G** células do sobrenadante de embriões precoce na passagem zero e **H** células do sobrenadante de embriões precoce de sexta passagem 103

Figura 53. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar sistema hematopoiético: **A**, **C**, **E** e **G**, células do sobrenadante de embriões precoce na passagem zero; **B**, **D**, **F** e **H** células do sobrenadante de embriões precoce na sexta passagem 104

Figura 54. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar sistema hematopoiético: **A** e **C**, células do sobrenadante de embriões precoce na passagem zero; **B** e **D** células do sobrenadante de embriões precoce na sexta passagem 105

Figura 55. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar sistema hematopoiético: **A**, **C**, **E** e **G**, células aderentes de embriões precoce na passagem zero; **B**, **D**, **F** e **H** células aderentes de embriões precoce na sexta passagem 106

Figura 56. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar sistema hematopoiético: **A**, **C**, e **E**, células aderentes de embriões precoce na passagem zero; **B**, **D** e **F** células aderentes de embriões precoce na sexta passagem, **G** células do sobrenadante de embriões precoce na passagem zero e **H** células do sobrenadante de embriões precoce de sexta passagem 107

Figura 57. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar sistema hematopoiético: **A**, **C**, **E** e **G**, células do

sobrenadante de embriões precoce na passagem zero; **B, D, F e H** células do sobrenadante de embriões precoce na sexta passagem 108

Figura 58. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar sistema hematopoiético: **A e C**, células do sobrenadante de embriões precoce na passagem zero; **B e D** células do sobrenadante de embriões precoce na sexta passagem 109

Figura 59. Comparação de expressão diferencial em células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar sistema hematopoiético 110

Figura 60. Comparação de expressão diferencial em células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar sistema hematopoiético 110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.-Medidas de tendência central e dispersão das dimensões lineares dos ovos das espécies de *Ceratocampinae*40

Tabela 2. Tendência central e dispersão, expressão e significância estatística de anticorpos em células cultivadas a partir de embriões precoces de *Syssphinx molina*. **DP**=desvio padrão;**Exp.**=expressão; **NEG**=negativo; **ns**=não significante; **POS**=positivo; **signific.**=significância; **‡**=expressão comparativa com base no valor obtido da amostra controle; *=pouco significância,**média significância;***alta significância134

Tabela 3. Tendência central e dispersão, expressão e significância estatística de anticorpos em células cultivadas a partir de embriões maduros de *Syssphinx molina*. **DP**=desvio padrão;**Exp.**=expressão; **NEG**=negativo; **ns**=não significante; **POS**=positivo; **signific.**=significância; **‡**= expressão comparativa com base no valor obtido da amostra controle; *=pouco significância,**média significância;***alta significância135

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 DIVERSIDADE E CARACTERÍSTICAS DOS LEPIDÓPTEROS	23
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 SATURNIIDAE	25
2.2 <i>SYSSPHINX MOLINA</i> (CRAMER, 1780)	28
2.3 IMPORTÂNCIA E APLICAÇÃO DOS ESTUDOS SOBRE INSETOS	28
2.4 CULTURA DE CÉLULAS DE INSETOS.....	30
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 GERAL	32
3.2 ESPECÍFICOS	32
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 OBTENÇÃO DOS OVOS.....	33
4.2 CARACTERIZAÇÃO, ULTRAESTRUTURA E COMPARAÇÃO DO OVO DE <i>SYSSPHINX MOLINA</i> (CRAMER).....	33
4.3 CULTURA PRIMÁRIA DA MASSA DE OVOS EMBRIONÁRIOS	34
4.4 SUBCULTURAS	35
4.5 CITOLOGIA POR PANÓTICO RÁPIDO.....	35
4.6 CARACTERIZAÇÕES DA MORFOLOGIA CELULAR	36
4.7 CONGELAMENTO E ARMAZENAMENTO	36
4.8 ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR.....	36
4.9 ANÁLISES DE MARCADORES POR CITOMETRIA DE FLUXO	37
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5 RESULTADOS	39
5.1 ANÁLISE DO OVO DE <i>SYSSPHINX MOLINA</i> (CRAMER) E COMPARAÇÃO COM OVOS DE OUTRAS ESPÉCIES	39
5.2 PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DE CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DE TECIDO EMBRIONÁRIO DE <i>SYSSPHINX MOLINA</i> (CRAMER).....	47
5.3 CICLO CELULAR PÓS-CONGELAMENTO	52
5.3.1 Cultura de células de embriões precoces	52
5.3.2 Cultura de células de embriões maduros	56
5.4 ANÁLISE COM MARCADORES ESPECÍFICOS.....	60
5.4.1 Marcadores específicos para células de insetos.....	60

5.4.2 Marcadores de células multi e pluripotentes.....	69
5.4.3 Marcadores de diferenciação celular	78
5.4.4 Marcadores de morte e proliferação celular.....	85
5.4.5 Marcadores de chaperonas.....	94
5.4.6 Marcadores de sistema hematopoiético	100
6 DISCUSSÕES	112
6.1 ANÁLISE DO OVO DE <i>SYSSPHINX MOLINA</i> (CRAMER) E COMPARAÇÃO COM OVOS DE OUTRAS ESPÉCIES	112
5.2 PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DE CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DE TECIDO EMBRIONÁRIO DE <i>SYSSPHINX MOLINA</i> (CRAMER).....	114
6.3 CICLO CELULAR PÓS-CONGELAMENTO	115
6.4 ANÁLISE COM MARCADORES ESPECÍFICOS	116
7 CONCLUSÕES	121
REFERÊNCIAS	123
APÊNDICE	133

1 INTRODUÇÃO

1.1 DIVERSIDADE E CARACTERÍSTICAS DOS LEPIDÓPTEROS

Existem aproximadamente 950.000 espécies de insetos descritas, correspondem a aproximadamente 70 a 80% do Reino Animal e 60% de todas as espécies de organismos conhecidas, ou seja, a maioria dos seus representantes. O grande sucesso dos insetos, tanto em diversidade quanto em abundância se deve, principalmente, a sua grande adaptação a todos os ecossistemas terrestres e aquáticos, exceto ambiente marinho (RAFAEL et al., 2012). O número de espécies e gêneros diminui com o aumento da latitude, não havendo registro para os extremos norte e sul (LEMAIRE; MINET, 1998). Este grupo de animais está envolvido em vários processos e interações ecológicas, destacando-se a polinização, dispersão e predação de sementes, ciclagem de nutrientes, regulação das populações tanto de plantas como de outros animais, além de estarem na base de inúmeras cadeias tróficas importantes em todos os biomas terrestres. Além disso, muitas espécies são de grande relevância para as sociedades humanas, tanto do ponto de vista econômico, por exemplo, na produção de mel ou na forma de pragas agrícolas; como de saúde pública, como as inúmeras espécies que são ectoparasitas e/ou vetores de doenças (FREITAS et al., 2011).

A ordem Lepidoptera (Lepidoptera = asas com escamas), que inclui as borboletas e mariposas, é considerada hoje a segunda maior dentre os insetos em número de espécies, perfazendo cerca de 16% de todas as espécies de insetos viventes (GRIMALDI; ENGEL, 2005, AGUIAR et al., 2009).

Em sua maioria, lagartas de Lepidoptera são herbívoras, se alimentando de material vegetal (folhas, flores, ramos e frutos), mas existem muitas espécies detritívoras, comedoras de fungos e líquens e até algumas carnívoras e parasitas de outras espécies (BROWN; FREITAS, 1999, FREITAS et al., 2006). A especificidade por alimento é alta na maioria das espécies e a escolha da planta para a oviposição feita pelas fêmeas é, em geral, muito específica, restrita a poucas famílias, gêneros e até a espécie de planta (DINIZ; MORAIS, 1995). O tempo de desenvolvimento até a maturidade varia de menos de um mês até mais de um ano (algumas espécies podem entrar em

diapausa de pupa por mais de dois anos) e as lagartas passam por diversas ecdises (mudas) acompanhando o seu aumento de tamanho (geralmente quatro a seis instares). A diversidade de formas e cores dos imaturos dos lepidópteros é imensa, e reflete adaptações das mais diversas às características do ambiente, a presença de competidores e de predadores. Muitas lagartas possuem escolos, pelos, chifres e outros apêndices que auxiliam na proteção mecânica e podem ser urticantes (FREITAS et al., 2011).

O território brasileiro abriga uma das mais ricas entomofauna (fauna de insetos) do mundo, só da ordem Lepidoptera cercas de 26.000 espécies são conhecidas e estima-se que o número real consiste em, pelo menos, três vezes mais que o atual (BROWN; FREITAS, 1999). Por tanto, aperfeiçoar protocolos para obter com maior eficiência cultura de células de espécies da fauna brasileira é o primeiro passo para estabelecer um conjunto de conhecimentos com altíssimo potencial biotecnológico, de aplicabilidade em várias áreas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SATURNIIDAE

A ordem Lepidoptera está dividida em 127 famílias taxonômicas (RAFAEL et al., 2012), uma delas é Saturniidae. Os saturnídeos são mariposas, em sua maioria, de hábitos noturnos com machos de algumas espécies diurnas e, envergadura que varia entre 30 a 280 mm (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2011). Sua coloração é variada, com predominância de diferentes tons de marrom. As antenas nos machos são bi ou quadripectinadas e nas fêmeas são filiforme ou quadripectinada. O frênulo, retináculo (estruturas de acoplamento das asas com função de uni-las para o voo), ocelos e órgãos timpânicos são ausentes em ambos os sexos (SCOBLE, 1995, LEMAIRE, 1988).

Estes insetos possuem corpo densamente piloso e robusto com muitas espécies possuindo manchas ocelares características nas asas, daí a origem do nome do grupo (por lembrar anéis de saturno), outras têm áreas completamente hialinas nos dois pares de asas (COSTA-LIMA, 1950, LEMAIRE; MINET, 1998). A forma das asas pode ser arredondada, angular ou com extensos prolongamentos em forma de cauda na asa posterior (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2011).

Saturniidae como todos os lepidópteros são holometábolos, portanto, possuem quatro fases ou estágios em seu ciclo de vida, ovo, larva, pupa e adulto. Os ovos são, geralmente, achatados, do tipo elipsoide, podem ser esbranquiçados (Hemileucinae), verdes ou amarelados (Ceratocampinae) e marrons (Arsenurinae). As fêmeas podem colocar todos ou metade de seus ovos na primeira noite, depois de acasalar-se. A postura normalmente é em monte, cobertos ou não por cerdas urticantes (LEMAIRE; MINET, 1998, KITCHING; CADIOU, 2000).

Os adultos de Saturniidae apresentam ausência ou redução das estruturas do aparelho bucal. Em consequência da ausência ou redução da probóscide, os adultos aparentemente não se alimentam. Em vez disso, os adultos contam com reservas de gorduras deixadas durante a fase larval para a

sua sobrevivência. As fêmeas vivem cerca 3 a 6 dias e os machos de 5 a 15 dias. Essa curta duração de vida dos adultos faz com que o grupo tenha dispersão bastante limitada. Além disso, eles não possuem necessidade de localizar a fonte de alimento para sua prole, tendo estes reduzida capacidade neural que é refletida em suas cabeças muito pequenas (JANZEN, 1982, KITCHING; CADIOU, 2000).

Na sua maioria, as larvas são polifágicas, podendo alimentar-se de muitas espécies de plantas (KITCHING; CADIOU, 2000, CAMARGO; SCHMIDT, 2009). Os dados de Janzen (1982), por exemplo, indicam que das trinta espécies encontradas no Parque Nacional de Santa Rosa na Costa Rica, apenas uma delas mostra-se monofágica, alimenta-se apenas de uma espécie de planta, em contraste com a *Hylesia lineata* (Druce) que se alimenta de 49 espécies de plantas, pertencentes a 19 famílias.

As lagartas são grandes, providas de processos filiformes e tubérculos ou processos espinhoso (scoli), mais ou menos conspícuos, não raro de cores vistosas. Elas podem ser gregárias, como na subfamília Hemileucinae, ou não (COSTA-LIMA, 1950, LEMAIRE; MINET, 1998).

Algumas larvas são de importância agrícola, por serem hóspedes de plantas nativas e por danificarem também plantas cultivadas, principalmente as frutíferas. São consideradas pragas do milho, mamona, café, caju, abacateiro, mangueira e eucalipto (ZUCCHI et al., 1993, GALLO et al., 2002, SANCHEZ-SOTO; NAKANO, 2003, BITTENCOURT et al., 2003). Larvas da espécie *Leucanella memusae* (Walker, 1855) já foram encontradas 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).

Além da importância agrícola, as larvas dos gêneros *Automeris* Hübner, 1819, *Dirphia* Hübner, 1819 e *Lonomia* Walker, 1855 são de importância médica, por possuírem cerdas urticantes, espinhos em forma de pinheiros, que em contato com a pele, podem causar dermatites, ou até casos mais graves como acidentes hemorrágicos que podem levar ao óbito (COSTA-LIMA, 1950, SPECHT et al., 2008). O primeiro caso grave com morte aconteceu na Venezuela, pelo contato com *Lonomia achelous* (Cramer, 1777) (AROCHA-

PIÑAGO; LAYRISSE, 1969); o primeiro registro de acidente com óbito no Brasil, ocorreu no estado do Amapá (FRAIHA NETO et al., 1986), posteriormente foram registrados no Rio grande do Sul e Santa Catarina, em 1989, quatro óbitos causada por *L. obliqua* (DUARTE et al., 1990). Geralmente esses acidentes ocorrem pelo desmatamento e a inclusão de lavouras, as lagartas se alimentam das plantas, ficando propícios os acidentes com os agricultores.

Embora, em menor frequência, as espécies na fase adulta provoquem acidentes em humanos, a maioria dos casos é provocada por mariposas do gênero *Hylesia*, subfamília Hemileucinae. Essas mariposas possuem cerdas urticantes em seu abdômen, quando em contato com a pele provocam irritações, manifestado por pápula de prurido. Um acidente desse tipo ocorreu com um grupo de marinheiro da Bahia quando passavam pela Venezuela em 2006 e mantiveram contato com uma grande quantidade de mariposas em migração. Em seguida, desenvolveram várias pápulas e irritação cutânea (MOREIRA; TOMBA; ZONETTI, 2007).

Atualmente são reconhecidas nove subfamílias: Agliinae, Arsenurinae, Hemileucinae, Ceratocampinae, Ludiinae, Oxyteninae, Salassinae e Saturniinae. As subfamílias, Arsenurinae, Oxyteninae e Cercophaninae, são exclusivamente Neotropicais; Agliinae tem distribuição Paleártica; Ludiinae ocorre no continente africano; Salassinae é asiática; Saturniinae é cosmopolita, mas pouco representada no Novo Mundo; Ceratocampinae e Hemileucinae são distribuídas nas Américas (FERGUSON, 1971, LEMAIRE; MINET, 1998, LEMAIRE, 2002). Para identificação das subfamílias destacam-se: presença de escamas dorsais nos flagelos antenais, presença de probóscide, forma das antenas e do cone antenal (LEMAIRE; MINET, 1998).

Saturniidae possui cerca de 1870 espécies distribuídas em 162 gêneros (REGIER et al., 2008). O número de espécies e gêneros diminui com o aumento da latitude; não havendo registro para os extremos norte e sul (LEMAIRE; MINET, 1998). Para o Neotrópico estão registradas 966 espécies, destas 422 são assinaladas para o Brasil (CAMARGO; SCHMIDT, 2009), sendo Hemileucinae a subfamília mais rica com 58% das espécies, seguida de

Ceratocampinae (21%), Arsenurinae (14%), Oxyteninae (4%) e Saturniinae (3%) (CAMARGO; BECKER, 1999, CAMARGO, 2005).

2.2 SYSSPHINX MOLINA (CRAMER, 1780)

As mariopas da espécie *Syssphinx molina* (Cramer, 1780) são comumente encontradas nos biomas Amazônia, Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado. O aumento das populações ocorrem principalmente na estação chuvosa, que pode ser entre os meses de dezembro a maio (CÂMARA et al., 2011). A espécie possui um conjunto de características que despertam o interesse fitossanitário, pois tem altíssimo potencial de praga agrícola: a fêmea adulta deposita 102.5 ± 2.3 ovos por dia, chegando até 290 ovos por fêmea; a larvas pode consumir toda a folhagem da planta alimento (BATISTA et al., 2013). A larva é polifágica, ou seja, se alimenta da folhagem de diversas plantas, tais como *Ficus retusa* L. (Moraceae) e as espécies de acacia, cassia, inga e parica (Fabaceae) (SILVA et al., 1968). Já a sua relevância em saúde pública se dá em função do contato direto com esta espécie em sua fase larval, determina casos de erucismo. No Brasil este acidente é classificado como agravo de interesse nacional, tendo portanto sua notificação obrigatória (BRASIL, 2008).

2.3 IMPORTÂNCIA E APLICAÇÃO DOS ESTUDOS SOBRE INSETOS

Os insetos formam um grupo singular de organismos, no seguinte sentido: sua principal forma de comunicação se baseia em substâncias químicas. Tais compostos orgânicos são comumente denominados de semioquímicos, ou mediadores de comunicação química. Estes incluem feromônios, alomônios e kairomônios e estas substâncias são utilizadas para comunicação entre indivíduos de uma mesma espécie, estimular uma resposta comportamental em indivíduos de outra espécie e favorecer outros indivíduos, respectivamente. Além de substâncias atratoras e repelentes, os insetos são verdadeiras fábricas de substâncias químicas, mas várias espécies acumulam estas substâncias de suas presas, que podem ser plantas, fungos, bactérias e até outros insetos (GULLAN; CRANSTON, 1994). Dessa forma, pode-se enumerar várias situações que os insetos são protagonistas, como a seguir:

Insetos e Agricultura

Um terço da produção agrícola mundial é danificada por pragas, patógenos e ervas daninhas. O controle das populações de pragas agrícolas é alcançado principalmente pela aplicação de inseticidas. O mercado global de inseticidas representa 12 bilhões de dólares por ano. Os métodos de controle biológico também fazem parte de estratégias integradas de proteção. Culturas geneticamente modificadas com pragas de lepidópteros são as principais opções entre os agricultores que produzem em grande escala. Apesar dos benefícios ambientais, da redução do uso de pesticidas, a aceitação pública de culturas transgênicas é baixa. A investigação é necessária para desenvolver novas formas de aumentar a resistência às pragas das culturas e dissipar as preocupações com as pragas (GEORGE; MIKLOS; GERALD, 1996).

Pragas economicamente importantes

Os noctuídeos *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805), *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) e *Heliothis virescens* (Fabrícus, 1781) causam grandes danos no mundo todo. No Brasil as espécies *Neoleucinodes elegantalis* (Pyraustidae), *Tuta absoluta* e *Gnorimoschema barsaniella* (Gelechiidae), *Agrotis ipsilon* e *Prodenia* spp. (Noctuidae) causam danos de importância econômica, por serem mais abundantes e de distribuição generalizada nas culturas. Outras espécies como: *Manduca sexta* (Sphingidae) e *Mechanitis lysimnia* (Danaidae) são de ocorrência ocasional e não merecem medidas de controle químico especiais. Essas espécies causam danos no valor de bilhões de dólares anualmente. Onde eles não podem ser controlados, eles afetam o sustento e as práticas culturais de regiões inteiras (SMITH, 2010).

Interações complexas

Insetos estão envolvidos em uma gama ainda maior de interações com outros organismos. Interações tritrófico entre plantas, insetos e seus parasitoides oferecem novos paradigmas para um manejo ambientalmente seguro de pragas (ZDOBNOV; BORK, 2006).

Sericultura

A produção mundial de seda quase dobrou últimos 30 anos, apesar das fibras artificiais substituírem a seda para alguns usos. A aplicação de métodos de melhoramento de rendimento e qualidade das fibras pode ser marcada com aplicação de marcadores moleculares para produção mais rápida de uma linhagem geneticamente modificada (GRIMMELIKHUIJZEN, 2007).

Quando a criação de bicho-da-seda no Brasil era pouco explorada, autores nacionais e estrangeiros, refere Costa-Lima (1950), ocuparam-se especialmente de *Rotschildia aurota aurota* (Cramer, 1775) (Saturniidae), preconizando a criação das lagartas em grande escala para a produção de seda, no entanto produzido pelas espécies é formado por seda irregular e grosseira.

Evolução e Conservação

A descoberta do mimetismo nas borboletas forneceu uma das evidências mais importantes da teoria da evolução através da seleção natural, de Charles Darwin. Mais recentemente, as asas de borboleta têm ressurgido como um sistema modelo em genética do desenvolvimento. As borboletas e as mariposas figuram como componentes ecologicamente importantes e esteticamente atraentes de projetos de biodiversidade e conservação em todo o mundo (SUNDARAM; BENTUR, 2006).

2.4 CULTURA DE CÉLULAS DE INSETOS

O primeiro estudo de cultura de célula de um Artrópode foi realizado por Grace (1962), que estudou a pupa de um inseto, a mariposa australiana *Antherae aeucalypti*. Mais de 50 anos após este evento, já foram estabelecidas mais de 500 linhas de células e cerca 260 destas foram obtidas de 60 espécies de Lepidoptera. Vários tecidos têm sido utilizados com êxito para o desenvolvimento de cultura de células, dentre eles os do ovário, do embrião, de hemócitos, disco imaginal, corpo de gordura, intestino médio, cutícula, sistema nervoso, sistema endócrino e sistema muscular (LYNN, 2001).

No que se refere ao meio de cultura utilizado, os protocolos para obtenção de culturas de células de Lepidoptera têm se diversificado desde o primeiro experimento de Grace. Cultura de células embrionárias de *Clostera*

anachoreta (Notodontidae) foi obtida em meio de cultura TNM-FH suplementado com soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (WEN et al., 2009). Sohi (1995) estabelece um protocolo para Lepidoptera utilizando meio Grace de cultura de células de insetos e usou como suplementos SFB, albumina bovina, triptose e antibióticos. Lynn (1989) refere-se a três protocolos diferentes para Lepidoptera e outros insetos com a utilização de diferentes meios de cultura (Grace, Hanks-EDTA Buffer, IPL-52B e BML-TC/10) e suplementos.

Muitas aplicações são dadas as linhas de células de insetos obtidas através de culturas, as que mais se destacam são a utilização como ferramenta de investigação em virologia, em avaliações de mecanismos de sinalização para estudo de insetos, para testar hipóteses sobre expressão gênica e em programas que visam produzir inseticidas com maior eficiência específica (SMAGGHE; GOODMAN; STANLEY, 2009).

Loeb et al. (2003) demonstraram que células-tronco do intestino médio de Lepidoptera são multipotentes 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; WRIDE; RANCOURT, 2000). É interessante notar ainda que as células-tronco hematopoiéticas de vertebrados necessitam de genes de desenvolvimento que foram originalmente identificados em insetos (BLANK; KARLSSON; KARLSSON, 2008).

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.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Obter células de massa embrionária do ovo de *Syssphinx molina* (Cramer) para o cultivo e caracterização através de marcadores específicos.

3.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar morfolologicamente o ovo de *S. molina*;
- Comparar a estrutura do córion do ovo de *S. molina* com ovos de outras espécies próximas;
- Padronizar protocolo de cultivo células a partir da massa embrionária para a espécie;
- Avaliar o ciclo celular das células cultivadas;
- Analisar as células obtidas em cultivo celular utilizando marcadores de proliferação celular, morte celular, estruturas celulares (aparelho de Golgi), sistema nervoso e sistema hematopoiético.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para a elaboração e produção desta pesquisa, foram utilizados ovos de das espécies *Adeloneivaia catoxantha* (Rothschild), *Eacles imperialis cacticus* (Boisduval), *Othorene hodeva* (Druce) e *Syssphinx molina* (Cramer) para comparação e diagnose da ultraestrutura do córion. A cultura celular foi obtida a partir de ovos embrionados de *S. molina* em dois períodos gestacionais, sendo respectivamente de dois/três e seis/sete dias após a postura. Todo o desenvolvimento do projeto esta de acordo com as normas do comitê de bioética (protocolo nº 2.961/2013) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

4.1 OBTENÇÃO DOS OVOS

Os ovos de mariposas foram obtidos através de adultos coletados pela equipe da Coleção Zoológica do Maranhão (CZMA), da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), *Campus Caxias*. Para a ovipostura, as mariposas foram mantidas vivas por cerca de cinco dias dentro de um recipiente de acrílico, forrado com papel toalha e com tampa em tela de 1x0,5 cm. Os ovos foram divididos em dois grupos, aqueles destinados a caracterização do córion e aqueles para o cultivo celular. Os primeiros foram tratados com fixador específico de acordo com o método utilizado. Os demais foram coletados do recipiente e levados ao refrigerador com temperatura média de 8° C para retardar o desenvolvimento do embrião. Os ovos foram divididos por idade a partir da ovipostura, a saber: ovos embrionados com idade de dois/três dias (embriões precoces) e com seis/sete dias (embriões maduros).

4.2 CARACTERIZAÇÃO, ULTRAESTRUTURA E COMPARAÇÃO DO OVO DE SYSSPHINX MOLINA (CRAMER)

Para caracterização da aparência dos ovos foi considerado duas situações: ovos férteis e inférteis. Estes foram fotografados com a utilização de microscópio estereoscópio ZEISS com câmera AxioCam, 1,3 MP, acoplada. As imagens foram editadas com o software Axiovision 4.0.

As imagens de ultraestrutura foram obtidas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para tanto, os ovos foram fixados em solução

de Karnovsky, lavado com tampão de cacodilato 0,1 M, pH 7,2, pós-fixado por 30 minutos com tetróxido de ósmio 1%, desidratados em etanol nas concentrações 50%, 75%, 90% e 100%, levados a ponto crítico, colados à stubs de aço com utilização de fita de cobre, encobertos por uma camada de ouro de 20 nm de espessura e levados ao MEV para observações.

Para mensuração dos ovos foram considerados as seguintes dimensões lineares: a) comprimento: distância entre a micrópila e a extremidade oposta; b) larguras: maior distância no ângulo paralelo à micrópila. Estas medidas foram tomadas durante a captura das imagens de Me finaEV e submetidas à análises das medidas de tendência central (média) e medidas de dispersão (desvio padrão, valor máximo e valor mínimo), cujo cálculo foi realizado utilizando-se do software MINITAB versão 16. Considerou-se Intervalo de Confiança de 95%.

4.3 CULTURA PRIMÁRIA DA MASSA DE OVOS EMBRIONÁRIOS

Em cabine de fluxo laminar, seis ovos de cada grupo (embriões precoces e matudos) foram acondicionados separadamente em cadins estéreis, lavados três vezes em tampão fosfato salino (PBS) e em seguida submetidos à solução antibióticos (penicilina/ estreptomicina/anfotericina B) diluída a 20% em PBS, cada lavagem com duração de cinco minutos.

Após lavagem com antibiótico, o córion dos ovos (semelhante a casca do ovo de vertebrados) foram rompidos com a utilização de agulha de seringa e pinça de relojoeiro estéreis, a massa embrionada obtida foi macerada mecanicamente com o uso do embolo de seringa estéril. Foi adicionado 5 ml meio de cultura de células DMEN-High, suplementado com 5% de aminoácidos, 5% de L-glutamina, 5% de piruvato de sódio, 10% de soro fetal bovino (SFB) e 2% de antibiótico (Anfotericina, Estreptomicina, Gentamicina e Penicilina). O pH do meio cultura foi ajustado entre 6,4 e 6,9.

O material biológico extraído dos ovos em suspensão no meio de cultura foi acondicionado em garrafas de cultura celular de 10 cm², em estufa estéril, com temperatura de 25° C com adição de CO₂. A princípio quatro amostras foram obtidas, duas de cada idade embrionária.

4.4 SUBCULTURAS

Pelo fato da cultura celular possui pouca ou nenhuma aderência ao substrato da garrafa de cultura, não há a necessidade de utilização de tripsina para retirada das células do recipiente. Para retirada das células semi-aderentes o meio era misturado vigorosamente através de pipetagem, dentro da garrafa. A solução era transferida para falcon estéril de 15 ml, centrifugada por 5 minutos a 1500 rotações por minutos (RPM), em seguida o sobrenadante era descartado, o pélet era lavado com solução de lavagem contendo 10% de antibiótico (Gentamicina, Estreptomicina e Penicilina e Anfotericina B) e 90% de PBS, centrifugado novamente por mais 5 minutos a 1500 RPM e o sobrenadante novamente era descartado. O pélet restante era dividido para efetivar a expansão de subculturas que foram passadas na proporção de 1:2. Em cada nova garrafa de cultura celular estéreis de 25 cm³, eram adicionados 5 mL às células.

As subculturas foram mantidas nas mesmas condições da cultura inicial, temperatura com temperatura de 25° C com adição de CO₂. Todas as passagens foram realizadas na proporção de 1:2.

4.5 CITOLOGIA POR PANÓTICO RÁPIDO

Com a cultura celular confluenta, foi coletado do meio de cultura com as células em suspensão 10µl (microlitros) por amostragem. As lâminas estéreis para microscopia foram lavadas com álcool 70%, a amostra foi distribuída sobre as lâminas e o material deixado para secar, sob estufa, em temperatura de 22°C. Após o meio de cultura com as células estarem secas sobre a lâmina, elas foram submersas 5 vezes no panótico nº1 (LB laborclin) contendo solução de triarilmetano a 0,1% durante 5 segundos (1 segundo por submersão), ao fim do processo deixando escorrer bem o excesso. Posteriormente as lâminas foram submersas 5 vezes no panótico nº2 (LB laborclin) contendo solução de xantenos a 0,1% durante 5 segundos (1 segundo por submersão), ao fim do processo deixando escorrer bem o excesso. Por fim, as lâminas foram submersas 5 vezes no panótico nº3 (LB laborclin) contendo solução de tiazinas a 0,1% durante 5 segundos (1 segundo por submersão), ao fim do processo deixando escorrer bem o excesso. Após coloração as lâminas foram lavadas

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

4.6 CARACTERIZAÇÕES DA MORFOLOGIA CELULAR

Para a caracterização da morfologia celular as culturas foram observadas e microfotografadas do meio de cultura ou das lâminas utilizando microscópio invertido NIKON ECLIPSE TS-100 com fase de contraste "Leitz" no aumento de 100 a 40 vezes de ampliação. A cultura celular foi analisada e fotografada apenas na fase de cultura primária nos períodos de 3º, 6º, 12º e 17º dias de cultivo.

4.7 CONGELAMENTO E ARMAZENAMENTO

Foram interrompidas as culturas semi confluentes em suspensão (~70%), retiradas dos frascos de cultura celular e transferidas para falcon de 15 mL, sendo centrifugadas por 10 minutos a 1500 RPM. O sobrenadante foi descartado e o pélet restante foi acondicionado em meio de congelamento contendo 90% soro fetal bovino e 10% dimetil sulfóxido (DMSO).

As células suspensas foram acondicionadas em criotubos estéreis levadas ao freezer -20°C por 80 minutos, ao freezer -80°C durante 12 horas e finalmente, armazenadas em contêiner de nitrogênio líquido (-190°C). Esse material será mantido e estocado no banco de células pelo Professor Doutor Durvanei Augusto Maria (Laboratório de Bioquímica e Biofísica, Instituto Butantan).

4.8 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. Utilizou-se uma amostras de células semi-aderentes e uma de células do sobrenadantes de cada passagem (passagens de 0 a 10), para as culturas obtidas de embriões precoces e de embriões maduros, com duplicatas; ou seja, 2(duplicatas) X 2(aderentes e do sobrenadante) X 2(embriões precoces e maduros) X 11(passagens) = 88 amostras total.

As células em cultivo foram retiradas por pipetagem dos frascos de cultura, transferidas para falcon de 15 mL e centrifugadas durante 10 minutos a 1500 RPM, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 1mL 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 (Sigma, P4170, 1mg/ml). As amostras eram então envoltas por papel alumínio e levadas para serem lidas no Citômetro de Fluxo FACS Calibur e analisadas pelo programa WinMdi 2.9.

4.9 ANÁLISES DE MARCADORES POR CITOMETRIA DE FLUXO

Após o crescimento e expansão celular, as células em cultura foram tratadas com tripsina e inativadas com soro fetal bovino (SFB), o material foi acondicionado em criotubos de 15ml em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada com álcool 70% e ultra violeta durante 20 minutos.

Em seguida centrifugado à 1500rpm durante 10 minutos, para a formação do precipitado celular. Após a centrifugação, foi descartado o sobrenadante e acrescentado o tampão FACSFlow BD. A suspensão foi então 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:

- i. Anti-Axons BP102 (mouse-monoclonal abcam ab: 12455);
- ii. Anti-Caspase 3 (1:100, mouse-monoclonal Santa Cruz, sc 271759);
- iii. Anti-CD105 (1:1000, mouse-monoclonal, abcam ab: 156756)
- iv. Anti-CD117 (1:100, mouse-monoclonal stemcell Clone ACK2)
- v. Anti-CD24 (1:100, mouse monoclonal, antibody [M1/69] abcam ab64064)
- vi. Anti-CD43 (1:10, mouse monoclonal, antibody [MEM-59] abcam ab9088)
- vii. Anti-CD73 (1:100, mouse monoclonal, antibody [1D7] abcam ab91086)
- viii. Anti-CD90/Thy1 (1:10, mouse monoclonal, antibody [MRC OX-7] abcam ab225)

- ix. Anti-Ciclina D1(1:100, rabbit policlonal, antibody abcam ab16663)
- x. Anti GM 130 (1:100 rabbit-polyclonal, abcam ab: 30637);
- xi. Anti-HLA DR (1:100, mouse monoclonal, antibody abcam ab20181)
- xii. Anti-HSP47 (1:100 mouse monoclonal, antibody abcam ab77609)
- xiii. Anti-HSP70 (1:100, mouse-monoclonal, SAS antibody abcam ab: 2787);
- xiv. Anti-KI67 (1:100, mouse-monoclonal abcam ab: 6526)
- xv. Anti-MCP1 (1:10, rabbit polyclonal, antibody abcam ab9669)
- xvi. Anti- Oct 3/4 (1:100, rabbit-policlonal abcam ab: 137427);
- xvii. Anti-p53 (1:100, mouse monoclonal, antibody abcam ab28)
- xviii. Anti RAB 5 (1:100 rabbit-polyclonal, abcam ab: 31261);
- xix. Anti-SSEA4 (1:100, mouse monoclonal, antibody abcam ab16297MC813)
- xx. Anti-Stro-1 (1:100, Mouse-monoclonal Santa Cruz IgG-sc47733);
- xxi. Anti-TGF beta 1 (mouse monoclonal, antibody [TB21] abcam ab190503)
- xxii. Anti-Vimentina (1:100, mouse monoclonal Leica Biosystems antibody: RTU-Vim V9)
- xxiii. Schneider L2 (1:10, antibody abcam ab14893)

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, 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.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DO OVO DE *SYSSPHINX MOLINA* (CRAMER) E COMPARAÇÃO COM OVOS DE OUTRAS ESPÉCIES

Os espécimes dos quais os ovos foram obtidos são representados na figura 1. Em todas as espécies os ovos são postos com considerável quantidade de escamas, que desprenderam da extremidade abdominal da fêmea. Os ovos foram postos tanto de forma isolada como em cluster. A fixação das escamas e da superfície de um ovo em outros (cluster) ocorre devido à presença de uma camada superficial, composta por tipo de “cola”, denominada spumaline (HINTON, 1981). Vistos à olho nu, variam de verdes à amarelo-claro, passando, gradativamente para os tons bege, alaranjado e marrom no decorrer do desenvolvimento embrionário. Antes da eclosão da larva, os ovos possuem cor marrom escuro.

Em todas as espécies os ovos são ovóides, ligeiramente compridos e achatados nas superfícies perpendiculares aos pólos (figura 2). O pólo anterior, onde se localiza a micrópila, mostrou-se levemente achatado, e o pólo oposto (posterior) tem formato arredondado (figuras 2B, 2D, 2F e 2H). As medidas obtidas são apresentadas na tabela 1. Os ovos não viáveis podem ser evidenciados após o 5ª dia, a partir da postura; permanecem verdes claros e tornam-se colapsados (figura 1L).

Adeloneivaia catoxantha (Rothschild, 1907)

Figuras 1A, 1E, 1F, 1G, 2A, 2B, 3A, 3B, 4A

Observação dos ovos durante o desenvolvimento do embrião.

Comprimento médio 1,797 mm, largura média 1,523 mm (tabela 1). Os ovos possuem cor verde claro uniforme nas primeiras 24 horas após a postura (figura 1E), com cerca de 48 horas, ainda verde claro, é evidente a formação da banda germinativa através de duas linhas escuras laterais no entorno da borda externa, na face achatada do corion (figuras 1F). A partir do 4º e 6º dia é possível observar partes esclerotinizadas do embrião imerso no vitelo, o ovo fica esbranquiçado. Entre o 6º e 8º dias observa-se nitidamente os embriões dentro do córion semi-transparente (figura 1G). Os ovos eclodem entre o 8º e o 10º dia após a postura.

Ultraestrutura. As bordas da superfície achatada do ovo possuem células arredondadas, profundas e com diâmetro variado (figura 3A), na região central do córion as células são pouco aparentes (figura 3B), a carena é espessa. As aerópilas localizam-se entre as células, na carena, ficam mais separadas à medida que se afastam da região central (figura 3A-B), sendo ausentes na região da micrópila. O pólo da micrópila é uma pequena área é plana (figura 2B), formada de placas penta e hexagonais dispostas ao redor de placas em forma de pétalas, arranjadas em desenho de flor (figura 4A). O centro da micrópila é marcado por uma placa estrelar, com poros na sua borda (entre 13-14).

Eacles imperialis cacicus (Boisduval, 1868)

Figuras 1B, 1H, 1I,1J, 2C,2D, 3C, 3D, 4B

Observação dos ovos durante o desenvolvimento do embrião.

Comprimento médio 3,354 mm, largura média 2,763 mm (tabela 1). Os ovos possuem cor verde do momento da postura (figura 1H) até o 7º dia, no entanto, entre o 5º e 6º dias é possível visualizar as primeiras partes esclerotinizadas do embrião interno ao corion (figura 1I). Não há formação visível da banda germinativa. Entre o 8º e 9º dias pode-se observar nitidamente os embriões sob córion semi-transparente (figura 1J). Os ovos eclodem entre o 11º e o 13º dia após a postura.

Ultraestrutura. As células são proeminentes, com aspecto em alto-relevo ou infladas, são ovóides na extrema borda, alterando seu formato para meia lua ou semi-círculo gradativamente à medida que se aproximavam região central (figura 3C), onde são ausentes (figura 3D). As aerópilas, localizam-se entre as células, na carena, ficam mais separadas à medida que se afastam da região central (Figura 2C-D), sendo ausentes na extremidade das bordas e região da micrópila. O pólo da micrópila é uma pequena área é plana (Figura 2D), formada de placas penta e hexagonais dispostas ao redor de placas em forma de pétalas, arranjadas em desenho de flor (Figura 4B). O centro da micrópila exibe uma placa arredondada com borda irregular contendo poros (entre 9-10).

Othorene hodeva (Druce, 1904)

Figuras 1C, 2E, 2F, 3E, 3F, 4C

Observação dos ovos durante o desenvolvimento do embrião.

Comprimento médio 3,780 mm, largura média 2,552 mm (tabela 1). A amostra de ovos de *Othorene odeva* (figura 1C) foi muito pequena (12 ovos), portanto não foi possível a observação das características exibidas no córion durante o desenvolvimento do embrião.

Ultraestrutura. Toda superfície do córion possui células arredondadas que são mais amplas e profundas nas bordas (figura 3E), na região central as células são mais uniformes quanto ao diâmetro (figura 3F), a carena é espessa. As aerópilas são igualmente distribuídas por toda a superfície do córion (figura 3E-F), com exceção da região da micrópila, onde são ausentes. O pólo da micrópila é uma área plana (figura 2F), formada de placas penta e hexagonais dispostas ao redor de placas em forma de pétalas, arranjadas em desenho de flor (Figura 4C). No centro da micrópila evidenciou-se uma placa estrelar com borda contendo entre 11 e 15 poros.

Syssphinx molina (Cramer, 1780)

Figuras 1D, 1K, 1L, 1M, 1N, 2G, 2H, 3G, 3H, 4D

Observação dos ovos durante o desenvolvimento do embrião:

Comprimento médio 2,411 mm, largura média 2,079 (tabela 1). O ovo possui cor verde claro nas primeiras 24 horas após a postura (figura 1K), 3 dias após a postura é evidente a formação da banda germinativa através uma linha escura envolta da borda externa (figura 1L). Entre o 4º e 6º dias é possível observar partes esclerotinizadas do embrião imerso no vitelo, o ovo possui cor esbranquiçada. Entre o 6º e 8º dias pode-se observar nitidamente os embrião sob córion transparente, mas opaco em condições natural (figura 1M), se emergido em álcool torna-se translúcido e é possível observar mais detalhes das cores e formas do embrião (figura 1N). Os ovos eclodem entre o 9º e o 11º dia após a postura.

Ultraestrutura: toda superfície do córion possui células arredondadas de tamanho uniforme com carena espessa (figura 3G), exceto na

região central, onde as células são ausentes (figura 3H). As aerópilas são igualmente distribuídas por toda a superfície do córion (figura 3G-H), com exceção da região da micrópila, onde são ausentes. O pólo da micrópila é uma pequena área é plana (figura 2H), formada de placas penta e hexagonais dispostas ao redor de placas em forma de pétalas, arranjadas em desenho de flor (figura 4D). No centro da micrópila evidenciou-se uma placa estrelar com borda contendo entre 11 e 15 poros.

Tabela 1. Medidas de tendência central e dispersão das dimensões lineares dos ovos das espécies de Ceratocampinae

Espécies	Dimensão linear	Média/des.padrão	IC (95%)	Max	Min
<i>A. catoxantha</i>	Comprimento do ovo	1,797±0,063	1,719-1,874	1,884	1,709
	Maior largura	1,523±0,095	1,405-1,641	1,645	1,427
<i>E. imperialis</i>	Comprimento do ovo	3,354±0,008	3,343-3,365	3,366	3,345
	Maior largura	2,763±0,112	2,625-2,902	2,902	2,630
<i>O. hodeva</i>	Comprimento do ovo	3,780±0,025	3,740-3,821	3,821	3,757
	Maior largura	2,552±0,030	2,504-2,599	2,585	2,518
<i>S. molina</i>	Comprimento do ovo	2,411±0,010	2,395-2,427	2,423	2,399
	Maior largura	2,079±0,094	1,929-2,229	2,190	1,998

Fonte: CÂMARA, J. T. (2017).

Figura 1. A-D, Vista dorsal dos espécimes adultos. **A**, *Adeloneivaia catoxantha*. **B**, *Eacles imperialis*. **C**, *Othorene hodeva*. **D**, *Syssphinx molina*. **E-G**, ovos de *Adeloneivaia catoxantha*. **E**, 24 horas após postura. **F**, 48 horas após postura. **G**, 8 dias após postura. **H-J**, ovos de *Eacles imperialis*. **H**, 24 horas após postura. **I**, 5 dias após postura. **J**, 9 dias após postura. **K-N**, ovos de *Syssphinx molina*. **K**, 24 horas após postura. **L**, 5 dias após postura. **M**, 8 dias após postura. **N**, ovo imerso em álcool 70%, com 8 dias após postura. **emb**, esclerotização inicial do embrião; **ie**, ovo infértil, **gb**, banda germinativa

Fonte: CÂMARA, J. T. (2017).

Figura 2. A-H, Vista geral dos ovos. A-B, *Adeloneivaia catoxantha*. C-D, *Eacles imperialis*. E-F, *Othorene hodeva*. G-H, *Syssphinx molina*. b. bordas da face achatada do ovo; rc. região central; pm. polo da micrópila

Fonte: CÂMARA, J. T. (2017).

Figura 3. **A-B**, *Adeloneivaia catoxantha*: **A**, vista da borda; **B**, vista da região central. **C-D**, *Eacles imperialis*: **C**, vista da borda; **D**, vista da região central. **E-F**, *Othorene hodeva*: **E**, vista da borda; **F**, vista da região central. **G-H**, *Syssphinx molina*: **G**, vista da borda; **H**, vista da região central. **a.** aerópila; **c.** célula; **ca.** carena

Fonte: CÂMARA, J. T. (2017).

Figura 4. A-D, região da micrópila: A, *Adeloneivaia catoxantha*. B, *Eacles imperialis*. C, *Othorene hodeva*. D, *Syssphinx molina*

Fonte: CÂMARA, J. T. (2017).

5.2 PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DE CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DE TECIDO EMBRIONÁRIO DE *SYSSPHINX MOLINA* (CRAMER)

O procedimento de submeter os ovos às baixas temperaturas, em refrigerador (média de 8°C), mostrou-se eficaz para aumentar o tempo de viabilidade do material biológico aqui estudado. Os ovos maduros, aqueles que apresentavam coloração escura a olho nu, quando submetidos, até 8 dias à temperatura do refrigerador e novamente levados à temperatura ambiente, eclodiam normalmente. Para obter células viáveis em cultura celular, os ovos permaneceram até quinze dias em situação de refrigeração. A refrigeração dos ovos, além de conservar a vida das células do embrião, também estacionou a fase embrionária desejada.

A células embrionárias de *Syssphinx molina* (Cramer) foram cultivadas por duas passagens em 16 dias. Os “explantes” obtidos dos embriões macerados não aderiram ao recipiente de cultivo. As células dissociadas a partir deles proliferaram (figura 5A). O aumento do número de células foi observado ainda no terceiro dia de cultura, àquelas obtidas de embriões precoces (2-3 dias) expandiram mais rapidamente quando comparados às obtidas de embriões maduros (figura 5A e B).

O protocolo utilizado neste estudo para o cultivo das células embrionárias, usando meio de cultura DMEN-High, temperatura de 25° C com adição de CO₂, não é convencional em estudos com células de insetos, no entanto mostrou-se eficaz para cultura de células embrionárias de *S. molina*.

Ainda da primeira passagem, com sete dias de cultura, as células obtidas de embriões prematuros exibiam variações de forma, a maioria arredondadas e algumas fusiformes (figura 5C). As células de embriões maduros, com o mesmo tempo de cultivo, eram homogêneas quanto à forma, maioria das células arredondadas (figura 5D).

O percentual de formas celulares (arredondadas, poligonal e fusiforme) foi alterado durante os 15 dias observação. Aquelas obtidas de embriões precoces apresentaram as três formas de células antes daquelas obtidas de embriões maduros. A forma predominante, em culturas de embriões

precoces, foi a poligonal em todas as fazes observadas após seis dias de cultivo (figura 6). Quanto à cultura de células obtida de embriões maduros, as quantidades de células arredondadas foram gradativamente sendo superadas em quantidade por células poligonal e, em seguida foram predominantes as células com fusiformes. Predominando na última observação (15 dias), a forma fusiforme (figura 7).

Com a análise das células por citometria de fluxo, foi observado nos dois grupos (células de embriões precoces e maduros) uma população única em seu volume e granulosidade (figuras 8A e B). Através da análise do ciclo celular foi observada a capacidade proliferativa das células (figuras 8C e D). A maior parte do material avaliado nas duas amostras corresponde a matéria não viva, possivelmente decorrência da morte de algumas células, mas também pode ser resíduos do córion dos ovos que foram macerados.

As células viáveis das culturas de embriões precoces e maduros foram, respectivamente, 23,99% e 16,67%. A taxa de células no estágio G1/G0 do ciclo celular foi mais alta no grupo de células de embriões maduros, sendo observado também maior aumento de células no período S/G2 neste grupo, quando comparado com células de ovos precoces (figura 8 E).

Os resultados observados mostraram que a população de células dos embriões maduros apresenta maior índice proliferativo do que a população de embriões jovens (figuras 8C, D e E). Ou seja, embora as células dos embriões jovens tenham um crescimento e diferenciação mais precoce, aquelas obtidas de embriões maduros, que crescem de forma menos acelerada no início do cultivo, apresentam maior taxa de diferenciação após 15 dias de cultura primária.

Figura 5. Cultura de células de *Syssphinx molina*. A, células obtidas de embriões precoces (EP) aos três dias de cultivo; B, células obtidas de embriões maduros (EM) aos três dias; C, células obtidas de EP aos seis dias; D, células obtidas de EM aos seis dias; E, células obtidas de EP aos 10 dias; F, células obtidas de EM aos 10 dias; G, células obtidas de EP aos 15 dias; H, células obtidas de EM aos 15 dias

Fonte: CÂMARA, J. T. (2017).

Figura 6. Dados sobre a morfologia das células em cultura célula primária de embriões precoces (2-3 dias após a postura) de *Syssphinx molina*

Fonte: CÂMARA, J. T. (2017).

Figura 7. Dados sobre a morfologia das células em cultura célula primária de embriões maduros (7-8 dias após a postura) de *Syssphinx molina*

Fonte: CÂMARA, J. T. (2017).

Figura 8. Citometria de fluxo e histograma de avaliação das culturas. A-B, gráfico de granulosidade (SSC) versus tamanho (FSC); A, população celular obtida de embriões precoces (EJ); B, população celular obtida de embriões maduros (EM); C-D, gráficos das atividades do ciclo celular; C, população celular obtida de EP; D, população celular obtida de EM; E, histograma do percentual de células em atividade proliferativa, segundo fases do ciclo celular

Fonte: CÂMARA, J. T. (2017).

5.3 CICLO CELULAR PÓS-CONGELAMENTO

5.3.1 Cultura de células de embriões precoces

Os resultados do teste do ciclo celular com células obtidas de embriões precoces após o congelamento estão expressos nas figuras 9, 10 e 11. Durante onze dias de cultivo e dez passagens realizadas (uma a cada 24 horas), foram analisadas células semi-aderentes, aqui denominadas aderentes (figura 9 e 10), e do sobrenadante (figuras 9 e 11) das culturas, para cada uma das 10 passagens.

As células mortas ou DNA fragmentado obtiveram percentuais médios expressivos em todas as passagens analisadas. Os percentuais médios para o estágio G0/G1 do ciclo celular foram altos em todas as amostras, ficando próximo a de 60% das células, tanto nas aderentes quanto em do sobrenadante (figuras 9, 10 e 11). Houve uma redução da média de G0/G1 após a P6, quanto ocorreu aumento, principalmente, dos percentuais médios de células em fase S (figuras 9G-K, 10G-K e 11G-K). A sincronização do ciclo celular, com maior percentual de células em G0/G1, em ambos os tipos células, ocorreu na P5, correspondendo a 62% de células aderentes e 62,5% em células do sobrenadante (figuras 9F, 10F e 11F).

Poucas células se apresentaram na fase G2/M do ciclo celular tanto nas amostras de células aderentes quanto nas células do sobrenadante de embriões jovens. As amostras que mais se destacam no que diz respeito às maiores médias foram aderentes de P0, do sobrenadante de P1, aderentes e do sobrenadante de P2. Nestas amostras as médias de células em G2/M são superiores a 5% (figuras 9A, B e C; 10A e C; 11B e C).

Figura 9. Gráficos com médias dos eventos de sincronização do ciclo células nas passagens de 0-10, de células cultivadas a partir de embriões precoces de *S. molina*: A=P0, B=P1, C=P2, D=P3, E=P4, F=P5, G=P6, H=P7, I=P8, J=P9, K=P10

Fonte: CÂMARA, J. T. (2017).

Figura 10. Ciclo celular de células aderentes de embriões precoces, pós congelamento: A=P0, B=P1, C=P2, D=P3, E=P4, F=P5, G=P6, H=P7, I=P8, J=P9, K=P10

Fonte: CÂMARA, J. T. (2017).

Figura 11. Ciclo celular de células do sobrenadante de embriões precoces, pós congelamento:
A=P0, B=P1, C=P2, D=P3, E=P4, F=P5, G=P6, H=P7, I=P8, J=P9, K=P10

Fonte: CÂMARA, J. T. (2017).

5.3.2 Cultura de células de embriões maduros

Os resultados do teste do ciclo celular com células obtidas de embriões maduros após o congelamento estão expressos nas figuras 12, 13 e 14. Durante onze dias de cultivo e dez passagens realizadas (uma a cada 24 horas), foram analisadas células semi-aderentes, aqui denominadas aderentes (figuras 12 e 13), e do sobrenadante (figuras 12 e 14) das culturas, para cada uma das 10 passagens.

As células mortas ou DNA fragmentado obtiveram percentuais médios expressivos em todas as passagens analisadas, nas passagens P1, P2, P3, P4, P5 e P7 são próximas a 40% das amostras em ambos os tipos de células (aderentes e do sobrenadante).

Os percentuais médios para o estágio G0/G1 do ciclo celular foram os expressivos na maioria das amostras, ficando próximo a de 60% das células, tanto nas aderentes quanto em do sobrenadante (figuras 12, 13 e 14). Houve sensível redução da média de G0/G1 em células do sobrenadante de P1 e em ambas as células de P6, sendo que na ultima ocorreu aumento de células em fase S e G2/M (figuras 12G, 13G e 14G). Os maiores percentuais de células em G0/G1 foram obtidos em células aderentes de P0, P1, respectivamente 64% e 62,5 % (figuras 12A-B, 13-A-B). A partir da sexta passagem (P6-P10) foram observadas maiores percentuais de células em fase S (figuras 12G-K, 13 G-K; 14 G-K).

A maioria das amostras possuíam poucas células na fase G2/M do ciclo celular tanto nas amostras de células aderentes quanto nas células do sobrenadante de embriões jovens. No entanto, as células aderentes da P0 têm percentual médio acima de 40%. As amostras da P6 também apresentaram quantidades expressivas de células em G2/M, acima de 5% (figuras 12A e G; 13A e G; 14G).

Figura 12. Gráficos com médias dos eventos de sincronização do ciclo células nas passagens de 0-10, de células cultivadas a partir de embriões maduros de *S. molina*: A=P0, B=P1, C=P2, D=P3, E=P4, F=P5, G=P6, H=P7, I=P8, J=P9, K=P10

Fonte: CÂMARA, J. T. (2017).

Figura 13. Ciclo celular de células aderentes de embriões maduros, pós congelamento: A=P0, B=P1, C=P2, D=P3, E=P4, F=P5, G=P6, H=P7, I=P8, J=P9, K=P10

Fonte: CÂMARA, J. T. (2017).

Figura 14. Ciclo celular de células do sobrenadante de embriões maduros, pós congelamento:
A=P0, B=P1, C=P2, D=P3, E=P4, F=P5, G=P6, H=P7, I=P8, J=P9, K=P10

Fonte: CÂMARA, J. T. (2017).

5.4 ANÁLISE COM MARCADORES ESPECÍFICOS

As células analisadas com diferentes marcadores foram oriundas de dois tipos de culturas secundárias, obtidas de embriões precoces (EP) e de embriões maduros (EM). Foram escolhidas duas passagens para esta análise: passagem zero (P0), com 24h após o descongelamento antes da primeira lavagem; e passagem seis (P6), após a sexta lavagem de células, no sétimo dia de cultivo após o descongelamento. Para cada passagem, foram analisadas duas populações de células, aquelas semi-aderentes ao recipiente de cultivo (ad), aqui denominadas aderentes, e aquelas coletadas no líquido sobrenadante (sob). Foram utilizados 23 marcadores, que foram agrupados com a utilização dos seguintes critérios: (1) marcadores específicos para células de insetos, (2) marcadores de células multi ou pluripotentes, (3) marcadores de diferenciação celular, (4) morte e proliferação celular, (5) marcadores de chaperonas, e (6) marcadores de sistema hematopoiético. A análise dos dados foi baseada na definição da população celular contida no quadrante R1 dos histogramas adquiridos no programa WinMdi 2.9 (*gate R1*), por se entender que células marcadas com unidades arbitrárias de fluorescência com tamanho e granulosidades, abaixo de 10^1 na escala logarítmica forma consideradas negativas e que não expressam o marcador.

Além de apresentar em histogramas e gráficos os dados obtidos com as análises já mencionadas, os resultados foram compilados em tabelas e são mostrados no apêndice desse trabalho (tabelas 2 e 3 - APÊNDICE).

5.4.1 Marcadores específicos para células de insetos

Foram utilizados com marcadores específicos para insetos aqueles já utilizados em estudos realizados com *Drosophila melanogaster*: Schneider L2; Anti-Axons do sistema nervoso central de *Drosophila* (Anti-Axons); Anti-GM130 marcador de cis-Golgi de *Drosophila* (GM-130); e Anti-Rab5 marcador de amadurecimento de endossomo de *Drosophila* (RAB5).

Nas análises dos percentuais para o primeiro grupo, ou seja, células de embriões precoces aderentes ao recipiente de cultura, na passagem zero (P0EP-ad) foram obtidos os seguintes resultados: Schneider L2 ($14,9\% \pm 1,3$), Anti-axons ($14,8\% \pm 1,3$), GM-130 ($51,6\% \pm 2,4$) e RAB5 ($48,2\% \pm 2,3$) (figuras 15

C,E,G e 16 A). Para outro grupo de células com das mesmas características, mas da sexta passagem (P6EP-ad) foram obtidos as seguintes percentuais de células marcadas: Schneider L2 ($10,2\% \pm 1,1$), Anti-axons ($10,9\% \pm 1,1$), GM-130 ($44,5\% \pm 2,2$) e RAB5 ($45,4\% \pm 2,2$) (figuras 15 D,F,H e 16 B).

As células de embriões precoces, também da passagem zero e contidas no sobrenadante do cultivo celular (P0EP-sob) apresentaram os seguintes resultados: Schneider L2 ($14,2\% \pm 1,3$), Anti-axons ($15,2\% \pm 1,3$), GM-130 ($43,6\% \pm 2,2$) e RAB5 ($50,4\% \pm 2,4$) (figuras 16 E, G e 17 A, C). Já as populações de células com as mesmas características, mas da sexta passagem (P6EP-sob), com os seguintes percentuais: Schneider L2 ($17,3\% \pm 1,4$), Anti-axons ($24,6\% \pm 1,7$), GM-130 ($45,6\% \pm 2,6$) e RAB5 ($48,8\% \pm 2,3$) (figuras 16 F, H e 17 B, D).

Com as células de embriões maduros, aderentes ao recipiente de cultura, na passagem zero (P0EM-ad) foram obtidos os seguintes resultados: Schneider L2 ($3,0\% \pm 0,6$), Anti-axons ($11,0\% \pm 1,1$), GM-130 ($42,8\% \pm 2,2$) e RAB5 ($32,4\% \pm 1,9$) (figuras 18 C, E, G e 19 A). Já as populações celulares na sexta passagem (P6PE-ad) expressaram com a seguir: Schneider L2 ($5,6\% \pm 0,8$), Anti-axons ($9,8\% \pm 1,0$), GM-130 ($27,4\% \pm 1,7$) e RAB5 ($22,8\% \pm 1,6$) (figuras 18 D,F,H e 19 B).

As marcação de células de embriões maduros, sobrenadantes no meio de cultura na passagem zero (P0EM-sob) foram: Schneider L2 ($6,5\% \pm 0,8$), Anti-axons ($12,7\% \pm 1,2$), GM-130 ($28,8\% \pm 1,8$) e RAB5 ($31,7\% \pm 1,9$) (figuras 19 E, G e 20 A, C). E nas populações também de embriões maduros, do sobrenadante, da sexta passagem (P6EM-sob) foram obtidos os seguintes resultados: Schneider L2 ($2,1\% \pm 0,5$), Anti-axons ($5,3\% \pm 0,8$), GM-130 ($68,2\% \pm 2,7$) e RAB5 ($73,5\% \pm 2,8$) (figuras 19 F, H e 20 B, D).

Figura 15. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos específicos para *Drosophila*: **A, C, E e G**, células aderentes de embriões precoce na passagem zero; **B, D, F e H** células aderentes de embriões precoce na sexta passagem

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9.

Figura 16. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos específicos para *Drosophila*: **A**, células aderentes de embriões precoce na passagem zero; **B**, células aderentes de embriões precoce na sexta passagem; **C**, **E** e **G** células do sobrenadante de embriões precoce na passagem zero; **D**, **F** e **G**, células do sobrenadante de embriões precoce na sexta passagem

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9.

Figura 17. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos específicos para *Drosophila*: **A, C**, células do sobrenadante de embriões precoce na passagem zero; **B, D**, células do sobrenadante de embriões precoce na sexta passagem

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9.

Figura 18. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos específicos para *Drosophila*:

A, C, E, G, células do sobrenadante de embriões maduros na passagem zero; **B, D, F, H,** células do sobrenadante de embriões maduros na sexta passagem

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9.

Figura 19. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos específicos para *Drosophila*:

A, células aderentes de embriões maduros na passagem zero; **B**, células aderentes de embriões maduros na sexta passagem; **C**, **E** e **G** células do sobrenadante de embriões maduros na passagem zero; **D**, **F** e **H**, células aderentes de embriões maduros na sexta passagem

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9.

Figura 20. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos específicos para *Drosophila*:

A, C, células do sobrenadante de embriões maduros na passagem zero; **B, D,** células do sobrenadante de embriões maduros na sexta passagem

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9.

A análise estatística, realizada no programa Graphpad Prism 5, mostrou a diferença na expressão dos marcadores nas células cultivadas a partir de embriões de *Syssphinx molina*.

Entre as populações de embriões precoces, passagem zero e sexta passagem, tanto nas células aderentes quanto em células do sobrenadante, foram expressos de forma diferencial os marcadores: Schneider L2, Anti-axons, GM-130 e RAB5 (figura 20). Com as células cultivadas de embriões maduros, a expressão diferencial dos marcadores foi semelhante, com exceção do Schneider L2 que não foi expresso diferencialmente nas células da sexta passagem, sendo que os percentuais, tanto as amostras de células aderentes quanto do sobrenadante, marcadas foi menor que aqueles das amostras dos grupos controles (figura 22).

Figura 21. Comparação de expressão diferencial em células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos específicos para *Drosophila*

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Figura 22. Comparação de expressão diferencial em células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos específicos para *Drosophila*

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

GM-130 e RAB5 foram expressos com maior percentual nas células analisadas, seja aquelas de embriões precoces ou maduros, aderentes ou do sobrenadante, passagem zero ou sexta passagem (figuras 21 e 22).

A proteína RAB5 se localiza no endossoma precoce e está envolvida no recrutamento de outras proteínas e na maturação dos endossomas para o final deste compartimento (HUOTARI; HELENIU, 2011). Ela conduz a maturação dos endossomas, transportando vacúolos contendo (H⁺)–ATPase e (V-ATPases) da rede trans-Golgi para vesículas endocíticas (ZHANG et al., 2011). Já a proteína GM-130 é responsável pelo recrutamento de outras proteínas na superfície “cis” do aparelho de Golgi (WILSON et al., 2011). Ou seja, ambos os marcadores sinalizam acentuada taxa de metabolismo celular nas culturas.

Depois dos marcadores acima mencionados, Anti-Axons foi aquele com maior taxa de expressão. Schneider L2 foi o marcador de menor expressão para as amostras analisadas (figuras 21 e 22).

O Anti-axons marca proteínas das células do sistema nervoso central de *Drosophila melanogaster* e, nesse estudo também marcou quantidades razoáveis de células de *Syssphinx molina*.

Quanto ao marcador Schneider L2 é positivo ao fator de transcrição nuclear GAGA.

Dentre as amostras analisadas (P0/P6 e ad/sob) ocorreu maior variação em percentual de células marcadas com os quatro marcadores específico de insetos naquelas obtidas de embriões maduros. Entre as amostras de células de embriões precoces, os percentuais das amostras são semelhantes (figuras 21 e 22).

5.4.2 Marcadores de células multi e pluripotentes

Os marcadores utilizados para células multi e pluripotentes foram: Anti-CD117, Anti-CD105, Anti-SSEA-4 e Oct 3/4. Esses anticorpos são comumente utilizados para detectar células tronco em vertebrados. Nas amostras de *Syssphinx molina*, as proteínas sinalizadas pelos anticorpos foram encontradas.

Nas células de embriões precoces, aderentes, na passagem zero (P0EP-ad) foram obtidos os seguintes resultados: Anti-CD117 ($22,6\% \pm 1,6$), Anti-CD105 ($31,8\% \pm 1,9$), Anti-SSEA-4 ($17,4\% \pm 1,4$) e Oct 3/4 ($13,9\% \pm 1,2$) (figuras 23 C,E,G e 24 A). Para outro grupo de células com das mesmas características, mas da sexta passagem (P6EP-ad) foram obtidos as seguintes percentuais de células marcadas: Anti-CD117 ($9,7\% \pm 1,0$), Anti-CD105 ($22,0\% \pm 1,6$), Anti-SSEA-4 ($7,9\% \pm 0,9$) e Oct 3/4 ($10,9\% \pm 1,1$) (figuras 23 D,F,H e 24 B).

As células de embriões precoces, também da passagem zero, no sobrenadante do cultivo celular (P0EP-sob) apresentaram os seguintes resultados: Anti-CD117 ($5,9\% \pm 0,8$), Anti-CD105 ($6,4\% \pm 0,8$), Anti-SSEA-4 ($2,0\% \pm 0,5$) e Oct 3/4 ($5,0\% \pm 0,7$) (figuras 24 E, G e 25 A, C). Já as populações

de células com as mesmas características, mas da sexta passagem (P6EP-sob), com os seguintes percentuais: Anti-CD117 ($8,2\% \pm 0,9$), Anti-CD105 ($19,7\% \pm 1,4$), Anti-SSEA-4 ($16,2\% \pm 1,3$) e Oct 3/4 ($11,1\% \pm 1,1$) (figuras 24 F, H e 25 B, D).

O primeiro grupo de células de embriões maduros analisados com os marcadores para células estaminais foram aquele de material aderente ao recipiente de cultura, na passagem zero (P0EM-ad), nas quais foram obtidos os seguintes resultados: Anti-CD117 ($6,5\% \pm 0,8$), Anti-CD105 ($9,0\% \pm 1,0$), Anti-SSEA-4 ($2,3\% \pm 0,5$) e Oct 3/4 ($5,3\% \pm 0,8$) (figuras 26 C, E, G e 27 A). Já as populações celulares na sexta passagem (P6PE-ad) expressaram com a seguir: Anti-CD117 ($5,2\% \pm 0,8$), Anti-CD105 ($18,3\% \pm 1,4$), Anti-SSEA-4 ($4,8\% \pm 0,7$) e Oct 3/4 ($9,5\% \pm 1,0$) (figuras 26 D,F,H e 27 B).

Nas células de embriões maduros, sobrenadantes no meio de cultura na passagem zero (P0EM-sob) foram obtidos os percentuais: Anti-CD117 ($3,1\% \pm 0,6$), Anti-CD105 ($18,1\% \pm 1,4$), Anti-SSEA-4 ($6,5\% \pm 0,8$) e Oct 3/4 ($4,4\% \pm 0,7$) (figuras 27 E, G e 28 A, C). E nas populações de embriões maduros, do sobrenadante, da sexta passagem (P6EM-sob) obteve-se: Anti-CD117 ($8,6\% \pm 0,9$), Anti-CD105 ($10,2\%$), Anti-SSEA-4 ($7,8\% \pm 0,9$) e Oct 3/4 ($4,4\% \pm 0,7$) (figuras 27 F, H e 28 B, D).

Figura 23. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos determinar células multi e pluripotentes: **A, C, E e G**, células aderentes de embriões precoce na passagem zero; **B, D, F e H** células aderentes de embriões precoce na sexta passagem

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9.

Figura 24. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos determinar células multi e pluripotentes: **A**, células aderentes de embriões precoce na passagem zero; **B**, células aderentes de embriões precoce na sexta passagem; **C**, **E** e **G** células do sobrenadante de embriões precoce na passagem zero; **D**, **F** e **G**, células do sobrenadante de embriões precoce na sexta passagem

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9.

Figura 25. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos determinar células multi e pluripotentes: **A, C**, células do sobrenadante de embriões precoce na passagem zero; **B, D**, células do sobrenadante de embriões precoce na sexta passagem

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9.

Figura 26. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos determinar células multi e pluripotentes: **A, C, E e G**, células do sobrenadante de embriões maduros na passagem zero; **B, D, F e H**, células do sobrenadante de embriões maduros na sexta passagem

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9.

Figura 27. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos determinar células multi e pluripotentes: **A**, células aderentes de embriões maduros na passagem zero; **B**, células aderentes de embriões maduros na sexta passagem; **C**, **E** e **G** células do sobrenadante de embriões maduros na passagem zero; **D**, **F** e **G**, células aderentes de embriões maduros na sexta passagem

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9.

Figura 28. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos determinar células multi e pluripotentes: **A, C**, células do sobrenadante de embriões maduros na passagem zero; **B, D**, células do sobrenadante de embriões maduros na sexta passagem

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9

Todos os anticorpos utilizados para marcar células estaminais (multi e pluripotente) foram expresso de forma diferencial em todas, ou na maioria, das populações de células obtidas de embriões precoces (P0EP-ad, P6EP-ad, P0EP-sob e P6EP-sob) (figura 29). Nas células das culturas de embriões maduros, CD-117 foi o único marcador expresso de forma diferencial em todas as amostras de células (figura 30).

A taxa média de células marcadas com CD-105 variou de 5,9% a 22,6% nas populações oriundas de embriões precoces e, de 3,1% a 8,7% nas células de embriões maduros (figuras 29 e 30).

Figura 29. Comparação de expressão diferencial em células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar células multi e pluripotentes

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Figura 30. Comparação de expressão diferencial em células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar células multi e pluripotentes

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

A molécula CD-105, também denominada endoglina, é uma glicoproteína tipo I da membrana da superfície das células e é parte do complexo receptor TGF beta. Essa proteína tem papel importante da angiogenese, ou seja, no papel no desenvolvimento do sistema cardiovascular e na remodelação vascular (SANZ-RODRIGUEZ et al., 2004).

Diferentemente dos mamíferos, o sistema circulatório dos insetos não desempenha papel no transporte de gases (oxigênio e gás carbônico), sendo a sua principal função o transporte de nutrientes, produtos de excreção e hormônios. O aparelho circulatório consta de um vaso localizado dorsal e longitudinalmente no corpo do inseto, chamado vaso dorsal, tecidos associados a este, além de órgãos pulsáteis acessórios. Os órgãos pulsáteis acessórios

são componentes especiais do aparelho circulatório que promovem a irrigação de apêndices como antenas, asas e pernas (GULLAN; CRANSTON, 1994).

As células marcadas com o CD-117, dentre aquelas marcadas com os outros marcadores de células tronco, foram as mais expressivas na maioria das amostras (figuras 29 e 30).

A molécula CD117 é um receptor de tirosina-quinase codificado pelo gene c-kit e seu ligante é o fator de célula estaminal (FCE). O FCE é uma citocina essencial que interage com outras citocinas para preservar a viabilidade de células tronco e progenitoras hematopoiéticas, para influenciar sua entrada no ciclo celular e facilitar sua proliferação e diferenciação. O FCE, por si só, não pode conduzir células progenitoras não cicladas para o ciclo celular, mas impede a sua morte apoptótica. A proteína CD117 é expressa na superfície de células estaminais hematopoiéticas e várias progenitoras multipotentes (EDLING; HALLBERG, 2007, LEONG et al., 2008).

SSEA-4 e Oct3/4 foram os marcadores em que se obteve maior variação de células marcadas nas amostras analisadas, de 2% a 17,4% e de 4,4% a 13,9%, respectivamente.

A glicoproteína SSEA-4 é um marcador da membrana superficial da célula. Sua expressão está associada a células pluripotentes embrionárias de desenvolvimento precoce (ZHAO et al., 2012). Enquanto que a Oct3/4 desempenha um papel fundamental na regulação da pluripotência e diferenciação de células-tronco; Oct4 é restrita a células pluripotentes e linha germinativa e sua expressão é mantida na massa celular interna de blastocistos (PAN et al., 2002). O fato dessas proteínas estarem associadas às fases precoces do desenvolvimento embrionário justifica que as maiores médias foram encontradas em células de embriões precoces (figura 29).

5.4.3 Marcadores de diferenciação celular

Os marcadores utilizados avaliar a diferenciação celular nas culturas de células embrionárias de *S. molina* foram: Anti-Stro-1, Anti-TGFbeta1 e Anti-Vimentina.

Nas análises dos percentuais para o primeiro grupo, ou seja, células de embriões precoces aderentes ao recipiente de cultura, na passagem zero (P0EP-ad) foram obtidos os seguintes resultados: Anti-Stro-1 ($22,8\% \pm 1,6$), Anri-TGFbeta1 ($15,3\% \pm 1,3$) e Anti-Vimentina ($18,4\% \pm 1,4$) (figuras 31 C,E e G). Para outro grupo de células com das mesmas características, mas da sexta passagem (P6EP-ad) foram obtidos as seguintes percentuais de células marcadas: Anti-Stro-1 ($9,0\% \pm 1,0$), Anti-TGFbeta1 ($9,5\% \pm 1,0$) e Anti-Vimentina ($12,5\% \pm 1,2$) (figuras 31 D,F e H).

As células de embriões precoces, também da passagem zero e contidas no sobrenadante do cultivo celular (P0EP-sob) apresentaram os seguintes resultados: Anti-Stro-1 ($0,3\% \pm 0,2$), Anti-TGFbeta1 ($1,2\% \pm 0,4$) e Anti-Vimentina ($20,9\% \pm 1,5$) (figuras 32 C, E e G). Já as populações de células com as mesmas características, mas da sexta passagem (P6EP-sob), com os seguintes percentuais: Anti-Stro-1 ($11,6\% \pm 1,1$), Anti-TGFbeta1 ($12,9\% \pm 1,2$) e Anti-Vimentina ($16,9\% \pm 1,4$) (figuras 32 D, F e H).

Com as células de embriões maduros, aderentes ao recipiente de cultura, na passagem zero (P0EM-ad) foram obtidos os seguintes resultados: Anti-Stro-1 ($4,8\% \pm 0,7$), Anti-TGFbeta1 ($3,6\% \pm 0,6$) e Anti-Vimentina ($5,0\% \pm 0,7$) (figuras 33 C, E e G). Já as populações celulares na sexta passagem (P6PE-ad) expressaram com a seguir: Anti-Stro-1 ($9,9\% \pm 1,0$), Anti-TGFbeta1 ($4,5\% \pm 0,7$) e Anti-Vimentina ($16,3\% \pm 1,3$) (figuras 33 D,F e H).

As marcações de células de embriões maduros, do sobrenadante no meio de cultura na passagem zero (P0EM-sob) foram: Anti-Stro-1 ($7,0\% \pm 0,9$), Anti-TGFbeta1 ($5,0\% \pm 0,7$) e Anti-Vimentina ($27,5\% \pm 1,7$) (figuras 34 C, E e G). E nas populações também de embriões maduros, do sobrenadante, da sexta passagem (P6EM-sob) foram obtidos os seguintes resultados: Anti-Stro-1 ($5,8\% \pm 0,8$), Anti-TGFbeta1 ($4,0\% \pm 0,7$) e Anti-Vimentina ($12,0\% \pm 1,1$) (figuras 34 D, F e H).

Figura 31. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de *Syngnathus molina* marcadas com anticorpos para determinar diferenciação celular: **A, C, E e G**, células aderentes de embriões precoce na passagem zero; **B, D, F e H** células aderentes de embriões precoce na sexta passagem

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9

Figura 32. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de *Syngnathus molina* marcadas com anticorpos para determinar diferenciação celular: **A**, células aderentes de embriões precoce na passagem zero; **B**, células aderentes de embriões precoce na sexta passagem; **C**, **E** e **G** células do sobrenadante de embriões precoce na passagem zero; **D**, **F** e **H**, células do sobrenadante de embriões precoce na sexta passagem

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9.

Figura 33. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar diferenciação celular: **A, C**, células do sobrenadante de embriões precoce na passagem zero; **B, D**, células do sobrenadante de embriões precoce na sexta passagem

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9.

Figura 34. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar diferenciação celular: **A, C, E e G**, células do sobrenadante de embriões maduros na passagem zero; **B, D, F e H**, células do sobrenadante de embriões maduros na sexta passagem

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9.

Com exceção do marcador Anti-Stro1, os demais anticorpos para diferenciação celular foram expressos de forma diferencial em todas as amostras de células de embriões precoces (figura 37). Nas células obtidas nas culturas de embriões maduros, as células da P6EM-ad não foram marcadas de forma diferencial com Stro1 e GFTbeta1 (figura 38). Anti-Vimentina foi expresso diferencialmente em maior percentual de células na maioria das amostras analisadas.

Anti-Stro-1 é bem conhecido como marcador de células-tronco mesenquimais, mas é intrinsecamente um antígeno endotelial (NING et al., 2011). Já o TGFbeta1 induz a transcrição de diferentes genes-alvos que funcionam em diferenciação, quimiotaxia, proliferação e ativação de diversas células imunes (NAKAO et al., 1997, MASSAGUÉ, 2012).

Vimentina é uma proteína da família dos filamentos intermediários. Eles compõem o citoesqueleto, juntamente com microtúbulos e microfilamentos de actina. Esse filamento é usado como marcador para tecidos derivados do mesoderma (MACHADO; FIGUEIREDO, 1996). A Vimentina constitui uma das subunidades do microfimalento detectada durante toda a miogênese, principalmente em estágios iniciais; a variação da expressão de Vimentina no músculo adulto é uma importante característica que se relaciona com a capacidade funcional do mesmo (LAZARIDES, 1982).

Figura 35. Comparação de expressão diferencial em células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar diferenciação celular

Fonte: Câmara, J.T.(2017).

Figura 36. Comparação de expressão diferencial em células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar diferenciação celular

Fonte: Câmara, J.T.(2017).

5.4.4 Marcadores de morte e proliferação celular

Os marcadores utilizados para detectar morte e proliferação celular foram: Anti-Caspase 3 ativa, Anti-P53, Anti-Ki67 e Anti-Ciclina-D1.

Nas células de embriões precoces, aderentes, na passagem zero (P0EP-ad) foram obtidos os seguintes resultados: Anti-Caspase 3 ativa ($30,2\% \pm 1,8$), Anti-P53 ($13,2\% \pm 1,2$), Anti-Ki67 ($16,1\%$) e Anti-Ciclina-D1 ($13,6 \pm 1,2$) (figuras 37 C,E,G e 38 A). Para outro grupo de células com das mesmas características, mas da sexta passagem (P6EP-ad) foram obtidos as seguintes percentuais de células marcadas: Anti-Caspase 3 ativa ($29,7\% \pm 1,8$), Anti-P53 ($9,5\% \pm 1,0$), Anti-Ki67 ($11,2\% \pm 1,1$) e Anti-Ciclina-D1 ($10,7\% \pm 1,1$) (figuras 37 D,F,H e 38 B).

As células de embriões precoces, também da passagem zero, no sobrenadante do cultivo celular (P0EP-sob) apresentaram os seguintes resultados: Anti-Caspase 3 ativa ($28,4\% \pm 1,8$), Anti-P53 ($14,2\% \pm 1,2$), Anti-Ki67 ($14,8\% \pm 1,3$) e Anti-Ciclina-D1 ($17,3\% \pm 1,4$) (figuras 38 E, G e 39 A, C). Entretanto, as populações de células com as mesmas características, mas da sexta passagem (P6EP-sob), com os seguintes percentuais: Anti-Caspase 3 ativa ($36,2\% \pm 2,0$), Anti-P53 ($14,5\% \pm 1,3$), Anti-Ki67 ($14,6\% \pm 1,3$) e Anti-Ciclina-D1 ($12,7\% \pm 1,2$) (figuras 38 F, H e 39 B, D).

O primeiro grupo de células de embriões maduros analisadas com os marcadores para morte e proliferação celular foi aquele aderente ao recipiente de cultura, na passagem zero (P0EM-ad), nas quais foram obtidos os

seguintes resultados: Anti-Caspase 3 ativa ($30,5\% \pm 1,8$), Anti-P53 ($14,2\% \pm 1,2$), Anti-Ki67 ($4,0\% \pm 0,7$) e Anti-Ciclina-D1 ($5,6\% \pm 0,8$) (figuras 39 C, E, G e 40 A). Já as populações celulares na sexta passagem (P6PE-ad) expressaram percentuais de Anti-Caspase 3 ativa ($17,0\% \pm 1,4$), Anti-P53 ($6,0\% \pm 0,8$), Anti-Ki67 ($7,7\% \pm 0,9$) e Anti-Ciclina-D1 ($16,5\% \pm 1,3$) (figuras 39 D,F,H e 40 B).

Nas células de embriões maduros, sobrenadantes no meio de cultura na passagem zero (P0EM-sob) foram obtidos os percentuais: Anti-Caspase 3 ativa ($27,2\% \pm 1,7$), Anti-P53 ($3,1\% \pm 0,6$), Anti-Ki67 ($11,8\% \pm 0,4$) e Anti-Ciclina-D1 ($3,6\% \pm 0,6$) (figuras 40 E, G e 41 A, C). Nas populações de embriões maduros, do sobrenadante, da sexta passagem (P6EM-sob) obteve-se os seguintes resultados: Anti-Caspase 3 ativa ($18,4\% \pm 1,4$), Anti-P53 ($2,1\% \pm 0,5$), Anti-Ki67 ($4,6\% \pm 0,7$) e Anti-Ciclina-D1 ($4,5\% \pm 0,7$) (figuras 40 F, H e 41 B, D).

Figura 37. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar morte e proliferação celular: **A, C, E e G** células aderentes de embriões precoces na passagem zero; **B, D, F e H** células aderentes de embriões precoces na sexta passagem

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9

Figura 38. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar morte e proliferação celular: **A**, células aderentes de embriões precoces na passagem zero; **B**, células aderentes de embriões precoces na sexta passagem; **C**, **E** e **G** células do sobrenadante de embriões precoces na passagem zero; **D**, **F** e **H**, células do sobrenadante de embriões precoces na sexta passagem

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9.

Figura 39. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar morte e proliferação celular: A e C células do sobrenadante de embriões precoces na passagem zero; B e D, células do sobrenadante de embriões precoces na sexta passagem

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9.

Figura 40. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar morte e proliferação celular: A, C, E e G células aderentes de embriões maduros na passagem zero; B, D, F e H células aderentes de embriões maduros na sexta passagem

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9.

Figura 41. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar morte e proliferação celular: **A**, células aderentes de embriões maduros na passagem zero; **B**, células aderentes de embriões maduros na sexta passagem; **C**, **E** e **G** células do sobrenadante de embriões maduros na passagem zero; **D**, **F** e **H**, células do sobrenadante de embriões maduros na sexta passagem

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9.

Figura 42. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar morte e proliferação celular: **A** e **C** células do sobrenadante de embriões maduros na passagem zero; **B** e **D**, células do sobrenadante de embriões maduros na sexta passagem

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9

Dentre as oito amostras de células cultivadas analisadas o percentual de marcação da Anti-Caspase 3 ativa variou de 17,0% (P6EM-ad) a 36,2% (P6EP-sob) (figuras 43 e 44). Esse anticorpo marca a proteína que sinaliza para a apoptose celular, levando a condensação e fragmentação da nuclear, externalização de fosfolipídios à membrana plasmática que irão sinalizar para estas células fagocitadas (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

Considerável percentual de células apoptóticas, principalmente entre as células cultivadas de embriões precoces foram levadas à apoptose por conta de danos no material genético no momento da divisão celular. Esse dado é sugerido pelas células marcadas de forma diferencial com P53 (figuras 43 e 44), esta proteína é ativada quando ocorrem danos no DNA, resultando na parada do ciclo celular na fase G1 para iniciar o reparo do DNA (Sherr, 2000).

Figura 43. Análise de células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar morte e proliferação celular

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Figura 44. Análise de células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar morte e proliferação celular

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Por outro lado, as taxas de expressão dos marcadores que sinalizam a proliferação celular também foram significativamente diferentes entre as diferentes populações celulares para os marcadores Anti-Ki-67 e Ciclina-D1. O antígeno Ki-67 é uma proteína nuclear que está associada e pode ser necessária para a proliferação celular. Além disso, está associada à transcrição do RNA ribossomal (BULLWINKEL et al., 2006). A inativação do antígeno Ki-67 conduz à inibição da síntese de RNA ribossômico (RAHMANZADEH et al., 2007). Enquanto que, a Anti-Ciclina D1 é uma proteína necessária para a progressão através da fase G1 do ciclo celular; durante a fase G1, é sintetizada rapidamente e acumula-se no núcleo, é degradada à medida que a célula entra na fase S (BALDIN et al., 1993). Ou seja, estes dois marcadores confirmam a

proliferação constante das células em culturas observada diariamente e através da análise do ciclo celular.

5.4.5 Marcadores de chaperonas

Chaperonas são proteínas que auxiliam no dobramento ou desdobramento covalente e na montagem ou desmontagem de outras estruturas macromoleculares. Alguns sistemas chaperonas servem de suporte e dobram as proteínas, outras chaperonas se ligam ao dobramento intermediário para evitar sua agregação com outra molécula (HOFFMANN, et al., 2003, ELLIS, 2006).

Foram utilizados os marcadores Anti-HSP-70 e Anti-HSP-47 para se detectar o possível envolvimento dessas chaperonas na manutenção das populações de células embrionárias de *S. molina* mantidas em cultura. As HSP são proteínas de choque térmico (do termo em inglês *heat shock proteins*) são chaperonas que ajudam a proteger as células em situação de estresse (MAYER; BUKAU, 2005).

Nas células de embriões precoces, aderentes, na passagem zero (P0EP-ad) foram obtidos os seguintes resultados: Anti-HSP-70 ($17,1\% \pm 1,4$) e Anti-HSP-47 ($13,8\% \pm 1,2$) (figuras 45 C e E). Para outro grupo de células com das mesmas características, mas da sexta passagem (P6EP-ad) foram obtidos as seguintes percentuais de células marcadas: Anti-HSP-70 ($11,3\% \pm 1,1$) e Anti-HSP-47 ($10,8\% \pm 1,1$) (figuras 45 D e F).

As células de embriões precoces, também da passagem zero, no sobrenadante do cultivo celular (P0EP-sob) apresentaram os seguintes resultados: Anti-HSP-70 ($0,1\% \pm 0,1$) e Anti-HSP-47 ($4,6\% \pm 0,7$) (figuras 46 A e C). Já as populações de células com as mesmas características, mas da sexta passagem (P6EP-sob), com os seguintes percentuais: Anti-HSP-70 ($10,3\% \pm 1,1$) e Anti-HSP-47 ($14,9\% \pm 1,3$) (figuras 46 B e D).

O primeiro grupo de células de embriões maduros analisadas com os marcadores para proteínas de choque térmico foi aquele aderente ao recipiente de cultura, na passagem zero (P0EM-ad), nas quais foram obtidos os seguintes resultados: Anti-HSP-70 ($3,8\% \pm 0,6$) e Anti-HSP-47 ($5,4\% \pm 0,8$) (figuras 47 C e E). Já as populações celulares na sexta passagem (P6PE-ad)

expressaram com a seguir: Anti-HSP-70 ($4,8\% \pm 0,7$) e Anti-HSP-47 ($3,3\% \pm 0,6$) (figuras 47 D e F).

Nas células de embriões maduros, as células contidas nos sobrenadantes no meio de cultura na passagem zero (P0EM-sob) foram obtidos os percentuais: Anti-HSP-70 ($5,7\% \pm 0,8$) e Anti-HSP-47 ($2,6\% \pm 0,5$) (figuras 48 A e C). E nas populações de embriões maduros, do sobrenadante, da sexta passagem (P6EM-sob) obteve-se: Anti-HSP-70 ($9,2\% \pm 0,1$) e Anti-HSP-47 ($7,2\% \pm 0,9$) (figuras 48 B e D).

Figura 45. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para avaliar a expressão de chaperonas: **A, C, e E**, células aderentes de embriões precoce na passagem zero; **B, D, e F** células aderentes de embriões precoce na sexta passagem; **G**, célula do sobrenadante de embriões precoce de passagem zero; **H**, células do sobrenadante de embriões precoce na sexta passagem

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9.

Figura 46. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar avaliar a expressão de chaperonas: **A e C**, células do sobrenadante de embriões precoce na passagem zero; **B e D**, células do sobrenadante de embriões precoce na sexta passagem

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9.

Figura 47. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para avaliar a expressão de chaperonas: **A, C, e E** células aderentes de embriões maduros na passagem zero; **B, D e F** células aderentes de embriões maduros na sexta passagem; **G**, célula do sobrenadante de embriões maduros de passagem zero; **H**, células do sobrenadante de embriões precoce na sexta passagem

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9.

Figura 48. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para avaliar a expressão de chaperonas: **A e C**, células do sobrenadante de embriões maduros na passagem zero; **B e D**, células do sobrenadante de embriões maduros na sexta passagem

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9.

As chaperonas HSP-70 e HSP-47 forma marcadas de forma diferencial em todas as amostras de embriões precoces e nas amostras de P0EM(ad) e P6EM(sob) (figuras 49 e 50).

A HSP-70 atuam na montagem, transporte e regulação da atividade de proteínas através de sua interação com os segmentos peptídicos hidrofóbicos das proteínas num processo regulado por ATP, está associada à vários mecanismos complexos do metabolismo celular (MEYER; BUKAU, 2005). Enquanto que a HSP-47 é uma chaperona, geralmente, encontrada no lúmen do retículo endoplasmático e está associada a maturação do colágeno (DAFFORN; DELLA; MILLER, 2001).

Figura 49. Comparação de expressão diferencial em células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar chaperonas

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Figura 50. Comparação de expressão diferencial em células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar chaperonas

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

5.4.6 Marcadores de sistema hematopoiético

Os marcadores utilizados para detectar células com características do sistema hematopoiético foram: Anti-CD24, Anti-CD43, Anti-CD90, Anti-CD73, Anti-MCP1 e Anti-HLA-DR.

Nas células de embriões precoces, aderentes, na passagem zero (P0EP-ad) foram obtidos os seguintes resultados: Anti-CD24 ($8,2 \pm 0,9$), Anti-CD43 ($17,0 \pm 1,4$), Anti-CD90 ($23,4 \pm 1,6$), Anti-CD73 ($14,3 \pm 1,3$), Anti-MCP1 ($18,3 \pm 1,4$) e Anti-HLA-DR ($36,6 \pm 2,0$) (figuras 51 C, E, G e 52 A, C, E). Para outro grupo de células com das mesmas características, mas da sexta passagem (P6EP-ad) foram obtidos as seguintes percentuais de células marcadas: Anti-CD24 ($3,6 \pm 0,6$), Anti-CD43 ($7,3 \pm 0,9$), Anti-CD90 ($8,2 \pm 1,0$),

Anti-CD73 ($5,6 \pm 0,8$), Anti-MCP1 ($16,0 \pm 1,3$) e Anti-HLA-DR ($33,3 \pm 1,9$) (figuras 51 D, F, H e 52 B, D, F).

As células de embriões precoces, também da passagem zero, no sobrenadante do cultivo celular (P0EP-sob) apresentaram os seguintes resultados: Anti-CD24 ($1,8 \pm 0,4$), Anti-CD43 ($8,2 \pm 1,0$), Anti-CD90 ($10,7 \pm 1,1$), Anti-CD73 ($25,5 \pm 1,7$), Anti-MCP1 ($24,1 \pm 1,6$) e Anti-HLA-DR ($63,5 \pm 2,7$) (figuras 53 A, C, E, G e 54 A e C). Já as populações de células com as mesmas características, mas da sexta passagem (P6EP-sob), com os seguintes percentuais: Anti-CD24 ($16,3 \pm 1,3$), Anti-CD43 ($11,1 \pm 1,1$), Anti-CD90 ($11,6 \pm 1,1$), Anti-CD73 ($7,9 \pm 0,9$), Anti-MCP1 ($17,8 \pm 1,4$) e Anti-HLA-DR ($42,1 \pm 2,1$) (figuras 53 B, D, F, H e 54 B, D).

O primeiro grupo de células de embriões maduros analisadas com os marcadores para o sistema hematopoiético foi aquele aderente ao recipiente de cultura, na passagem zero (P0EM-ad), nas quais foram obtidos os seguintes resultados: Anti-CD24 ($2,1 \pm 0,5$), Anti-CD43 ($2,6 \pm 0,5$), Anti-CD90 ($4,1 \pm 0,7$), Anti-CD73 ($18,0 \pm 1,4$), Anti-MCP1 ($14,9 \pm 1,3$) e Anti-HLA-DR ($37,1 \pm 2,0$) (figuras 55 C, E, G e 56 A, C, E). Já as populações celulares na sexta passagem (P6PE-ad) expressaram com a seguir: Anti-CD24 ($10,3 \pm 1,1$), Anti-CD43 ($9,3 \pm 1,0$), Anti-CD90 ($4,6 \pm 0,7$), Anti-CD73 ($4,6 \pm 0,7$), Anti-MCP1 ($9,9 \pm 1,0$) e Anti-HLA-DR ($14,9 \pm 1,3$) (figuras 55 D, F, H e 56 B, D, F).

Nas células de embriões maduros, as células contidas nos sobrenadantes no meio de cultura na passagem zero (P0EM-sob) foram obtidos os percentuais: Anti-CD24 ($1,8 \pm 0,5$), Anti-CD43 ($6,9 \pm 0,9$), Anti-CD90 ($8,8 \pm 1,0$), Anti-CD73 ($2,2 \pm 0,5$), Anti-MCP1 ($14,8 \pm 1,3$) e Anti-HLA-DR ($47,4 \pm 2,3$) (figuras 57 A, C, E, G e 58 A e C). E nas populações de embriões maduros, do sobrenadante, da sexta passagem (P6EM-sob) obteve-se: Anti-CD24 ($7,0 \pm 0,9$), Anti-CD43 ($1,0 \pm 0,5$), Anti-CD90 ($11,4 \pm 1,1$), Anti-CD73 ($3,6 \pm 0,6$), Anti-MCP1 ($30,4 \pm 1,8$) e Anti-HLA-DR ($9,7 \pm 1,0$) (figuras 57 B, D, F, H e 58 B, D).

Figura 51. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar sistema hematopoiético: **A, C, E e G**, células aderentes de embriões precoce na passagem zero; **B, D, F e H** células aderentes de embriões precoce na sexta passagem

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9.

Figura 52. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de *Syrrhynchus molina* marcadas com anticorpos para determinar sistema hematopoiético: **A, C, e E**, células aderentes de embriões precoce na passagem zero; **B, D e F** células aderentes de embriões precoce na sexta passagem, **G** células do sobrenadante de embriões precoce na passagem zero e **H** células do sobrenadante de embriões precoce de sexta passagem

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9.

Figura 53. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de *Syrrhynchus molina* marcadas com anticorpos para determinar sistema hematopoiético: **A, C, E e G**, células do sobrenadante de embriões precoce na passagem zero; **B, D, F e H** células do sobrenadante de embriões precoce na sexta passagem

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9.

Figura 54. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões precoces de *Syrrhynchus molina* marcadas com anticorpos para determinar sistema hematopoiético: **A e C**, células do sobrenadante de embriões precoce na passagem zero; **B e D** células do sobrenadante de embriões precoce na sexta passagem

Fonte: CÂMARA, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9.

Figura 55. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar sistema hematopoiético: **A, C, E e G**, células aderentes de embriões precoce na passagem zero; **B, D, F e H** células aderentes de embriões precoce na sexta passagem

Fonte: Câmara, J.T. (2017)

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9

Figura 56. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar sistema hematopoiético: **A, C, e E**, células aderentes de embriões precoce na passagem zero; **B, D e F** células aderentes de embriões precoce na sexta passagem, **G** células do sobrenadante de embriões precoce na passagem zero e **H** células do sobrenadante de embriões precoce de sexta passagem

Fonte: Câmara, J.T. (2017)

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi
2.9

Figura 57. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar sistema hematopoiético: **A, C, E e G**, células do sobrenadante de embriões precoce na passagem zero; **B, D, F e H** células do sobrenadante de embriões precoce na sexta passagem

Fonte: Câmara, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9

Figura 58. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, de células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar sistema hematopoietico: **A e C**, células do sobrenadante de embriões precoce na passagem zero; **B e D** células do sobrenadante de embriões precoce na sexta passagem

Fonte: Câmara, J.T. (2017).

Legenda: Histograma representativo obtido a partir da análise realizada no programa WinMdi 2.9

Figura 59. Comparação de expressão diferencial em células de embriões precoces de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar sistema hematopoiético

Fonte: Câmara, J.T. (2017).

Figura 60. Comparação de expressão diferencial em células de embriões maduros de *Syssphinx molina* marcadas com anticorpos para determinar sistema hematopoiético

Fonte: Câmara, J.T. (2017).

Os anticorpos do grupo do sistema hamatopoiético que foram mais expressados nas células cultivadas foram Anti-HLA-DR e Anti-MCP-1. Anti-HLA-DR obteve as maiores taxas em todas as amostras (variação de 33,3% a 63,5% das células de embriões precoces e, entre 9,7% e 47,4% das células de embriões maduros), com exceção de P6EM(sob), na qual o mais expressado foi o Anti-MCP-1 (figuras 59 e 60).

HLA-DR um complexo proteico da superfície de células do sistema imunológico que é produzido quando ocorre a estimulação imunitária. A função primária do HLA-DR é apresentar antígenos peptídicos, potencialmente estranhos na origem, ao sistema imunitário com o objetivo de desencadear a resposta imune (KLITZ et al. 2003).

Anti-MCP1 foi expresso, em média, entre 16,% e 24,1% das células cultivadas de embriões precoces e, entre 9,9% e 30,1% das células cultivadas de embriões maduros. As amostras em que este marcador foi expresso de forma diferencial em maior percentual de células foram P0EP(sob) e P6EM(sob). MCP-1 uma citocina pequena que pertence à família de quimiocinas CC, também chamada de CCL2. A função dessa proteína é recrutar células do sistema imunológico para os locais de inflamação produzidos por lesão tecidual ou infecção (CARR et al., 1994, XU et al., 1996).

A os demais anticorpos para células do sistema hematopoiético marcaram menos de 15% na maioria das amostras de células analisadas e, algumas vezes não se obteve marcação diferencial para alguns anticorpos. Por exemplo, na P6EM(ad) a taxa obtida para o grupo controle (sem marcador) é maior ou igual as taxas obtidas para os anticorpos CD24, CD43, CD73, CD90 e MCP-1, ou seja, nessa amostra o resultados para estes marcadores foi negativo. No entanto, nas P0EP(ad) o Anti-CD90 superou 20% das células marcadas e na P0Ep(sob) o Anti-CD73 ficou próximo de 30% da marcação (figuras 59 e 60).

6 DISCUSSÕES

6.1 ANÁLISE DO OVO DE *SYSSPHINX MOLINA* (CRAMER) E COMPARAÇÃO COM OVOS DE OUTRAS ESPÉCIES

A coloração verde, não é exclusiva de espécies de Ceratocampinae, algumas espécies de Arsenurinae e Hemileucinae possuem ovos com essa coloração quando são prematuros ou recém-postos (FURTADO, 2001, LORINI; CORSEUIL, 2001). No entanto, em Hemileucinae a micrópila forma um ponto negro no pólo micrópila, visível a olho nu (LORINI; CORSEUIL, 2001).

Analisando a olho nu, os ovos descritos neste estudo possuem aparência uniformemente lisa e brilhante, semelhante ao descrito para ovos de *Copiopteryx semiramis* (Cramer, 1775) (Arsenurinae) (FURTADO, 2001).

Em análise com esteromicroscópio o córion dos ovos mostra-se translúcidos, ficando evidente que a coloração vista a olho nu não se trata da coloração do córion, são reflexos das fases de desenvolvimentos do embrião: quanto no início do desenvolvimento, com muito vitelo, os ovos são verdes (cor do vitelo); quando o embrião se desenvolve e ganhar formas, os ovos exibem coloração marrom, do exoesqueleto do embrião.

Outra característica possível de observar no estereomicroscópio é a presença de bandas germinativas a partir de 48h nos ovos de *S. molina* e *A. cathoxantha*. A posição e forma dessa estrutura podem variar substancialmente nos oócitos dos vários grupos de insetos. A posição e forma podem está relacionada com a forma do ovo e tempo de desenvolvimento do embrião. Em estudo com oócitos de três gêneros de Blatária, registrou a banda germinativa do ovo de *Blattella* localizado no meio do comprimento do oócito enquanto que as de *Periplaneta* e *Zootermopsis* ficavam na extremidade posterior dos seus respectivos oócitos alongados (KUNKEL, 1991). As ilustrações das bandas marginais das espécies *S. molina* e *A. cathoxantha* possivelmente registram esta estrutura em fase tardia de desenvolvimento.

A análise ultraestrutural de ovos da subfamília Ceratocampinae mostrou diferenças entre os gêneros estudados. Sabe-se que a camada de células do folículo do ovário dos insetos participa de provisionamento do ovócito e, eventualmente, segrega um córion, camada protetora. O córion é produzido antes da ovulação e fertilização e, portanto, deve possibilitar a

entrada do espermatozoide, este ponto estereotipado é a micrópila e, é predeterminada como ponto fraco, pois além de permitir a entrada do material genético doado pelo macho é usado na eclosão da larva (Margaritas, 1985). A diferenciação de células foliculares em vários tipos diferentes de células reflete a diversidade de estruturas e esculturas que decoram o córion dos ovos dos insetos (KUNKEL, 1991).

Novos estudos poderiam esclarecer se entre espécies do mesmo gênero tais diferenças também ocorrem. Pode-se inferir que a diversidade das características dos ovos deve aumentar entre subfamílias distintas. A microscopia eletrônica de varredura revelou-se uma excelente ferramenta para a caracterização precisa da superfície dos ovos de insetos, possibilitando a distinção entre as espécies estudadas.

As características, ou conjunto delas, de maior relevância taxonômica são: a presença de células na região central da face achatada; a altura da célula em relação à carena (em depressão ou proeminente) e as dimensões do ovo.

Os ovos de *O. hodeva* e *S. molina* são muito próximos em aparência, diferindo quanto ao tamanho e forma, sendo os de *S. molina* menores e menos ovais quando comparados ao de *O. hodeva*. Os ovos de *A. catoxantha* diferenciam-se daqueles das duas espécies anteriores em razão do tamanho e distribuição das células na superfície do córion. Os ovos de *E. imperialis* diferem marcadamente dos demais quanto ao padrão das células, proeminentes (“infladas”) em relação a carena. As características particulares dos ovos de *E. imperialis*, possivelmente, estejam relacionadas à filogenia de Ceratocampinae, indicando a necessidade de estudos adicionais da morfologia e a ultraestrutura de ovos outras espécies de Saturniidae.

A micrópila, ao contrário do observado em Satyrinae (SULUDERE, 1988), não mostrou padrão específico no número ou disposição geométrica das placas, não se constituindo, portanto, em caráter diagnóstico para as espécies estudadas. Inclusive, comparando com ovos de *Prepona laertes laertes* (Hübner, 1811) (Nymphalidae), as disposições das placas são muito semelhantes (DIAS; CASAGRANDE; MIELKE, 2011).

Em algumas ilustrações (principalmente nas figuras 2A e 2H) observa-se manchas ou resíduos sobre o córion, resultado da secreção de

“spumaline”, uma substância adesiva que forma sua última camada (HINTON, 1981). Essa “cola”, secretada pelas glândulas abdominais específicas associadas ao aparelho reprodutor feminino (BETZ, 2010), é responsável pela disposição dos ovos em cluster e por sua adesão ao substrato. Escamas que se desprendem do abdome da fêmea durante a ovipostura podem ficar aderidas ao córion, formando uma camada protetora sobre os ovos, dificultando a análise de sua superfície. As estruturas descritas e ilustradas neste estudo só foram possíveis com a retirada desta camada adesiva. Este processo ocorreu durante a preparação do material, conforme descrição citada nos procedimentos metodológicos.

De acordo com o desvio padrão obtido a partir das mensurações dos ovos das quatro espécies estudadas é possível verificar que existem pequenas variações tanto no comprimento quanto na largura, das amostras avaliadas. A pequena variação entre os valores máximos e mínimos das variáveis comprimento e largura bem como os valores dos intervalos de confiança (tabela 1) reforçam a constatação.

5.2 PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DE CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DE TECIDO EMBRIONÁRIO DE *SYSSPHINX MOLINA* (CRAMER)

O desenvolvimento de novas linhagens de células de insetos necessitada adaptação dos protocolos existentes, adequando assim um protocolo distinto para cada espécie, tecido/órgão ou ainda material utilizado (LYNN, 2001).

Em estudos relatando cultura de célula de insetos utilizando tecidos de estágios larva, pupa e adulto, a proliferação e expansão das células cultivadas demoram alguns meses (SOHI, 1995, LYNN, 2001, LI et al., 2012). Já em fase embrionária, este tempo é reduzido para semanas (XU et al., 2015).

Aljabr et al. (2013) cultivaram células epiteliais de intestino intermédio de *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Curculionidae, Coleoptera) e compararam eficiência da cultura com diferentes meios de cultura comerciais, diferentes condições de temperatura e PH. Os meios de cultura utilizados foram Grace, TNMFHmedium, Schneider e Media-199; a

temperatura variou de 21° a 27°C e o pH testados foram 6,3, 6,4, 5,3 e 7,1. A cultura utilizando meio de cultura Grace foi mais eficiente quanto a densidade e a viabilidade celular, após 72h de cultivo.

Nesse estudo, com um meio de cultura DMEN-High, não convencional para cultivo de células de insetos, se obteve o menor tempo de crescimento, e modificação da estrutura celular e expansão da cultura de célula, obtendo este resultado em três, seis e sete dias, respectivamente.

6.3 CICLO CELULAR PÓS-CONGELAMENTO

O ciclo de célula eucariótica consiste de muitos pontos de controle durante a qual certas condições devem ser cumpridas antes de passar para as fases subsequentes. Estas regulações garantem a integridade e sobrevivência das células, mas também pode limitar o crescimento e a síntese de proteínas em durante o ciclo celular (WU et al., 2013).

No atual estudo a proporção de células na fase G0/G1 foi elevada na maioria das passagens, nas culturas de células das duas idades embrionárias. Em compensação as taxas de células nas fases S e G2/M são sistematicamente baixas em comparação com G0/G1. No entanto, a cada passagem (em intervalos de 24 horas) as garrafas de culturas estavam cheias de células e, além das retiradas de amostras para estudo em citometria, também se processavam as passagens, na proporção 1:2.

As culturas de células isentas de soro fetal bovino, da mariposa *Spodoptera frugiperda* (Sf9) acumularam de 50-70% das células na fase G2/M nas primeiras 24 h de cultura; após a parada do ciclo celular, as populações de células se redistribuíram em G1 e, em particular para a fase S. Entre 24 e 48 horas foram observadas as menores taxas de células em G2/M, após este intervalo o percentual de células nesta fase apresentou lento aumento (DOVERSKOG et al., 2000).

Aparentemente os altos valores de G0/G1 obtidos sistematicamente neste estudo, não são decorrentes de parada do ciclo celular, mas sim de aceleração do ciclo em relação ao resultado obtido no exemplo citado com populações de células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9). Possivelmente esta aceleração seja explicada pela presença de soro fetal bovino (SFB) no meio de

cultivo, pois no exemplo com a outra mariposa, a parada do ciclo ocorreu por ocasião da ausência do SFB no meio de cultura.

Na fase G1, recursos celulares são utilizados de forma mais eficiente para a síntese de proteínas de interesse sem desviar energia para produzir componentes celulares de proliferação (SUNLEY; BUTLER, 2010, WATANABLE et al., 2003). Então as células presas na fase G1 (síntese de proteína) possuem intensa biogénese ribossomal e atividade de tradução de proteína mais elevada que qualquer outra fase do ciclo celular, resultando em rendimentos mais elevados de proteínas recombinantes (ELLEGE, 1996).

O rápido metabolismo do SFB pelas células, possivelmente esgotou este nutriente no meio de cultura, no entanto, foi suficiente para a sincronização do ciclo completo em menos de 24 horas. A provável carência de SFB nas culturas elucida o fato destas apresentarem crescimento, mas mostrarem-se com maior quantidade de células estacionadas na fase G0/G1 a cada 24 horas. Esta hipótese além de esclarecer sobre o crescimento das populações, também explica as relativas elevadas taxas de células mortas ou DNA fragmentado. Com o aumento das populações, os recursos nutricionais tornavam-se limitados promovendo a morte de significativa fração da cultura.

6.4 ANÁLISE COM MARCADORES ESPECÍFICOS

Quanto à análise das células tratadas com marcadores, muitas informações são pertinentes para comparação com estudos anteriores. Ressaltamos aqui os principais aspectos: a expressão para o anticorpo Schneider L2, a expressão para o Anti-HSP47 que determina o amadurecimento de colágeno e a expressão de todos os marcadores (usados para células de humanos) do sistema hematopoiético.

Anticorpo Schneider L2 é eficiente para marcar o fator GAGA. Este fator foi identificado pela primeira vez como uma sequência de proteína que se liga ao DNA de *Drosophila melanogaster* e em relatos anteriores, em células cultivadas exclusivamente com meio de cultura Schneider L2 (BHAT et al 1996). O fator GAGA estimular a atividade de transcrição dos genes PT, Ultrabithorax (Ubx) (SOELLER; OH, KORNBERG, 1993; BIGGIN; TJIAN, 1988), Fushi Taraz (FTZ) (TOPOL et al. 1991), a HSP26 (GLASER et al, 1990;

LU et al, 1993), HSP70 (LEE et al., 1992) e os promotores das histonas H3 e H4 (GILMOUR; THOMAS; ELGIN, 1989).

Mesmo em embriões de *Drosophila*, os níveis de células de marcadas com o anticorpo Schneider L2 varia conforme a topografia e idade embrionária (BHAT et al 1996).

Os constituintes da matriz extracelular dos insetos são basicamente os mesmos encontrados nos vertebrados. A matriz amorfa é constituída basicamente de proteoglicado e glicosaminoglicano, e em pequena quantidade das glicoroteínas fibronectina e laminina. A matriz fibrosa é constituída de colágeno, o qual se apresenta sob forma de fibras espessas com bandamento distinto ou fibrilas muito delicadas sem bandamento visível (BACCETTI, 1961; LOCKE; HUIE, 1972). O colágeno dos insetos é caracterizado como do tipo I (LANDIM, 2009). Estudos realizados por Ashhurst; Costin (1976) demonstraram que a produção de colágeno nos insetos ocorre nas células da bainha neural e no intestino médio.

De acordo com os resultados encontrados nesse estudo as células embrionárias, nas condições de cultivo apresentadas, são eficientes em produzir colágeno, sendo que na maioria das amostradas analisadas houve expressão diferencial de Anti-HSP-47.

Semelhante os demais anticorpos utilizados nesse estudo, todos os marcadores do sistema hematopoiético marcaram de forma diferencial suas respectivas proteínas (expressão positiva), em pelo menos uma das amostras analisadas, ou seja, as proteínas do sistema hematopoiético comumente encontradas em vertebrados (inclusive em humano) são encontradas em células embrionárias de *Syssphinx molina*.

Os insetos não possuem o sistema imunológico sofisticado dos vertebrados, mas, eles são particularmente resistentes aos seus inimigos naturais. No entanto, semelhante aos vertebrados, o sistema imune dos insetos é composto por barreiras estruturais “passivas” e por respostas ativas, contra elementos estranhos que alcançam a sua hemocèle (RATCLIFFE et al., 1985).

Alguns pesquisadores discordam do termo imunidade para os insetos pelas seguintes razões: o sistema imunológico dos insetos não é

específico; a reação que ele desencadeia para uma bactéria é a mesma para um fungo, para um parasita ou um parasitóide; não possui memória, isto é, ele não possui memória imunológica; não produz linfócitos e nem sintetiza imunoglobulinas (anticorpos) que são células e proteínas especializadas da imunidade adquirida ou específica dos vertebrados (GALVEZ; CHAPUISAT, 2014).

Sabe-se que em seres humanos alguns linfócitos B e T se transformam em células de memória, as quais permanecem na circulação garantindo uma resposta rápida e eficaz contra uma futura exposição àquele antígeno (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003). E nos insetos não há linfócitos, como já discutido acima. No entanto, nos resultados obtidos nesse trabalho, os marcadores Anti-CD43 e Anti-CD24, que marcam respectivamente linfócitos T e B em humanos, foram encontrados de forma diferencial em pelo menos uma amostra de células cultivadas de *S. molina*.

Compreendem-se como barreiras estruturais o rígido exoesqueleto, o sistema digestório e as barreiras respiratórias, que constituem a primeira linha de defesa dos insetos (DUNN, 1986; BULET et al., 1999).

Os hemócitos constituem a barreira final do sistema de defesa dos insetos e atuam na coagulação e na cicatrização, na fagocitose, em respostas do tipo encapsulação e nodulação, fatores antimicrobianos naturais como síntese induzida de peptídeos e proteínas antimicrobianas (TANADA; KAYA, 1993; LAVINE; STRAND, 2002) e, ainda fatores bioquímico-fisiológicos, que são respostas coordenadas direta ou indiretamente pelos vários tipos de hemócitos (RATCLIFFE; ROWLEY, 1987; GUPTA, 1985), dependente do número e dos tipos de hemócitos presentes na hemolinfa, garantindo o sucesso do sistema imunológico (RUSSO; BREHÉLIN; CARTON, 2001).

Gupta (1985) em ampla revisão da literatura, uniformizou a nomenclatura dessas células e classificou os principais tipos presentes em várias ordens de insetos: prohemócito (PR), plasmatócito (PL), granulócito (GR) e oenocitóide (OE). Tipos adicionais também foram descritas: coagulócito (CO), adipohemócito (AD), esferulócito (ES), podócito (PO) e vermiforme (VE). A hemolinfa de lepidópteros, de modo geral, apresenta os tipos clássicos de hemócitos: PL, GR, OE, ES, PR (RICHARDS; EDWARDS, 1999), bem como

pode apresentar as células vermiformes (FALLEIROS; BOMBONATO; GREGÓRIO, 2003).

Os hemócitos PR são considerados por diversos autores como células estaminais, ou seja, células que originam outros tipos celulares. Exibem alto índice mitótico, e no período pós-embrionário dos hemócitos, sua quantificação não passa de 5% do total de células (GUPTA, 1985). Estudos sobre estágios de diferenciação dos hemócitos em vários insetos, realizados por Gupta (1985) permitiram a elaboração de um esquema no qual os PR são as células estaminais que originam os PL e estes os GR. Os GR são células pluripotentes e dão origem aos AD, VE e ES, que pode ser expresso no seguinte esquema principal: PR → PL → GR → ES, já que AD e VE não são encontrados na maioria das espécies. Falleiros, Bombonato e Gregório (2003) constataram ultraestruturalmente em lagartas da broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794), PL e GR em estágios de divisão mitótica, além disso, observaram hemócitos com aspectos intermediários entre PR-PL e PL-GR, sugerindo assim que essas células multiplicam-se e diferenciam-se na hemolinfa, durante o desenvolvimento larval. Em culturas de PR de *Bombyx mori* (Linnaeus, 1758), o bicho da seda, Yamashita e Iwabuchi (2001) mostraram que aproximadamente 43% dessas células, diferenciam-se em PL, GR e ES, confirmando assim sua pluripotencialidade. Células tronco ou progenitoras hematopoiéticas foram encontradas em todas as amostras analisadas, através da marcação com o Anti-CD117 (figuras 29 e 30).

A caracterização e a purificação de peptídios antimicrobianos produzidos em resposta a infecções causadas por bactéria ou fungos em várias espécies de insetos, como as lagartas *Manduca sexta* e *Galleria mellonella* e o mosquito *Aedes aegypti*, juntamente com as informações genéticas sobre a mosca-dasfrutas, *Drosophila melanogaster*, têm proporcionado novos discernimentos sobre a organização e a regulação do sistema imunológico dos insetos (NEGREIRO; ANDRADE; FALLEIROS, 2004). Sabe-se hoje que os insetos possuem um sistema de reconhecimento de patógenos capaz de ativar um complexo de moléculas sinalizadoras e de coordenar a expressão de vários genes (FRANC;WHITE, 2000). Além disso, o conhecimento das respostas imunológicas que estão presentes na hemolinfa e na cutícula dos insetos pode

fornecer informações valiosas para o delineamento de novas formas de controle biológico (SILVA, 2004).

A *Drosophila* desenvolveu mecanismos reguladores sofisticados para tolerar as bactérias comensais e mutualistas no intestino, enquanto permite respostas imunitárias eficazes para patógenos específicos (BUCHON; SILVERMAN; CHERRY, 2014). Assim, a microbiota intestinal da mucosa do hospedeiro e o sistema imunológico precisam ser visto como uma unidade ecológica de componentes interagentes e interligados, em que o microbiota molda o sistema imunológico e o sistema imune influencia a composição microbiana (DALE; MORAN, 2006).

Enfim, o interesse pelo sistema imunológico (Silva, 2002), assim como pelo entendimento do sucesso adaptativo dos insetos, tem aumentado nos últimos anos e as informações adicionais reveladas nesse estudo, indicam que as atividades metabólicas dos insetos são complexas tanto quanto aquelas que conhecemos nos vertebrados superiores.

7 CONCLUSÕES

De acordo com condições experimentais já executadas, pode-se concluir:

- A microscopia eletrônica de varredura é importante para revelar detalhes da morfologia dos ovos de *Syssphinx molina* (Cramer, 1780) a ponto de permitir a identificação das espécies, quando comparados a ovos das espécies com estreita relação filogenética: *Adeloneivaia catoxantha* (Rothschild, 1907), *Eacles imperialis cacicus* (Boisduval, 1868) e *Othorene hodeva* (Druce, 1904).
- A refrigeração de ovos das mariposas estudadas, em temperatura média de 8° C, por até oito dias consecutivos, seguramente, conserva células embrionárias viáveis para o cultivo celular.
- A metodologia utilizada no cultivo de células embrionárias de *S. molina* se mostrou eficiente, tanto par culturas primárias (pré congelamento) como para culturas secundárias (pós congelamento).
- A citometria de fluxo com a utilização do iodeto de propídio (PI) demonstrou ser eficiente na separação das fases do ciclo celular de células embrionárias de *S. molina*.
- A atividade celular intensa e a proliferação observada empiricamente durante o cultivo foi confirmadas através da análise do ciclo celular e da expressão diferencial dos marcadores Anti-GM-130, Anti-RAB5, Anti-Ki-67 e Ciclina-D1, verificadas em citometria de fluxo.
- O fator GAGA, antes marcado apenas em *Drosophila* e em células cultivadas com meio de cultura Schanerder L2, também é expresso em *S. molina*, em células cultivadas com meio de cultua DMEN-Hith.
- Células embrionárias de *S. molina* produzem colágeno.
- Todos os 23 marcadores utilizados nesse estudo foram positivos, pelo menos, em uma amostra de células embrionárias de *S. molina*, no entanto a expressão dos marcadores variou com a idade embrionária e com o tempo de cultivo celular.
- Os insetos são organismos geneticamente complexos e com grande resistência aos seus inimigos naturais. Essa investigação e a caracterização de marcadores ativos em suas células embrionárias constitui uma introdução que

possibilitará compreender como alguns processos metabólicos ocorrem e o aprofundamento desses conhecimentos tem futuro biotecnológico promissor, principalmente nas áreas da saúde e controle de pragas.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A.P.; DOS SANTOS, B.F.; COURI, M.S.; RAFAEL, J.A.; COSTA, C.; IDE, S.; GRAZIA, J.; DUARTE, M.; SCHWERTNER, C.F.; FREITAS, A.V.L.; AZEVEDO, C.O. *Insecta*. Capítulo 8. In: Estado da Arte e Perspectivas para a Zoologia no Brasil. ROCHA, R. M.; W. A. P. BOEGER (Eds.). Resultados dos Simpósios do XXVII Congresso Brasileiro de Zoologia. Editora UFPR. Curitiba. pp. 131- 155. 2009.
- ALJABR, A. M.; RIZWAN-UL-HAQ, M.; HUSSAIN, A.; AL-MUBARAK, A. I.; AL-AIYED, H. Y. *Establishing midgut cell culture from Rhynchophorus ferrugineus (Olivier) and toxicity assessment against ten different insecticides*. In: Vitro Cell.Dev.Biol.—Animal, (online). 2013.
- AROCHA-PINANGO, C.L.; LAYRISSE M. *Fibrinolysis produced by contact with a caterpillar*. Lancet: 3-7p. 1969.
- ASHHURST, D.E.; COSTIN, N.M. The secretion of collagen by insets: uptake of 5H-proline by collagen-synthesizing cells in Locusta migratória and Galleria mellonella. *J. Cell Sci.*, 20:377-403. 1976.
- BACCETI, B. Primi reperti sulla struttura submicroscopica dello stroma di sostegno de alcuni organi degli insetti. *Atti Accademia dele Scienze Torino*, 95: 343-350. 1961.
- BALDIN, V.; LUKAS, J.; MARCOTE, M.J.; PAGANO, M.; DRAETTA, G. *Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle*. May. 1993.
- BATISTA, T.F.V.; LUNZ, A.M.; ROSÁRIO, V.S.V.; LEMOS, L.J.U.; PROVENZANO, R.S.; MONTEIRO, E.S. Biological and morphometric aspects and rearing of *Syssphinx molina* (Cramer) (Lepidoptera: Saturniidae), a defoliator of parica tree. *Acta Amazônica*, 43(2): 191 – 196. 2013.
- BETZ, O. Adhesive exocrine glands in insects: morphology, ultrastructure, and adhesive secretion. In: Byern J, Grunwald I (eds) Biological adhesive systems from nature to technical and medical application. *Springer, Wien*, pp 111–152. 2010.
- BHAT, K.M.; FARKAS, G.; KARCH, F.; GYURKOVICS, H.; GAUSZ, J.; SCHEDL, P. The GAGA factor is required in the early Drosophila embryo not only for transcriptional regulation but also for nuclear division. *Development*, 122(4):1113-24. 1996.
- BIGGIN, M.D.; TJIAN, R. Transcription factors that activate the Ubx promoter in developmentally staged extracts. *Cell*, 53:699-711. 1988.
- BITTENCOURT, M.A. et al. Fauna de Lepidoptera associada a um ecossistema natural no estado de São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo*, v.70, n.1, p.85-87, 2003.
- BLANK, U.; KARLSSON, G.; KARLSSON, S. Signaling pathways governing stem cell fate. *Blood*, 15:492–503. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Doenças Infecciosas e Parasitárias*. 7ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 180p. 2008.

BROWN, Jr., K.S.; FREITAS, A.V.L. *Lepidoptera*. pp. 225-243. In: JOLY, C. A.; BICUDO, C. E. M. (orgs.). Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX, Brandão C. R. F. & E. M. Cancellato (Eds.) 5 – Invertebrados terrestres. FAPESP. São Paulo. 279p. 1999.

BUCHON, N.; SILVERMAN, N.; CHERRY, S. Immunity in *Drosophila melanogaster*—from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nat Rev Immunol*, 14:796 – 810. 2014.

BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J.; HOFFMANN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental and Comparative Immunology*. New York, v.23. p.329-344, 1999.

BULLWINKEL, J.; BARON-LÜHR, B.; LÜDEMANN, A.; WOHLBERG, C.; GERDES, J.; SCHOLZEN, T. "Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells". *J. Cell. Physiol*, 206 (3): 624–35. March. 2006.

CÂMARA, J.T.; SOUZA, J.S.; SILVA, J.C.; OLIVEIRA, F.L. Taxocenose de Saturniidae (Insecta. Lepidoptera) da Reserva Ecológica do Inhamum, Município de Caxias-MA. *Ciência e Saberes Série Científica*, 1 (1): 67-74. 2011.

CAMARGO, A.J.A. *Análise cladística da subfamília Arsenurinae Jordan, 1992 (Saturniidae, Lepidoptera) e morfologia de Almeidaia aidae Mielke & Casagrande, 1981 (Almeidaiini)*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 248p, 2005.

CAMARGO, A.J.A.; BECKER, V.O. Saturniidae (Lepidoptera) from Brazilian Cerrado: composition and biogeographic relationships. *Biotropica*, 31 (4): 696-705. 1999.

CAMARGO, A.J.A.; SCHMIDT, K. *Efeitos da fragmentação sobre a diversidade de saturniidae (lepidoptera) em isolados naturais e antrópicos de cerrado*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 239. 30p. 2009.

CARR, M.W.; ROTH, S.J.; LUTHER, E.; ROSE, S.S.; SPRINGER, T.A. *Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte hemoattractant. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91(9): 3652–6. Apr.1994.

COSTA-LIMA, A. *Insetos do Brasil: Lepidópteros*. 2ª parte. Rio de Janeiro: Dep. Imprensa Nacional. Escola Nacional de Agronomia, Série Didática 420p, nº 8, 1950.

DAFFORN, T.R.; DELLA, M.; MILLER, A.D. The molecular interactions of heat shock protein 47 (Hsp47) and their implications for collagen biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 276 (52):49310–9. 2001.

DALE, C.; MORAN, N.A. Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts. *Cell*, 126:453–465. 2006.

DIAS, F.M.S.; CASAGRANDE, M.M.; MIELKE, O.H.H. External morphology and ultra-structure of eggs and first instar of *Prepona laertes laertes* (Hübner, [1811]), with notes on host plant use and taxonomy. *Journal of Insect Science* 11:1-10. 2011.

DINIZ, I.R.; MORAIS, H.C. Larvas de Lepidoptera e suas plantas hospedeiras, Brasília, DF, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 39: 775-770. 1995.

DOVERSKOG, M.; BERTRAM, E.; LJUNGGREN, J.; OHMAN, L.; Sennerstam, R.; HAGGSTROM, L.. Cycle Progression in Serum-Free Cultures of Sf9 Insect CELLS: Modulation by Conditioned Medium Factors and Implications for Proliferation and Productivity. *Biotechnol. Prog.*, 16: 837–846. 2000.

DUARTE, A. C.; COVILLA, J.; LORIN, D.; MANTOVANI, G.; SUMIDA, J.; MANFRE, P. C.; SILVEIRA, R. C.; MOURA, S. Insuficiência renal aguda por acidente com lagartas. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 12p, 184-187. 1990.

DUNN, P. E. Biochemical aspects of insect immunity. *Annual Review of Entomology, Stanford*, v.31, p.321-339, 1986.

EDLING, C.E.; HALLBERG, B. c-Kit--a hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase. *Int. J. Biochem. Cell Biol*, 39 (11): 1995-8. 2007.

ELLEDGE, S.J. Cell Cycle Checkpoints: Preventing an Identity Crisis. *Science*, 274:1664-1672. 1996.

ELLIS, R.J. "Molecular chaperones: assisting assembly in addition to folding". *Trends in Biochemical. Science*. 31 (7): 395–401. July. 2006.

FALLEIROS, A.M.F.; BOMBONATO, M.T.S.; GREGÓRIO, E.A.. Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Pyralidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v.46, n.2, p.287-294, 2003.

FERGUSON, D.C. *Bombyciodea, Saturniidae*. The Moths of North America. Londres 2 200: 153p. 1971.

FRAIHA-NETO, H.I.; BALLARINI, A.J.; LEÃO, R.N.Q.; COSTA-JÚNIOR, D.; DIAS, L.B. Síndrome hemorrágica por contato com larvas de mariposa (Lepidoptera, Saturniidae). *Man. Inst. Evandro Chagas, Fund. Serv. S. Pública*, 2: 811-820. 1986.

FRANC, N.C.; WHITE, K. Innate recognition in insect immunity and development: new approaches in *Drosophila*. Special issue: Innate recognition systems in host defence. *Microbes and Infection*, Paris, v.2, n.30, p.243-250, 2000.

FREITAS, A.V.L.; LEAL, I.R.; UEHARA-PRADO, M.; IANNUZZI, L. *Insetos como indicadores de conservação da paisagem*. Capítulo 15. In: ROCHA, C. F.

D., H. G. BERGALLO , M. VAN SLUYS & M. A. S. Alves (Eds.) *Biologia da conservação: essências*. RiMa Editora. São Carlos. p 357-384. 2006.

FREITAS, A.V.L. et al. *Plano de ação nacional para a conservação dos Lepidópteros*. In: FREITAS AVL and MARINI-FILHO O (Org), *Plano de ação nacional para a conservação dos lepidópteros ameaçados de extinção*. Brasília: ICMBio, p. 1-124. 2011.

FURTADO, E. *Copiopteryx semiramis* (Cramer): notas suplementares à sua biologia (Lepidoptera, Saturniidae, Arsenurinae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 18: 637-640. 2001.

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

GALVEZ, D.; CHAPUISAT, M. Immune priming and pathogen resistance in ant queen. *Ecology and Evolution*, 4(10):1761-1767. 2014.

GEORGE, L.; MIKLOS, G.; GERALD, M. The Role of the Genome Project Review in Determining Gene Function: Insights from Model Organisms. *Current Biology*, 11:171–176. 1996.

GILMOUR, D. S.; THOMAS, G.H.; ELGIN, S.C.R. Drosophila nuclear proteins bind to regions of alternating C and T residues in gene promoters. *Science*, 245, 1487-1490. 1989.

GLASER, R.L.; THOMAS, G.; SIEGFRIED, E.S.; ELGIN, S.C.R.; LIS, J. Optimal heat-induced expression of the Drosophila hsp26 gene requires a promoter sequence containing (CT)_n (GA)_n repeats. *J. Mol. Biol.*, 211:751- 761. 1990.

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

GRIMALDI, D.; ENGEL, M.S. *Evolution of the insects*. Cambridge University Press. Cambridge. 2005.

GRIMMELIKHUIJZEN, J.P. The promise of insect genomics. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 1–10. 2007.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 53(3): 335-343. 2007.

GULLAN, P.J.; CRANSTON, P.S. *The Insects: on outline of entomology*. Chapman & Hall: London. 4910. 1994.

GUPTA, A.P. *Cellular elements in the hemolymph*. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Ed.) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. v.3. Oxford: Pergamon Press, p.401-451. 1985.

- HINTON, H.E. *Biology of insect eggs*. vol I–III. Pergamon Press, Oxford. 1981.
- HOFFMANN, J.R.H.; LINKE, K.; GRAF, P. C.; LILIE, H.; JAKOB, U. Identification of a redox-regulated chaperone network. *The EMBO Journal*. 23 (1): 160–168. 2003.
- HUOTARI, J.; HELENIU, A. Endosome maturation. *The EMBO Journal*,. 30(17): 3481–500. Aug. 2011.
- JANZEN, D. H. Guia para la identificacion de mariposas nocturnas de la familia Saturniidae del Parque Nacional Santa Rosa, Guanacaste, Costa Rica. *Brenesia*, 19:255-299, 1982.
- KITCHING, I.J.; CADIOU, J.M. *Hawkmoths of the World: an annotated and illustrated revisionary checklist (Lepidoptera: Sphingidae)*. Cornell University Press, Ithaca. 2000. 227p.
- KLITZ, W.; MAIERS, M.; SPELLMAN, S.; BAXTER-LOWE, L.A.; SCHMECKPEPER, B.; WILLIAMS, T.M.; FERNANDEZ-VINA, M. New HLA haplotype frequency reference standards: high-resolution and large sample typing of HLA DR-DQ haplotypes in a sample of European Americans. *Tissue Antigens*, 62 (4): 296–307. 2003.
- KUNKEL, J.G. *Models of Pattern Formation in Insect Oocytes*. In: Vivo, 5: 443-456. 1991.
- LANDIM, C.C. *Abelhas: morfologia e função de sistemas*. Editora UNESP, São Paulo. 408p. 2009.
- LAVINE, M.D.; STRAND, M.R.. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Oxford, v.32, p.1295-1309, 2002.
- LAZARIDES, E. Intermediate filaments: A chemically heterogeneous developmentally regulated class of protein. *Annu Rev Biochem*, 51:219-50. 1982.
- LEE, J.; KRAUS, W.; WOLFNER, M. F.; LIS, J. DNA sequence requirements for generating paused polymerase at the start of hsp70. *Genes Dev.*, 6, 284-295. 1992.
- LEMAIRE, C. *The Attacidae of America: Hemileucinae [s.1]: Goecke & Evers, Keltern*. 668p. 2002
- LEMAIRE, C. *The Saturniidae of America. Les Saturniidae Americains*. Los Saturniidos Americanos. Museu Nacional de Costa Rica. 616p. 1988
- LEMAIRE, C.; MINET, J.. *The Bombycoidea and their relatives*. p.321-353. In: KRISTENSEN, N. P. (Ed.). *Lepidoptera: Moths and Butterflies*. Vol 1: Evolution, Systematics, and Biogeography. Teilband / Part 35. In: FISCHER, M. (Ed.). *Handbuch der Zoologie*. Band/ Volume IV Arthropoda: Insecta. Walter de Gruyter, Berlin & New York. X+491 pp, 1998.

LEMAIRE, C.; MINET, J. The Bombycoidea and their Relatives. *In*: Kristensen, NP (ed). *Lepidoptera, moths and butterflies*. *In*: handbook of Zoology. Arthropoda. *Insecta*. Walter de Gruyter, Berlin, New York, 321-343p.1998.

LEONG, K.G.; WANG, B.E.; JOHNSON, L.; GAO, W.Q. Generation of a prostate from a single adult stem cell. *Nature*, 456 (7223): 804–8. October. 2008.

LI, X.; QIN, Q.; ZHANG, N.; ZHU, W.;ZHANG, J.; WANG, H. MIAO, L.; ZHANG, H. A new insect cell line from pupal ovary of *Spodoptera exigua* established by stimulation with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG). *In*: *Vitro Cell Dev. Biol. – Animal*, 48: 271-275. 2012.

LOCKE, M.; HUIE, P. The fiber components of insect connective tissue. *Tissue Cell.*, 4(4):601-12. 1972.

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*, 53:186-198. 2003.

LORINI, L. M.; CORSEUIL, E. E. Aspectos Morfológicos de *Lonomia obliqua* Walker (*Lepidoptera*: Saturniidae). *Neotropical Entomology*, 30(3): 373-378. 2001

LU, Q.; WALLRATH, L.L.; GRANOK, H.; ELGIN, S.C.R. (CT)_n (GA)_n repeats and heat shock elements have distinct roles in chromatin structure and transcriptional activation of the *Drosophila* hsp26 gene. *Mol. Cell. Biol.*, 13:2802-2814. 1993.

LYNN, D.E. Development and characterization of insect cell lines. *Cytotechnol*, 20:3-11. 1989.

LYNN, D.E. Novel Techniques to Establish New Insect Cell Lines. *Society for In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal June*, 37:319-321. 2001.

MACHADO, G.F.; FIGUEIREDO, F. Revisão: filamentos intermediários. *Medicina*, Ribeirão Preto, 29:104-13. 1996.

MANSENGH, F.C.; WRIDE, M.A.; RANCOURT, D.E. Neurons from stem cells: implications for understanding nervous system development and repair. *Biochem Cell Biol*, 78:613–628. 2000

MASSAGUÉ, J. TGF β signalling in context. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(10): 616–30. October. 2012.

MAYER, M.P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.*, 62: 670–684. 2005.

MAYER, M.P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.*, 62: 670–684. 2005

MOREIRA, B. M. T.; TOMBA, E. C.; ZONETTI, P. C. Crescimento in vitro de plântulas de orquídea (*Laelia purpurata* Lindl var *venosa* X *Cattleya warneri* T. Moore alba) sob diferentes concentrações de sacarose e frutose. *Sábios – Revista Saúde e Biologia*, Campo Mourão, v. 2, n. 2, p. 16-21. 2007.

NAKAO, A.; AFRAKHTE, M.; MORÉN, A.; NAKAYAMA, T.; CHRISTIAN, J.L.; HEUCHEL, R.; ITOH, S.; KAWABATA, M.; HELDIN, N.E.; HELDIN, C.H.; TEN, D.P. "Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling". *Nature*, 389(6651): 631–5. October. 1997.

NEGREIRO, M.C.C.; ANDRADE, F.G.; FALLEIROS, A.M.F. Sistema imunológico de defesa em insetos: uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, 25(4): 293-308. 2004

NING, H.; LIN, G.; LUE, T.F.; LIN, C.S. Mesenchymal stem cell marker Stro-1 is a 75 kd endothelial antigen. *Biochem Biophys Res Commun*. Sep 23;413(2):353-7. 2011.

PAN, G.J.; CHANG, Z.Y.; SCHOLER, H.R.; PEI, D.Q. Stem cell pluripotency and transcription factor oct4. *Cell Res.*, 12, 321–329. 2002.

RAFAEL, J.A.; MELO G.A.R.; CARVALHO C.J.B.; CASARI, S.A.; CONSTANTINO R. (Eds.). *Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia*. Ribeirão Preto. Holos Editora, 810 p. 2012.

RAHMANZADEH, R.; HÜTTMANN, G.; GERDES, J.; SCHOLZEN, T. "Chromophore-assisted light inactivation of pKi-67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis". *Cell Prolif*, 40 (3): 422–30. June. 2007.

RATCLIFFE, N.A.; ROWLEY, A.F. *Insect responses to parasites and other pathogens*. In: JOULSBY, E. J. L. (Ed.). *Immune responses in parasitic infection: immunology, immunopathology and immunoprophylaxis, protozoa, arthropods and invertebrate*. Florida: C. R. C. Press, p.123-254. 1987.

REGIER, J.C.; GRANT, M.C.; MITTER, C.; COOK, C.P.; PEIGLER, R.S.; ROUGERIE, R. Phylogenetic relationships of wild silkmoths (Lepidoptera: Saturniidae) inferred from four protein-coding nuclear genes. *Systematic Entomology*, 33(2):219-228. April. 2008.

RICHARDS, E.H.; EDWARDS, J.P. Parasitization of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae) by the ectoparasitic wasp, *Eulophus pernicornis*: effects of parasitization, venom and starvation on host haemocytes. *Journal of Insect Physiology*, 45:1073-1083, 1999.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Imunologia*. Sexta Edição. Manole, Tumbaté-SP. 479p. 2003.

RUSSO, J.; BREHÉLIN, M.; CARTON, Y. Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. *Journal of Insect Physiology*, Oxford, v.47, p.167-172. 2001.

SANCHEZ-SOTO, S.; NAKANO, O. Novo registro de Lepidoptera na cultura do milho no Brasil. *Neotropical Entomology*, v.32, p.365-366, 2003

SANZ-RODRIGUEZ, F.; GUERRERO-ESTEO, M.; BOTELLA, L.M.; BANVILLE, D.; VARY, C.P.; BERNABÉU, C. Endoglin regula a organização do citoesqueleto através da ligação a ZRP-1, um membro da família Lim de proteínas". *The Journal of Biological Chemistry*, 279(31): 32858-68. Jul. 2004.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 97:11307–11312. 2000.

SCOBLE, M.J. *The Lepidoptera: Form, Function and Diversity*. The Natural History Museum, London & Oxford University Press. 1995. 440pp.

SHERR, C.J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.*, 60:3689-695. 2000.

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*. Parte 2. Tomo 1º, insetos, hospedeiros e inimigos naturais. Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, 622p. 1968.

SILVA, C.C.A. Aspectos do sistema imunológico dos insetos. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento*, 24: 68-72. 2002.

SLACK, J.M.W. Stem cells in epithelial tissues. *Science*, 287:1431–1433. 2000.

SMAGGHE, G.; GOODMAN, C.L.; STANLEY, D. Insect cell culture and applications to research and pest management. In: *Vitro Cell. Dev. Biol. - Animal*. 45:93–105. 2009.

SMITH, H.R. Genomics of Insect Pests to Agriculture Program. *Biosci.*, 32:447–456. 2010.

SOELLER, W.; OH, C.E.; KORNBERG, T.B. Isolation of cDNAs encoding the Drosophila GAGA transcription factor. *Mol. Cell. Biol.*, 13:7961-7970. 1993.

SOHI, S.S. *Development of Lepidopteran Cell Lines*. In: Richardson C. D. Methods in Molecular Biology, Vol. 39: Baculovirus Expression Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 397-412p. 1995.

SPECHT, A.; CORSEUIL, E.; FORMENTINI, A.C. 5 – *Hemileucinae*. p. 81-131 In: A. SPECHT; E. CORSEUIL & H.B. ABELLA (Org.). *Lepidópteros de Importância Médica – principais espécies ocorrentes no Rio Grande do Sul*. Pelotas, USEB, 220p. 2008.

SULUDERE, Z. Studies on the external morphology of the eggs of some *Melitaea* species (Satyridae: Lepidoptera). *Communic. Fac. Sci. Univ. Ank. Serie C*, 6: 73-84. 1988.

SUNDARAM, R.M.; BENTUR, J.S. Biotechnology and insect pest management. *Genome biology*, 543- 563. 2006.

SUNDARAM, R.M.; BENTUR, J.S. Biotechnology and insect pest management. *Genome biology*, 543- 563. 2006.

SUNLEY, K.; BUTLER, M. Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest. *Biotechnol Adv*, 28: 385–394. 2010.

TANADA, Y.; KAYA, H. K. *Insect pathology*. San Diego: Academic Press, 1993.

TOPOL, J.; DEAROLF, C.R.; PRAKASH, K.; PARKER, C.S. Synthetic oligonucleotides recreate *Drosophila fushi tarazu* zebra-striped expression. *Genes Dev.*, 5:855-867. 1991.

TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. *Estudo dos insetos – tradução da 7ª edição de borror and delong's introduction to the study of insects*. São Paulo, Cengage Learning, 809 p. 2011.

WATANABE, Y.; CHU, Y.; ANDRESEN, J.J.; NAKANE, H.; FARACI, F.M.; HEISTAD, D.D. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase reduces cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, 34:434–440. 2003.

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

WEN, F.; ZHANG, Y.; QU, L.; ZHANG, H.; YANG, Z.; QIN, Q.; WANG, Y.; WANG, W. Two new cell lines originated from the embryos of *Clostera anachoreta* (Lepidoptera: Notodontidae): characterization and susceptibility to baculoviruses. In: *Vitro Cell. Dev. Biol.–Animal*, 45:409–413. 2009.

WILSON, C.; ENDITTI, R.; REGA, L. R.; COLANZI, A.; D'ANGELO, G.; DE MATTEIS M. A. The Golgi apparatus:na organelle with multiple complex functions. *Biochemical Society*. Utopia, Jan 1;433(1):1-9. 2011.

WU, H.C.; HEBERT, C.G.; HUNG, C.W. QUAN, D.N. CARTER, K.K. BENTLEY, W.E. Tuning cell cycle of insect cell for enhanced protein production. *J. Biotechnol*, 168 (1): 55-61. 2013.

XU, L.L.; WARREN, M.K.; ROSE, W.L.; GONG, W.; WANG, J.M. "Human recombinant monocyte chemotactic protein and other C-C chemokines bind and induce directional migration of dendritic cells in vitro". *Journal of Leukocyte Biology*, 60(3): 365–71. Sep. 1996.

XU, M.; TAN, J.; WANG, X; ZHONG, X.; CUI, H. Establishment and characterization of a new embryonic cell line from the silkworm. *Bombyx mori*. *ISJ*, 12:13-18. 2015.

YAMASHITA, M.; IWABUCHI, K. *Bombyx mori* prohemocyte division and differentiation in individual microcultures. *Journal of Insect Physiology*, Oxford, 47:325-331, 2001.

ZDOBNOV, E.M.; BORK, P. *Quantification of insect genome divergence*. Trends in Plant Science. 9-9. 2006.

ZHANG, C.; LI, A.; ZHANG, X.; XIAO, H. A novel TIP30 protein complex regulates EGF receptor signaling and endocytic degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(11): 9373–81. Mar. 2011.

ZHAO, W.; JI, X.; ZHANG, F.; LI, L.; MA, L. Embryonic Stem Cell Markers. *Molecules*, 17:6196-6236. 2012.

ZUCCHI, R.A.; SILVEIRA NETO, S.; NAKANO, O. *Guia de identificação de pragas agrícolas*. Piracicaba : FEALQ, 139p. 1993.

APÊNDICE

Tabela 2. Tendência central e dispersão, expressão e significância estatística de anticorpos em células cultivadas a partir de embriões precoces de *Syssphinx molina*. **DP**=desvio padrão; **Exp.**=expressão; **NEG**=negativo; **ns**=não significante; **POS**=positivo; **signific.**=significância; **‡**=expressão comparativa com base no valor obtido da amostra controle; *=pouco significância, **média significância, ***alta significância

Anticorpo utilizado	P0EP(ad)				P6EP(ad)				P0EP(sob)				P6EP(sob)			
	Média	DP	Exp. ‡	Sumário signific.	Média	DP	Exp.‡	Sumário signific.	Média	DP	Exp. ‡	Sumário signific.	Média	DP	Exp.‡	Sumário signific.
Controle	10,2	1,1			2,9	0,6			0,2	0,1			5,4	0,8		
Anti-Axons	14,8	1,3	POS	***	10,9	1,1	POS	***	15,2	1,3	POS	***	24,5	1,6	POS	***
Anti-GM-130	49,3	2,3	POS	***	44,5	2,2	POS	***	48,2	2,3	POS	***	45,4	2,2	POS	***
Anti-RAB5	48,2	2,3	POS	***	45,4	2,2	POS	***	50,5	2,4	POS	***	48,5	2,3	POS	***
Schneider L2	14,5	1,3	POS	**	10,2	1,1	POS	***	14,7	1,3	POS	***	17,2	1,4	POS	***
Anti-CD-105	22,6	1,6	POS	***	9,7	1,0	POS	***	5,9	0,8	POS	***	8,2	1,0	NEG	ns
Anti-CD-117	31,8	1,9	POS	***	22,0	1,6	POS	***	6,4	0,8	POS	***	19,7	1,5	POS	***
Anti-OCT 3/4	13,9	1,2	NEG	ns	10,9	1,1	POS	***	5,0	0,7	POS	***	11,1	1,1	POS	***
Anti-SSEA-4	17,4	1,4	POS	***	7,9	0,9	POS	***	2,0	0,5	NEG	ns	16,2	1,3	POS	***
Anti-Stro1	22,8	1,6	POS	***	9,0	1,0	POS	***	0,3	0,2	NEG	ns	11,6	1,1	POS	***
Anti-TGFbeta 1	15,3	1,3	POS	***	9,5	1,0	POS	***	1,2	0,4	NEG	ns	12,9	1,2	POS	***
Anti-Vimentina	18,4	1,4	POS	***	12,5	1,2	POS	***	20,9	1,5	POS	***	16,9	1,4	POS	***
Anti-Caspase 3 ativa	30,2	1,8	POS	***	29,7	1,8	POS	***	28,4	1,8	POS	***	36,2	2,0	POS	***
Anti-Ciclina D1	13,6	1,2	NEG	ns	10,7	1,1	POS	***	17,3	1,4	POS	***	12,7	1,2	POS	***
Anti-KI-67	16,1	1,3	POS	***	11,2	1,1	POS	***	14,8	1,3	POS	***	14,6	1,3	POS	***
Anti-P53	13,2	1,2	NEG	ns	9,5	1,0	POS	***	14,2	1,3	POS	***	14,5	1,3	POS	***
Anti-HSP-47	13,8	1,2	NEG	ns	10,8	1,1	POS	***	4,6	0,7	POS	***	14,9	1,3	POS	***
Anti-HSP-70	17,1	1,4	POS	***	11,3	1,1	POS	***	0,1	0,1	NEG	ns	10,3	1,1	POS	***
Anti-CD-24	8,2	1,0	NEG	ns	3,2	0,6	NEG	ns	1,8	0,4	NEG	ns	16,3	1,3	POS	***
Anti-CD-43	17,0	1,4	POS	***	7,3	0,9	POS	**	8,2	1,0	POS	***	11,1	1,1	POS	***
Anti-CD-73	14,9	1,3	POS	***	5,6	0,8	NEG	ns	25,5	1,7	POS	***	7,9	0,9	NEG	ns
Anti-CD-90	23,4	1,6	POS	***	8,2	1,0	POS	***	10,7	1,1	POS	***	11,6	1,1	POS	***
Anti-HLA-DR	36,6	2,0	POS	***	33,3	1,9	POS	***	63,5	2,7	POS	***	42,1	2,2	POS	***
Anti-MCP1	18,3	1,4	POS	***	16,0	1,3	POS	***	24,1	1,6	POS	***	17,8	1,4	POS	***

Fonte: CÂMARA, J. T. (2017).

Tabela 3. Tendência central e dispersão, expressão e significância estatística de anticorpos em células cultivadas a partir de embriões maduros de *Syssphinx molina*. **DP**=desvio padrão; **Exp.**=expressão; **NEG**=negativo; **ns**=não significante; **POS**=positivo; **signific.**=significância; **‡**= expressão comparativa com base no valor obtido da amostra controle; *=pouco significância,**média significância,***alta significância

Anticorpo utilizado	P0EM(ad)				P6EM(ad)				P0EM(sob)				P6EM(sob)			
	Média	DP	Exp. ‡	Sumário signific.	Média	DP	Exp. ‡	Sumário signific.	Média	DP	Exp. ‡	Sumário signific.	Média	DP	Exp. ‡	Sumário signific.
Controle	0,8	0,3			9,8	1,0			4,1	0,7			2,3	0,5		
Anti-Axons	11,0	1,1	POS	***	8,6	1,0	NEG	ns	12,7	1,2	POS	***	5,3	0,8	NEG	ns
Anti-GM-130	42,8	2,2	POS	***	25,7	1,7	POS	***	28,8	1,8	POS	***	68,8	2,8	POS	***
Anti-RAB5	32,2	1,9	POS	***	21,8	1,6	POS	***	31,7	1,9	POS	***	73,5	2,9	POS	***
Schneider L2	3,0	0,6	NEG	ns	5,0	0,7	NEG	***	6,5	0,8	NEG	ns	2,1	0,5	NEG	ns
Anti-CD-105	6,5	0,8	POS	***	5,2	0,8	NEG	***	3,1	0,6	NEG	ns	8,6	1,0	POS	***
Anti-CD-117	9,0	1,0	POS	***	18,3	1,4	POS	***	18,1	1,4	POS	***	10,2	1,1	POS	***
Anti-OCT 3/4	5,3	0,8	POS	***	9,5	1,0	NEG	ns	4,4	0,7	NEG	ns	4,4	0,7	NEG	ns
Anti-SSEA-4	2,3	0,5	NEG	ns	4,8	0,7	NEG	***	6,5	0,8	NEG	ns	7,8	0,9	POS	***
Anti-Stro1	4,8	0,7	POS	***	9,9	1,0	NEG	ns	7,0	0,9	NEG	ns	5,8	0,8	POS	*
Anti-TGFbeta 1	3,6	0,6	POS	**	4,5	0,7	NEG	***	5,0	0,7	NEG	ns	4,0	0,7	NEG	ns
Anti-Vimentina	5,0	0,7	POS	***	16,3	1,3	POS	***	27,5	1,7	POS	***	12,0	1,2	POS	***
Anti-Caspase 3 ativa	30,5	1,8	POS	***	17,0	1,4	POS	***	27,2	1,7	POS	***	18,4	1,4	POS	***
Anti-Ciclina D1	5,6	0,8	POS	***	16,5	1,4	POS	***	3,6	0,6	NEG	ns	4,5	0,7	NEG	ns
Anti-KI-67	4,0	0,7	POS	***	7,7	0,9	NEG	ns	11,8	1,1	POS	***	4,6	0,7	NEG	ns
Anti-P53	14,5	1,3	POS	***	6,0	0,8	NEG	***	3,1	0,6	NEG	ns	2,1	0,5	NEG	ns
Anti-HSP-47	5,4	0,8	POS	***	3,3	0,6	NEG	***	2,6	0,5	NEG	ns	7,2	0,9	POS	***
Anti-HSP-70	3,8	0,6	POS	***	4,8	0,7	NEG	***	5,7	0,8	NEG	ns	9,2	1,0	POS	***
Anti-CD-24	2,1	0,5	NEG	ns	10,3	1,1	NEG	ns	1,8	0,4	NEG	ns	7,0	0,9	POS	***
Anti-CD-43	2,6	0,5	NEG	ns	9,3	1,0	NEG	ns	6,9	0,9	NEG	ns	1,0	0,3	NEG	ns
Anti-CD-73	18,0	1,4	POS	***	4,6	0,7	NEG	***	2,2	0,5	NEG	ns	3,6	0,6	NEG	ns
Anti-CD-90	4,1	0,7	POS	***	4,6	0,7	NEG	***	8,8	1,0	POS	***	11,4	1,1	POS	***
Anti-HLA-DR	37,1	2,0	POS	***	14,9	1,3	POS	***	47,4	2,3	POS	***	9,7	1,0	POS	***
Anti-MCP1	14,9	1,3	POS	***	9,9	1,0	NEG	ns	14,8	1,3	POS	***	30,4	1,8	POS	***

Fonte: CÂMARA, J. T. (2017).