



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Efeito da Adição de Colesterol e Ecdisona na Produção
in vitro do Baculovírus *Spodoptera frugiperda* MNPV

Graciana Clécia Dantas

Natal/RN

Agosto/2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Graciana Clécia Dantas

EFEITO DA ADIÇÃO DE COLESTEROL E ECDISONA NA
PRODUÇÃO *IN VITRO* DO BACULOVÍRUS *SPODOPTERA*
FRUGIPERDA MNPV

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química – PPGEQ, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Márcia Regina da Silva Pedrini.

Natal/RN

Agosto/2010

Catálogo da Publicação na Fonte.
UFRN / CT / PPGEQ
Biblioteca Setorial "Professor Horácio Nicolas Solimo".

Dantas, Graciana Clécia.

Efeito da adição de colesterol e ecdisona na produção *in vitro* do Baculovírus *Spodoptera frugiperda* MNPV / Graciana Clécia Dantas. - Natal, 2010.

85 f.: il.

Orientadora: Márcia Regina da Silva Pedrini.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

1. Bioinseticidas - Dissertação. 2. Baculovírus - Dissertação. 3. *Spodoptera frugiperda* - Produção *in vitro* - Dissertação. I. Pedrini, Márcia Regina da Silva. II. Título.

RN/UF/BSEQ

CDU 661.164.2:578.841(043.3)

DANTAS, Graciana Clécia – Efeito da Adição de Colesterol e Ecdisona na Produção *in vitro* do Baculovírus *Spodoptera frugiperda* MNPV. Dissertação de Mestrado, UFRN, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Márcia Regina da Silva Pedrini.

RESUMO: Dentre as pragas que atacam a cultura do milho no Brasil, destaca-se a *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida no estágio larval como lagarta-do-cartucho, considerada a praga chave da cultura, alimentando-se da planta em todas as suas fases de crescimento, principalmente dos cartuchos de plantas jovens. Para seu controle, tem-se empregado inseticidas químicos de amplo espectro, o que tem causado efeitos adversos ao homem e ao meio ambiente. Por essa razão, torna-se necessária a busca de alternativas mais eficientes, de baixo custo e de fácil utilização, como o uso de bioinseticidas, especialmente os baculovírus. Devido à instabilidade genética durante a passagem seriada de baculovírus em cultivo de células de inseto, o desenvolvimento da produção *in vitro* de bioinseticidas virais é o maior desafio para a sua produção massal. Passagens sucessivas de vírus usando vírus extracelulares (BVs), necessárias para o aumento de escala durante a produção de bioinseticida viral, leva ao aparecimento de formas aberrantes de vírus, processo conhecido como “efeito de passagem”. A principal consequência do efeito passagem é a diminuição da produção de corpos de oclusão (OB), inviabilizando economicamente sua produção pelo processo *in vitro*. Neste trabalho, foi realizada a passagem seriada do isolado 18 do baculovírus *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* em células Sf21. Foi observada uma queda na produção de OB de 170 para 92 da terceira para quarta passagem. Um planejamento experimental fatorial (2^2) foi empregado para verificar a influência de duas variáveis de entrada, concentração de hormônio 20- Hidroxiecdisona (C_H) e concentração de colesterol (C_C), sobre os valores das variáveis de resposta do processo (produção volumétrica e produção específica de OB), procurando definir as faixas ótimas de operação para reverter ou minimizar o efeito passagem. O resultado deste planejamento indicou influência negativa da adição do colesterol e positiva na adição de hormônio, onde as faixas ótimas encontradas para as concentrações estudadas foram: 8 a 10 μ g/mL e 5 a 6,5 μ g/mL, para as concentrações de colesterol e hormônio, respectivamente. Novos experimentos foram realizados com a adição individual de hormônio e colesterol com a finalidade de verificar a influência destes adjuvantes na produção de OB de forma independente. No planejamento experimental obteve-se produção volumétrica de $9,4 \times 10^7$ OB/mL e específica de 128,4 OB/célula. Quando se adicionou 6 μ g/mL de 20-Hidroxiecdisona, as concentrações elevaram-se para $1,9 \times 10^8$ OB/mL e 182,9 OB/célula, indicando que a adição do hormônio melhorou a eficiência da produção *in vitro* de produção de SfMNPV em cultivos de células Sf21.

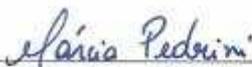
Palavras chave: Bioinseticida, baculovirus, cultivo de células de inseto, SfMNPV, colesterol, 20- Hidroxiecdisona.

Graciana Clécia Dantas

**EFEITO DA ADIÇÃO DE COLESTEROL E ECDISONA NA
PRODUÇÃO *IN VITRO* DO BACULOVIRUS *SPODOPTERA*
*FRUGIPERDA***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química - PPGEQ, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em 02 de agosto de 2010



Prof^a Dr^a Márcia Regina da Silva Pedrini
Orientadora – UFRN



Dr^a Andréa Farias de Almeida
Pesquisadora – CNPq/UFRN



Prof^a Dr^a Lisandra Murmann
Membro Interno – UFRN



Prof Dr Luciano Pacelli Medeiros de Macedo
Membro Externo - IFRN

ABSTRACT

Among the pests that attack corn crop in Brazil, there is *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), known as fall armyworm, which is the major corn pest. Due to genetic instability during serial passage of baculoviruses in insect cell culture, the viral bioinsecticides *in vitro* production development is the greatest challenge for mass production of this bioproduct. Successive passages of virus using extracellular viruses (BVs), necessary during viral bioinsecticides production scaling up, leads to the appearance of aberrant forms of virus, a process so called as "passage effect ". The main consequence of passage effect is the production of occlusion bodies (OB) decrease, preventing its production using *in vitro* process. In this study, it was carried out a serial passage of baculovirus *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus*, isolate 18, using Sf21 cells. A decrease in the production of occlusion bodies from 170 to 92 in the third to fourth passage was observed. A factorial experimental design (2^2) was employed to verify the influence of two input variables, concentration of the hormone 20 - hydroxyecdysone (C_H) and cholesterol (C_C) on the values of response variables (volumetric and the specific OB production) of the process, seeking to define the optimum operating ranges trying to reverse or minimize the passage effect. The result indicated a negative influence of the cholesterol addition and positive effect in the hormone supplementation which the optimum range found for the concentrations studied were 8 to 10 μ g/mL and 5 to 6.5 mg / mL, for cholesterol and hormone concentrations respectively. New experiments were performed with addition of hormone and cholesterol in order to check the influence of these additives on the OB production independently. While the best result obtained from the factorial experiment was 9.4×10^7 OB/mL and 128.4 specific OB/cell, with the addition of only 6 μ g/mL 20-hydroxyecdysone these concentrations increased to 1.9×10^8 OB/mL and 182.9 OB/cell for volumetric and specific OB production, respectively. This result confirms that the addition of the hormone 20-hydroxyecdysone enhances the SfMNPV *in vitro* production process performance using Sf21 cells.

Key words: Bioinsecticide, baculovirus, insect cells culture, SfMNPV, cholesterol, 20 – Hydroxyecdysone.

A meu pai João Justino (*in memoriam*)
e a toda a minha família, pessoas que me
deram apoio integral nos momentos difíceis.
Por todo amor e compreensão.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus, fonte de vida, pelas bênçãos a mim concedidas e pela oportunidade de viver.

À minha mãe, pelo exemplo, amor e apoio incondicional e que entendeu minha ausência temporária durante a finalização de mais este desafio.

Aos meus irmãos, Júnior, João Hélio, Getúlio e George, que tantas vezes me ajudaram com uma palavra amiga e de carinho, que sempre me alegraram, me apoiaram e nunca me deixaram esquecer que uma família unida é a melhor coisa do mundo.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Márcia Regina da S. Pedrini, pela orientação, serenidade e principalmente pela amizade e confiança que depositou em mim para a realização deste trabalho.

À Dra. Andréa Farias pela pronta e amigável paciência, disposição nas dúvidas surgidas na realização deste trabalho, pelas correções da dissertação e também por ter permitido que eu fosse a sua “sombra” durante toda esta batalha. A você, sou eternamente grata!

Às amigas inesquecíveis: Juliana e Kátia que tantas vezes ouviram com paciência minhas lamentações. Muito obrigada por tudo, principalmente pela ajuda na análise estatística e na formatação do documento.

Aos colegas do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte que me permitiram compartilhar com eles de momentos divertidos durante esse tempo.

Não poderia esquecer a pessoa que esteve ao meu lado em praticamente todos os momentos. Agradeço a você Maciel pela compreensão nos meus momentos de ausência em função de minha vida acadêmica.

À minha família em geral, em especial às tias Cida e Solidade com seu amor e sua vontade de me ver crescer profissionalmente. Não podendo esquecer meus amores, Rainan e Ludmila pelas preces a Deus para que eu conseguisse mais essa vitória. Amo vocês!

Ao CNPQ, pela concessão de bolsa de estudos.

SUMÁRIO

1. Introdução Geral.....	2
2. Revisão bibliográfica.....	6
2.1. Baculovírus.....	6
2.1.1. Taxonomia e estrutura de baculovírus.....	8
2.1.2. <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae) e o baculovírus <i>Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus</i> (SfMNPV).....	9
2.2. Produção de vírus.....	15
2.2.1. Sistema de produção <i>in vivo</i> de Baculovírus.....	15
2.2.2. Cultivo de células animais.....	16
2.2.3. Sistema de produção <i>in vitro</i> de Baculovírus.....	17
2.3. Efeito Passagem.....	21
2.4. Colesterol.....	23
2.5. Ecdisona.....	25
3. Metodologia experimental.....	29
3.1. Meio de cultura para manutenção e crescimento celular.....	29
3.2. Células e determinação da concentração celular.....	29
3.3. Vírus.....	30
3.3.1. Inóculo viral de SfMNPV.....	31
3.3.2. Quantificação dos corpos de oclusão (OB).....	32
3.4. Passagem seriada com SfMNPV.....	33
3.5. Adição de colesterol e de 20-Hidroxiecdisona.....	33
3.6. Planejamento experimental.....	34
4. Resultados e discussão.....	37
4.1. Infecção preliminar utilizando o ODV como inóculo.....	37
4.2. Passagem seriada.....	41
4.3. Produção de OB após adição de hormônio e colesterol.....	45
4.3.2. Adição individual de hormônio e colesterol.....	52
5. Conclusão.....	60
Referências bibliográficas.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Ciclo de infecção de um inseto hospedeiro. (Fonte: Pedrini & Mendonça, 2007)... 7	
Figura 2.2 Ciclo de vida da lagarta.(Fonte: http://pragascomuns.blogspot.com/2009/04/lagarta-do-cartucho-spodoptera.html). 10	
Figura 2.3. Ciclo da multiplicação <i>in vitro</i> de baculovírus (Rohrmann, 1999)..... 18	
Figura 2.4. Processo de produção em batelada (Fonte: Rhodes, 1996). 20	
Figura 3.1. Preparação do inóculo de baculovírus (ODV). 31	
Figura 4.1. Curvas de crescimento das células não infectadas e infectadas com o ODV do baculovírus SfMNPV..... 38	
Figura 4.2. Curvas de produção volumétrica e específica de OB da infecção de células por SfMNPV. 40	
Figura 4.3. Passagem seriada em células Sf21..... 43	
Figura 4.4. Produção específica de corpos de oclusão em células Sf21. 44	
Figura 4.5. Superfície de resposta (A) e a curva de nível (B) para a produção específica. 49	
Figura 4.6 Superfície de resposta (A) e a curva de nível (B) para a produção volumétrica. ... 49	
Figura 4.7. Diagrama de Pareto para a produção específica (A) e volumétrica (B). 51	
Figura 4.8. Produção específica de OBs após adição de colesterol e hormônio na quarta passagem. 52	
Figura 4.9. Curvas de crescimento das células não infectadas e infectadas com meio de cultivo adicionado 6µg/mL de 20-Hidroxicadisona. 53	
Figura 4. 10. Curvas de crescimento das células não infectadas e infectadas com meio de cultivo adicionado com 10µg/mL de colesterol. 54	
Figura 4.11. Produção específica de OB com adição de adjuvantes 55	
Figura 4.12. Produção volumétrica de OB com a adição de adjuvantes 55	
Figura 4.13. Produção específica de OB dos diferentes experimentos. 57	
Figura 4.14. Produção volumétrica de OB dos diferentes experimentos. 57	

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 Coleção de isolados de baculovírus da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia	12
Tabela 2.2. Coleção de isolados de baculovirus da Embrapa Soja, Londrina-PR.....	13
Tabela 2.3. Isolados de Baculovírus Spodoptera amostrados em diferentes regiões do Brasil.	14
Tabela 3.1. Delineamento experimental composto.	35
Tabela 4.1. Níveis reais e codificados das variáveis de entrada.....	45
Tabela 4.2. Matriz do planejamento fatorial 2^2 e dados experimentais.....	46
Tabela 4.3. ANOVA calculada para a produção específica com o erro puro e a falta de ajuste.	47
Tabela 4.4 ANOVA calculada para a produção volumétrica com o erro puro e a falta de ajuste.	48
Tabela 4.5. Resultado da ANOVA para a produção volumétrica de OB	56
Tabela 4.6. Resultado da ANOVA para a produção específica de OB.	56

NOMENCLATURA

AgMNPV	<i>Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus</i>
ANOVA	Análise de variância
BEVS	<i>Baculovirus Expression Virus Systems</i>
BV	<i>budded virus</i>
C	Concentração de células
C ₁	Concentração de estoque
C ₂	Concentração final
C _C	Concentração de colesterol
C _H	Concentração de hormônio
CNPMS	Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo
C _{OB}	Concentração de OB
<i>D</i>	Fator de diluição
F _{CAL}	F calculado
FP	<i>few polyhedra</i>
F _{TAB}	F tabelado
GL	Grau de liberdade
GmNPV	<i>Galleria mellonella nucleopoliedrovirus</i>
GV	<i>Granulovirus</i>
h.p.i	Hora pós infecção
MIP	Manejo Integrado de Pragas
M _{OB}	Média da contagem de OB

MQ	Média quadrática
$N_{células}$	Número de células contadas
NOV	vírus não-occlusos
NPV	<i>Nucleopolyhedrovirus</i>
NS1	<i>dengue virus nonstructural protein</i> (proteína não estrutural do vírus da dengue)
NOS	Células de mieloma murino
OB	corpos de oclusão
ODV	<i>occlusion derived vírus</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Sf9	Linhagem de célula da <i>Spodoptera frugiperda</i> , Clone 9
Sf21	Linhagem de célula da <i>Spodoptera frugiperda</i> , Clone 21
SFB	Soro fetal bovino
SFM	Serum Free Medium
SfMNPV	<i>Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus</i>
SQ	Soma quadrática
<i>T. ni</i>	<i>Trichoplusia ni</i>
V_1	Volume de estoque
$\mu_{p_{máx}}$	velocidades máximas específicas de produção
20HE	20-hidroxicdisona

Capítulo 1

Introdução Geral

1. Introdução Geral

O Brasil é um país com grande potencial na produção de grãos, e o milho é a cultura mais amplamente difundida e cultivada, pois se adapta aos mais diferentes ecossistemas. Na safra 2009/2010, o Brasil produziu 51,38 milhões de toneladas. Neste contexto, a região Nordeste foi responsável por 4,92 milhões de toneladas e o Estado do Rio Grande do Norte por 45,2 mil toneladas. Assim, devido a esse potencial agrícola tem-se enorme interesse em controlar os insetos-praga, considerando que os prejuízos causados por eles custam aos produtores de milho em média de 15 a 34% do custo total de produção (CONAB, 2010). Apesar da cultura do milho possuir alto potencial produtivo, esta é diretamente afetada pelo ataque de pragas desde o plantio até a sua utilização, seja para alimentação humana ou animal (Valicente & Tuelher, 2009). Em vista da alta produção nacional e do custo com agrotóxicos, é relevante ter investimentos no controle de insetos-praga.

Dentre as pragas que atacam a cultura do milho no Brasil, destaca-se a *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida no estágio larval como lagarta-do-cartucho, uma das mais importantes pragas desta cultura. Nos últimos anos, a agressividade da praga vem causando grandes prejuízos para a cultura do milho em várias áreas cultivadas, devido ao desequilíbrio biológico, pela eliminação de seus inimigos naturais, e também ao aumento da exploração da cultura, que é cultivada em várias regiões brasileiras, em duas safras anuais. Dessa maneira, livre dos inimigos naturais e com a disponibilidade de alimento durante o ano todo, a praga tem amplas condições de sobrevivência. O inseto também ataca e causa danos a várias outras culturas de importância econômica, como algodão, arroz, batata, feijão, sorgo, trigo (Cruz & Monteiro, 2004).

Este inseto é de difícil controle devido à sua variedade de hospedeiros e sua grande capacidade de dispersão durante o período de cultivo (Knipling, 1980). Como alternativa ao controle de pragas, diversos bioinseticidas têm sido avaliados por apresentarem baixa toxicidade ao homem e animais, eficiência contra várias espécies de pragas (Saxema, 1989) e serem compatíveis aos programas de manejo integrado de pragas (MIP) (Martinez & Van Endem, 2001).

Dentre os métodos de controle da *S. frugiperda*, o uso de produtos químicos vem sendo reduzido cada vez mais, em virtude de consequências negativas sobre a fauna benéfica, a ressurgência de pragas, e sobre a contaminação do ambiente (Gassen, 1996), além de ocasionar o desenvolvimento de populações resistentes do inseto, desequilíbrio biológico, efeitos prejudiciais ao homem e outros animais, e aliados ao alto custo (Kogan, 1998). Portanto, torna-se necessária a busca de alternativas que minimizem os efeitos adversos dos inseticidas sintéticos sobre o meio ambiente, que sejam eficientes, de baixo custo e de fácil utilização pelos produtores.

Visando o controle mais eficiente e específico à *S. frugiperda*, iniciou-se no Brasil e em outros países da América Latina como Argentina, Bolívia e Paraguai estudos utilizando baculovírus, vírus da família Baculoviridae, geralmente de alta virulência aos seus hospedeiros e restritos aos artrópodes, principalmente da ordem Lepidoptera, como bioinseticida viral no controle da população de insetos-praga. O Brasil possui o maior programa de utilização de um inseticida biológico no mundo, utilizando o nucleopoliedrovírus da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* (Huebner, 1918) (Lepidoptera: Noctuidae).

Atualmente o banco de baculovírus conta com 22 isolados amostrados em diversas regiões do Brasil. Estes isolados foram estudados, caracterizados e sua eficiência avaliada em relação à lagarta-do-cartucho (Barreto et al., 2005). Dentre os isolados mais estudados e eficientes no controle desta praga, o isolado 19 já teve seu genoma totalmente sequenciado (Wolff et al., 2008). Este sequenciamento é muito importante para se conhecer a estrutura, sequência e função de cada gene.

A linha de pesquisa atual está voltada para o desenvolvimento de um sistema de produção que possibilite a obtenção de um bioinseticida à base do baculovírus que infecta a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV), ou baculovírus *spodoptera*. Vários avanços foram obtidos, mostrando a possibilidade de produção em larga escala deste bioinseticida (Valicente & Tuelher, 2009).

A aplicação do baculovírus é realizada através de pulverização e a infecção ocorre por via oral através das folhas contaminadas pela aplicação do vírus. Todavia, sua produção tem sido feita *in vivo*, utilizando-se lagartas de *S. frugiperda* mantidas em dieta artificial, o

que implica em elevado custo de produção (Black et al., 1997; Moscardi & Souza, 2002). Além disso, a lagarta-do-cartucho tem características canibais, o que dificulta ainda mais sua produção *in vivo*.

A produção *in vitro* de baculovírus tem encontrado dificuldades técnicas e econômicas que parecem se fundamentar especialmente na instabilidade genética do vírus, que dificulta a ampliação da escala de produção (*scale up*) e na resistência do usuário na aceitação de tecnologias comparativamente caras e de longo tempo de maturação. No entanto, a produção *in vitro* tem sido apontada como um dos mais importantes desenvolvimentos a ser realizado nos próximos anos, especialmente se considerarmos o desenvolvimento de produção de controladores em larga escala.

Alguns estudos mostram a influência de substâncias ou componentes na produção de corpos de oclusão (OB – *occlusion bodies*) ou poliedros obtidos em sistemas *in vitro* de produção. Efeitos do colesterol sobre a replicação dos *Nucleopolyhedrovirus* (NPVs) foram estudados visando otimizar a produção *in vitro* de baculovírus em culturas em suspensão de células Sf9 (*S. frugiperda*). Estes estudos demonstraram que a adição de colesterol permitiu corrigir irregularidades morfológicas nas membranas dos OB formados e dos *virions* oclusos nestes OBs observadas na replicação de *Galleria mellonella nucleopolyhedrovirus* (GmNPV). Sendo assim, o colesterol estimula o crescimento celular com a finalidade de se obter uma alta concentração de células permitindo a replicação de baculovírus (Belloncik; Akoury; Cheroutre, 1997).

O crescimento e o desenvolvimento adequados dos insetos dependem da concentração de 20-hidroxiecdisona em vários estágios de diferenciação (Chapman, 1998). Segundo Chan et al. (2002) a adição do hormônio de inseto, 20-Hidroxiecdisona, proporciona um aumento na produção da proteína recombinante, demonstrando um aumento de cinco vezes que as culturas em batelada.

Neste contexto, propõe-se estudar a adição de colesterol e ecdisona ao meio de cultivo durante a produção *in vitro* do baculovírus *S. frugiperda* a fim de aumentar a sua produtividade e demonstrar a viabilidade do processo *in vitro* como um processo alternativo para a produção em larga escala deste bioinseticida viral.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2. Revisão bibliográfica

2.1. Baculovírus

A família de vírus Baculoviridae é conhecida há centenas de anos, compreendendo os vírus que infectam artrópodes e habitam ecossistemas aquáticos e terrestres (Miller, 1997), constituindo o maior grupo de insetos, principalmente da ordem Lepidoptera (borboletas, mariposas), Hymenoptera (marimbondos) e Coleoptera (besouros) (Federici, 1999), além de alguns crustáceos. O genoma dos baculovírus é composto por um DNA circular de fita dupla, variando de tamanho entre 80 e 180 kbases (Castro; Ribeiro; Souza, 2006) podendo codificar de 100 a 200 proteínas, e é envolto por capsídeo protéico em forma de bastonete, constituindo a unidade infectiva do vírus (nucleocapsídeo) (Theilmann et al., 2005).

O ciclo de vida dos baculovírus é bastante peculiar e se diferencia de outros vírus por produzir dois tipos de progênes infecciosas com funções diferentes, mas essenciais para a sua propagação natural. A forma oclusa do vírus (ODV - *occlusion derived viruses*) é responsável pela transmissão de inseto para inseto, enquanto a forma não oclusa (BV - *budded virus*) é responsável pela transmissão de célula para célula, em um mesmo indivíduo (infecção sistêmica) (Blissard, 1996).

O ciclo de infecção do baculovírus se inicia, conforme mostra a Figura 2.1, com a ingestão de OB do vírus presentes na superfície das folhas pelo inseto. Estes atingem partes da planta hospedeira de insetos, principalmente por meio de chuvas e movimentos de artrópodes do solo para as plantas. Ao chegar ao intestino médio do inseto, o vírus é submetido a pH alcalino (aproximadamente 11) que dissolve a poliedrina, liberando os *virions* no lúmen digestivo. As partículas infectivas penetram nas células epiteliais do intestino médio via fusão de membrana, mediada por receptores específicos (Horton & Burand, 1993). No citoplasma, nucleocapsídeos desprovidos de membrana são levados até o núcleo da célula, onde se inicia a expressão dos genes virais e a replicação do seu genoma. Após a replicação,

novas cópias do genoma viral são encapsuladas no núcleo, dando origem aos novos nucleocapsídeos que migram para o citoplasma e deixam a célula pelo processo de brotamento. Nesse processo, os nucleocapsídeos tornam-se envelopados ao adquirirem a membrana plasmática da célula hospedeira. Os *virions* resultantes são do tipo extracelular (BV) e constituem os principais produtos da primeira etapa do processo de infecção da lagarta, chamada de infecção primária. Os BVs são levados até outros tecidos da larva pelo sistema traqueal e penetram nas células por endocitose, dando início à infecção secundária, disseminando, assim, a infecção de célula para célula do hospedeiro (Pedrini & Mendonça, 2007).

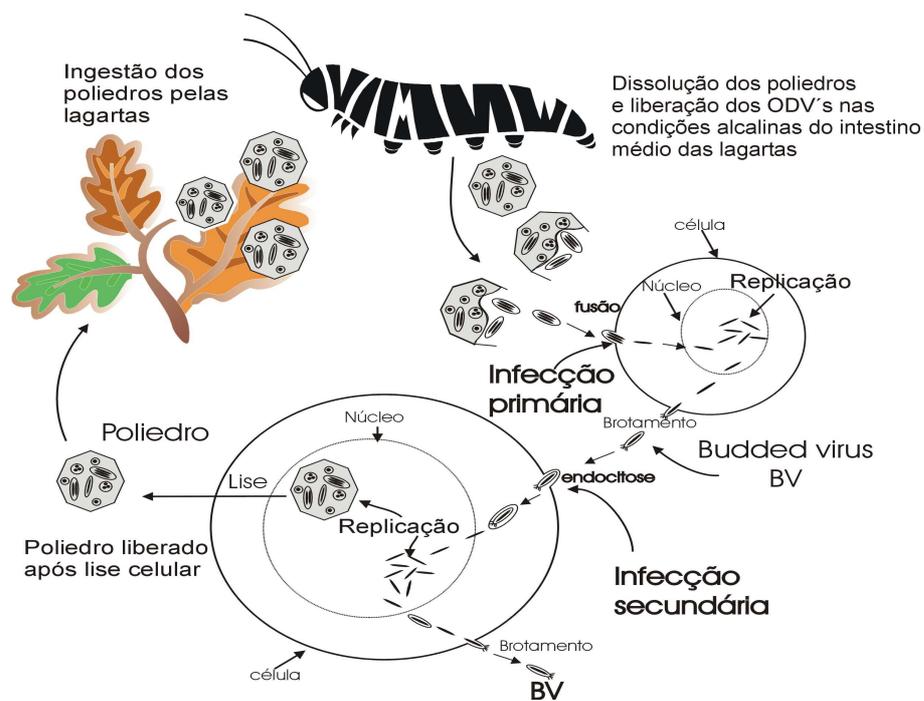


Figura 2.1 Ciclo de infecção de um inseto hospedeiro. (Fonte: Pedrini & Mendonça, 2007).

2.1.1. Taxonomia e estrutura de baculovírus

Até 1995, a família Baculoviridae era taxonomicamente dividida em duas subfamílias: Eubaculovirinae, que incluía os vírus oclusos (NPV- nucleopoliedrovirus e GV - granulovirus) e Nudibaculovirinae, os vírus não-occlusos (NOV) (Francki et al., 1991). A partir de então, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus dividiu a família Baculoviridae com base na morfologia do OB em apenas dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus*, composto pelos NPV, e *Granulovirus*, compreendendo os GV (Murphy et al., 1995). Os nucleopoliedrovírus (NPV) possuem corpos de inclusão poliédrica (OB), contendo múltiplas partículas virais, enquanto os granulovírus (GV) contêm, em geral, partículas únicas, oclusas em corpos proteicos de forma ovoide (Castro; Souza; Bilimoria, 1999).

Tem sido apresentada recentemente uma proposta de alteração na classificação da família Baculoviridae, gêneros NPV e GV, com base na especificidade do hospedeiro (Jehle et al., 2006). Assim, estes autores sugeriram, através de evidências filogenéticas, a divisão da família Baculoviridae em quatro gêneros:

Alphabaculovirus – inclui todos os NPV de lepidópteros formadores dos fenótipos virais BV e ODV;

Betabaculovirus – compreende os GV lepidópteros que também formam partículas virais durante ciclo de infecção;

Gammabaculovirus – engloba os NPV específicos de himenópteros que não possuem em seus genomas genes correspondentes às proteínas específicas da partícula BV;

Deltabaculovirus – inclui baculovírus de dípteros que não apresenta em seu genoma homólogo ao gene poliedrina característico dos demais NPV.

2.1.2. *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e o baculovírus *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV)

A lagarta-do-cartucho, *S. frugiperda* foi reconhecida pela primeira vez em 1797, na Geórgia (EUA) e inicialmente foi classificada como *Phalaena frugiperda*, passando por várias denominações até receber o nome atual de *S. frugiperda*. Este inseto possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde a região central dos EUA até a Argentina e em algumas ilhas a oeste da Índia (Bertels, 1970; Pedigo, 1989).

Uma das principais razões para o aumento desta praga e de outras no Brasil têm sido as alterações no meio ambiente, provocadas pelo homem, como a expansão de fronteiras e o desenvolvimento de novas tecnologias de produção (Parra & Omoto, 2004).

A lagarta-do-cartucho é um inseto de metamorfose completa (ovo, lagarta, pupa e adulto) (Figura 2.2); os adultos acasalam-se três dias após a emergência e caracterizam-se por apresentarem hábitos noturnos. As fêmeas podem colocar de 1000 a 2000 ovos, nos primeiros quatro dias após a cópula. Essas posturas são colocadas em camadas e recobertas por filamentos brancos, escamas e pêlos (Valicente & Cruz, 1991). As mariposas põem os ovos na parte superior das folhas e num total de 150. Após três dias nascem as lagartas que passam a alimentar-se, de preferência, das folhas mais novas do milho, raspando-as (Gallo et al., 2002). Após completo desenvolvimento, atacam todas as folhas centrais, destruindo-as completamente. A duração do período larval é de 12 a 30 dias, findo o qual a lagarta mede aproximadamente 50 mm de comprimento (Alves; Zucchi; Vendramim, 1992; Cruz, 1995; Schmidt et al., 2001). Sua coloração varia de cinza-escuro a marrom (Gallo et al., 2002).

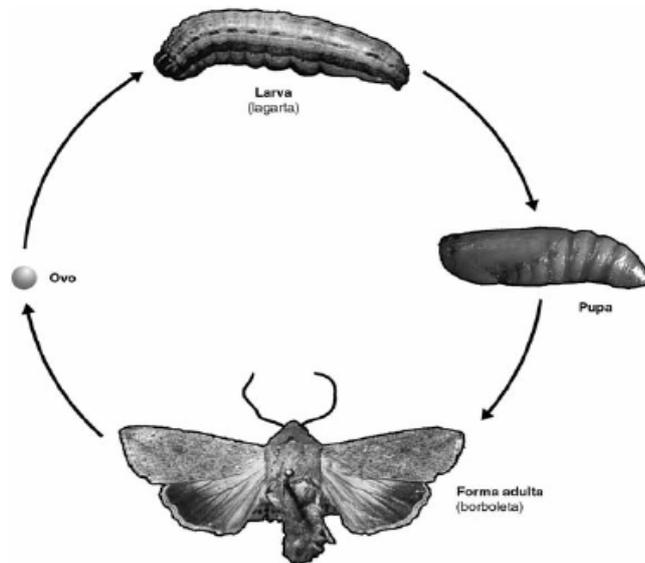


Figura 2.2 Ciclo de vida da lagarta. (Fonte: <http://pragascomuns.blogspot.com/2009/04/lagarta-do-cartucho-spodoptera.html>).

Outro dado importante com relação à descrição de *S. frugiperda* é a existência de raças nas populações desta espécie. Pashley (1986), nos Estados Unidos, identificou a existência de duas raças de *S. frugiperda* que apresentavam diferenças genéticas. Em 2002, no Brasil e em especial no estado do Rio Grande do Sul, estudos iniciais evidenciaram a possibilidade de existência de duas raças: raça “do milho” (*Zea mays*) e “do arroz” (*Oryza sativa*), assim classificadas devido aos seus hospedeiros preferenciais (Busato et al., 2002). A raça do milho tem como hospedeiros preferenciais milho e algodão, enquanto a raça do arroz tem o arroz e outras gramíneas forrageiras como preferenciais (Pashley, 1993). Este fato também foi constatado por Busato et al. (2003) que detectaram diferenças fenotípicas e genotípicas entre raças provenientes da cultura do milho e do arroz irrigado.

Para Pashley (1988), a constatação da existência de raças de *S. frugiperda* tem importância fundamental na concepção da entomologia agrícola, pois pode haver um comportamento diferenciado na seleção da planta hospedeira como também na resistência a inseticidas (Adamczyk et al., 1997) e no consumo de alimento e, conseqüentemente, no nível de dano econômico para cada cultura.

Alguns estudos estão sendo conduzidos para se propor uma estratégia de manejo adequada inclusive na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por meio de marcadores moleculares (Queiroz et al., 2005) e tem se observado que apesar de existirem diferenças genéticas, fisiológicas ou até mesmo morfológicas (Busato et al., 2003 e 2004), esta espécie não deixa de adaptar-se com facilidade às condições adversas, devido ao seu hábito polífago.

Ao longo dos últimos anos metodologias para o controle biológico da *Spodoptera frugiperda* pelo SfMNPV foram estabelecidas (Valicente & Cruz, 1991), e estudos de caracterização biológica e bioquímica foram conduzidos (Gerk; Kitajima; Souza, 1997).

O *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) foi identificado a partir de uma lagarta-do-campo e purificado (Valicente et al., 1989), vários isolados de SfMNPV foram identificados a partir de *S. frugiperda* coletadas em diversas regiões das Américas (Maruniak; Brown; Kundson, 1984; Berretta; Rios; De Cap, 1998; Escribano et al., 1999). Estes isolados geográficos são frequentemente compostos de cepas que diferem em seus perfis de restrição enzimática (Pedrini; Wolff; Reid, 2004).

Os isolados de baculovírus são divididos em três tipos: Geográficos que são isolados identificados em diferentes regiões; Temporais que são isolados retirados em diferentes épocas do ano; e Genéticos que são isolados que se diferem entre si pela variabilidade genética, recebendo a denominação de variantes ou clones (Souza et al., 2002).

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e Embrapa Soja apresentam uma coleção de vírus de insetos. Os vírus da coleção da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, conforme a Tabela 2.1, foram, em sua maioria, enviados por instituições de pesquisa para identificação dos patógenos, controle de qualidade ou monitoramento da estabilidade de bioinseticidas usados em programas de controle biológico (ex. Baculovírus anticarsia para o controle da lagarta da soja). Os isolados estão identificados e mantidos, a -20°C. Desses, um total de 41 encontram-se caracterizados. Esta coleção tem como responsáveis Marlinda Lobo de Souza e Maria Elita Batista de Castro (Circular Técnica 44).

A coleção da Embrapa Soja resulta da coleta de material em campo, em diferentes regiões do país, ou do recebimento de isolados de outras instituições nacionais e

internacionais. Dentre os baculovírus, há um total de 93 isolados, mostrados na Tabela 2.2. Responsável pela coleção: Flávio Moscardi (Circular Técnica 44).

Tabela 2.1 Coleção de isolados de baculovírus da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Isolados	Procedência	No. de Isolados
<i>Agraulis sp NPV</i>	Brasil (DF)	01
<i>Bombyx mori NPV</i>	Brasil (PR)	02
<i>Cydia pomonella GV</i>	Argentina	01
<i>Dione juno juno NPV</i>	Brasil (DF, PA)	04
<i>Megalopyge albicolis NPV</i>	Brasil (DF)	01
<i>Spodoptera frugiperda GV</i>	Brasil (MG)	03
<i>Spodoptera littoralis NPV</i>	Reino Unido	01
Total		61

Tabela 2.2. Coleção de isolados de baculovirus da Embrapa Soja, Londrina-PR

Isolados	Procedência	No. de Isolados
<i>Anticarsia gemmatalis</i> NPV	Várias regiões do Brasil, Argentina, Uruguai	18
Isolados geográficos e temporais	Obtidos em campos de produção do AgMNPV	17
Outros variantes (lab.)	Obtidos a partir do isolado temporal 1985	12
<i>Alabama argillacea</i> NPV	Brasil	1
<i>Anagrapha falcifera</i> NPV	EUA	1
<i>Autographa californica</i> NPV	EUA	2
<i>Bombyx mori</i> NPV	Brasil	2
<i>Buzura supressaria</i> NPV	China	1
<i>Cydia pomonella</i> GV	EUA, Argentina	2
<i>Diatraea saccharalis</i> GV	Brasil	1
<i>Epinotia aporema</i> GV	Brasil,	1
<i>Erinnyis ello</i> GV	Brasil	2
<i>Helicoverpa armigera</i> NPV	China, Indonésia	3
<i>Helicoverpa zea</i> NPV	EUA	1
<i>Mocis</i> sp. GV	Brasil	1
<i>Perigonia lusca</i> NPV	Argentina	1
<i>Pieris rapae</i> GV	EUA	1
<i>Plutela xylostella</i> GV	EUA, Brasil	2
<i>Pseudaletia sequax</i> NPV	Brasil	1
<i>Pseudaletia unipuncta</i> VG	EUA,	1
<i>Pseudoplusia includens</i> NPV	EUA, Brasil	2
<i>Rachiplusia nu</i> NPV	Argentina	1
<i>Spodoptera eridanea</i> NPV	Brasil	1
<i>Spodoptera frugiperda</i> NPV	Brasil, Argentina, Guatemala, EUA	8
<i>S. frugiperda</i> GV	Brasil, Argentina	3
<i>S. latifascia</i> NPV	Brasil	1
<i>S. litura</i> NPV	China, Indonésia	2
<i>Trichoplusia ni</i>	Brasil	1
<i>Urbanus proteus</i> NPV	Brasil	3
Total		93

Barreto et al (2005), estudaram o total de 22 isolados de vírus, conforme Tabela 2.3, amostrados em diferentes regiões produtoras de milho no Brasil contra a lagarta, *S. frugiperda* (J. E Smith) e observaram diferenças significativas entre todos os isolados e as concentrações de dosagem utilizada para todas as características observadas: percentuais de mortalidade, duração do período larval e período pupal, peso de pupa e a concentração letal (CL₅₀).

Tabela 2.3. Isolados de Baculovírus Spodoptera amostrados em diferentes regiões do Brasil.

Número do Isolado	Local da amostra – Estado
01	Penha, Local I – PR
02	Penha, Local II- PR
03	Melissa, Local I – PR
04	Melissa, Local II – PR
05	Cascavel – PR
06	Cascavel – PR
07	Marechal Cândido Rondon, Local I – PR
08	Marechal Cândido Rondon, Local II – PR
09	Penha, Local I – PR
10	Penha, Local II – PR
11	Melissa, Local I – PR
12	Penha, Local II – PR
13	Melissa, Local I – PR
14	Melissa, Local III – PR
15	Melissa, Local I – PR
16	Cascavel – PR
17	Cascavel – PR
18	Sete Lagoas – MG
19	Sertaneja – PR
20	Patos de Minas – MG
21	Patos de Minas – MG
22	Marechal Cândido Rondon, Local III – PR

2.2. Produção de vírus

Uma das características exclusivas dos vírus que os diferencia dos restantes dos seres vivos reside na sua necessidade de infectar células vivas para se propagarem. O substrato para o crescimento do vírus é uma célula hospedeira (Sinogas, 2007).

A produção de baculovírus utilizados como bioinseticidas pode ser realizada em dois sistemas distintos.

2.2.1. Sistema de produção *in vivo* de Baculovírus

Tradicionalmente, a produção de baculovírus é feita na própria lagarta seguindo exatamente o ciclo natural do vírus (King & Possee, 1992). Os insetos podem ser criados em laboratório e alimentados com dieta artificial o que resulta num custo final elevado (Moscardi & Souza, 2002). Em geral esse processo é trabalhoso e depende da presença do inseto na lavoura. Apesar da possível criação de insetos em condições de laboratório, isso não é aplicável a todas as espécies dependendo de fatores como seu próprio ciclo de vida e do estabelecimento de dieta artificial para a colônia (EMBRAPA, 2007).

Segundo Singh (1983) e Parra (2002), uma dieta artificial ideal para a criação massal de insetos deve fornecer todos os nutrientes para a produção de insetos comparáveis ao da natureza; propiciar alta viabilidade larval; dar origem a adultos com alta capacidade reprodutiva além de manter a qualidade do inseto ao longo das gerações, sem perder a fecundidade.

Santos (2003) e Parra (1986), criaram lagartas de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner 1818) (Lep.: Noctuidae) em laboratório e em dieta artificial, infectadas com seu vírus de poliedrose nuclear, cujo objetivo era a produção de bioinseticida.

No Brasil, o bioinseticida baculovírus anticarsia (AgMNPV) é usado para o controle da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*). Este é atualmente o maior exemplo mundial de uso de um inseticida viral (Moscardi, 1999). Além disso, representa um modelo importante de

substituição de agrotóxicos, que são altamente prejudiciais ao meio ambiente, por um controle ambientalmente correto. A produção do baculovírus anticarsia é conduzida *in vivo* em lagartas infectadas nas lavouras e depois levadas ao laboratório para purificação e formulação viral (Castro; Souza; Bilimoria, 1999). Entretanto esse processo só pode ser conduzido durante poucos meses do ano, durante a plantação de soja. Desta forma, a produção de baculovírus em larga escala, usando cultura de células poderá aumentar a oferta de vírus, pois a produção atual não chega a suprir 10% da área plantada no país e, além disso, as companhias produtoras de vírus não conseguem atender à demanda pelo produto (EMBRAPA, 2007).

2.2.2. Cultivo de células animais

O cultivo de células animais tem sido muito utilizado para a obtenção de uma grande variedade de produtos como vacinas (virais e recombinantes), proteínas e anticorpos terapêuticos (Chan et al., 2002; Strauss et al., 2007; Gotoh et al., 2009), e terapia gênica (Carinhas et al., 2009) destinados à investigação, diagnósticos, uso terapêutico e também controle biológico na agricultura (Valicente & Cruz, 1991; Moscardi & Souza, 2002; Pedrini; Wolff; Reid., 2004; Pedrini et al., 2005; Rodas et al., 2005; Castro; Ribeiro; Souza, 2006; Almeida et al., 2010). As tecnologias para a preparação de produtos virais vêm sendo desenvolvidas, há alguns anos, com bastante sucesso. Diferentes sistemas de cultivos, principalmente em suspensão, têm-se mostrado de grande eficiência para a preparação de produtos virais (Strauss et al., 2007; Gotoh et al., 2009). Os sistemas em suspensão caracterizam-se pelas células crescerem livremente no meio de cultura, sem a necessidade de suporte para o crescimento e mantidas por sistemas adequados de agitação e em ambiente favorável. No entanto, cultivos com células animais requerem vários cuidados especiais devido à sua fragilidade física e metabólica, além de baixa velocidade de crescimento (Hiss, 2001; Augusto; Barral; Piccoli, 2007). Dessa forma, o desenvolvimento de processos para obtenção de alta concentração celular é fundamental para a viabilidade econômica de produtos sintetizados por células animais.

2.2.3. Sistema de produção *in vitro* de Baculovírus

A produção *in vitro* de baculovírus em cultivo de células é realizada normalmente com o vírus extracelular da hemolinfa de insetos infectados ou do sobrenadante das células infectadas através da liberação das partículas virais dos OBs produzidos (Chan; Greenfield; Reid, 1998).

O processo de infecção começa logo após a entrada da partícula viral na célula. A Figura 2.3 ilustra as etapas seguintes à entrada do vírus na célula. A primeira etapa pode ocorrer dentro de três horas pós-infecção, para a descapsidação do vírus (Knudson & Harrap, 1976). É a chamada fase precoce da infecção, que antecede a replicação do DNA viral. A GP64, glicoproteína mediadora no processo de penetração do vírus na célula, promove a fusão da membrana endossomal com o envelope viral, liberando nucleocapsídeos no citoplasma da célula hospedeira. A presença do BV no citoplasma dispara o mecanismo celular de polimerização de fibras de actina, formando cabos que se associam aos nucleocapsídeos.

A próxima fase de infecção, a fase tardia, compreende o período de 6 a 24 horas após a infecção, quando uma estrutura elétron-densa (estroma virogênico) é formada e ocorre intensa produção de BV e replicação de DNA viral (Bilimoria, 1991). Os nucleocapsídeos, com peplômeros, migram do núcleo até a membrana citoplasmática, de onde brotam individualmente (Whitford et al., 1989) e a partir da 24^a hora pós-infecção é possível observar a presença de OBs no núcleo da célula infectada.

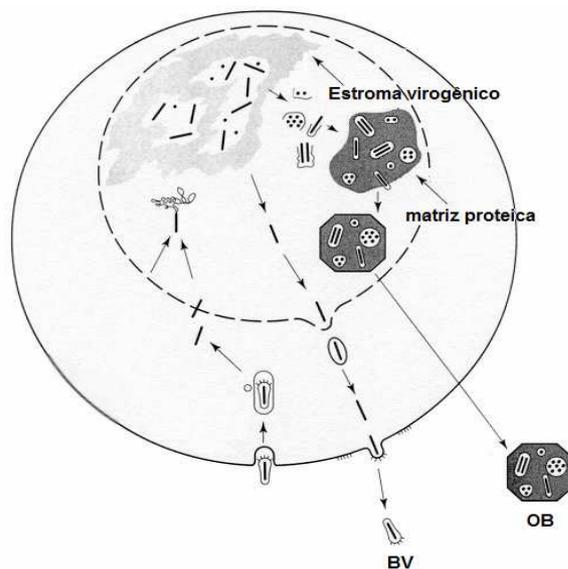


Figura 2.3. Ciclo da multiplicação *in vitro* de baculovírus (Rohrmann, 1999).

Avanços têm sido feitos na produção *in vitro* de baculovírus ao longo dos últimos anos, e isso oferece melhor perspectiva para a produção de bioinseticidas (Chen; Ijkel; Tarchini, 2001; Moscardi, 1999). Devido a estes avanços na área de cultivo celular, a produção de baculovírus em células de insetos pode ser feita em diferentes escalas desde cultura estática, *spinnners* e biorreatores (Griffiths, 1990; Weber et al., 2002). Essas células podem ser infectadas na forma extracelular de baculovírus, o que resulta na produção da forma oclusa (OBs), que pode então ser utilizada como inseticida biológico para combate ao inseto-praga (Grützmacher; Martins; Cunha, 2000).

Contudo, a produção de baculovírus em cultivos celulares oferece vantagens em relação à multiplicação *in vivo* por ser um sistema controlável, estéril, com alta pureza do produto e por dispor de centenas de linhagens de células de inseto estabelecidas. No entanto, sucessivas passagens do vírus em cultivo de células podem resultar em alterações genéticas levando à perda de virulência. A alteração mais comum refere-se à formação de mutantes FP (Few Polyhedra) e de partículas interferentes defectivas (DIPs). Os mutantes FP são caracterizados pela formação de poucos OBs no núcleo da célula infectada (Bischoff & Slavicek, 1997; Chakraborty & Reid, 1999; Pedrini; Wolff; Reid, 2004) enquanto as

partículas interferentes defectivas caracterizam-se pela geração de partículas virais com grandes perdas de seu genoma (Souza et al., 2003; Pedrini et al., 2005). Esses mutantes, FP e DIPs, levam à diminuição da produção de OBs (Souza et al., 2003; Almeida, 2005; Pedrini et al., 2005). A geração destes mutantes durante as passagens do cultivo de células pode comprometer o sistema *in vitro* para produção de baculovírus em larga escala.

Com relação aos avanços da tecnologia de cultivo de células de insetos e análise ultra-estrutural por microscopia eletrônica, atualmente é possível um estudo mais detalhado do processo de infecção *in vitro* e o desenvolvimento de uma série de investigações sobre os mecanismos moleculares envolvidos na replicação dos baculovírus (Castro; Souza; Bilimoria, 1999).

A maior parte dos estudos de produção *in vitro* é realizada em cultivo de células aderentes em placas ou frascos. As células formam uma camada simples (monocamada) em uma superfície disponível para o seu crescimento até atingir a confluência (Invitrogen, 2002). A utilização deste método dificulta a obtenção de dados quantitativos que possam ser utilizados no aumento de escala. Além disso, devido à relação entre número de células necessárias para a produção em massa e a superfície necessária para o crescimento destas células, torna este processo inviável economicamente para produção *in vitro* de bioprodutos utilizando células de inseto (Wu; Qian Ruan; Petetr, 1998).

O sistema ideal é o sistema de células em suspensão utilizando biorreatores. Os sistemas em suspensão caracterizam-se pelas células crescerem livremente no meio de cultura, sem a necessidade de suporte para o crescimento e mantidas por sistemas adequados de agitação e em ambiente favorável. Porém, poucos estudos têm sido realizados nesta modalidade de cultivo de células de inseto, utilizando técnicas de engenharia de processo, procurando tentar solucionar alguns dos problemas inerentes à replicação viral no sentido de otimizar o processo.

O processo de cultivo de células em suspensão descontínuo simples ou de batelada é a principal forma de condução dos processos estudados visando à produção de bioinseticidas virais (Rhodes, 1996; Murhammer, 1996; Pedrini; Wolff; Reid, 2004; Pedrini et al 2005, 2006a, 2006b; Lua, 2000; Slavicek; Hayes-Plazolle; Kelly, 2001). O aumento de escala é,

geralmente, realizado através de um número de processos de batelada sucessivos para aumento de concentração de inóculo viral (Rhodes, 1996; Almeida, 2010) (Figura 2.4). Os processos são realizados com infecções sincrônicas, ou seja, as células são infectadas de forma uniforme, possui inóculo com alto título viral. Em paralelo, outro processo é utilizado para a produção de células (Figura 2.4). Os processos descontínuos ou bateladas repetidas são denominados como passagens sucessivas em cultivo de células. Este processo é semelhante ao processo conhecido pelos profissionais de engenharia bioquímica como processos semi-contínuos com corte. O corte é feito através da separação das células e do sobrenadante, sendo este último utilizado como inóculo em uma nova batelada.

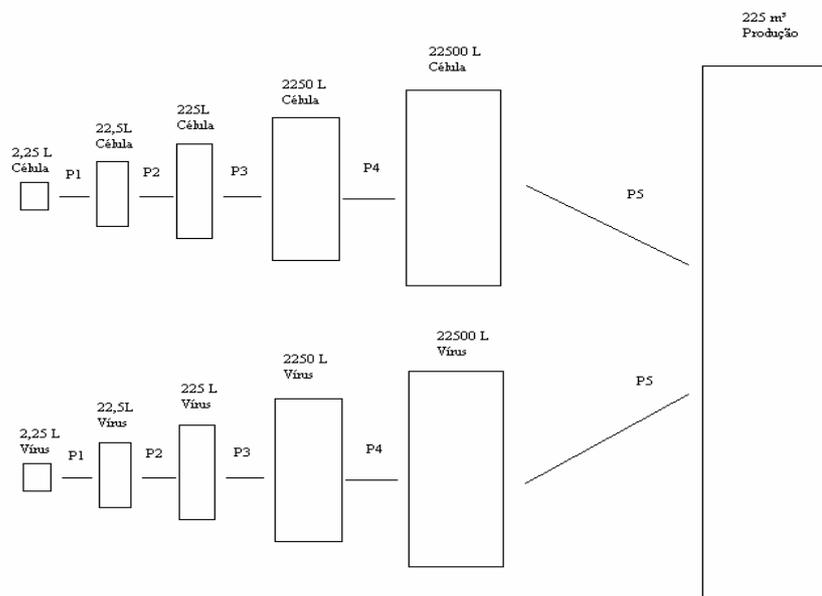


Figura 2.4. Processo de produção em batelada (Fonte: Rhodes, 1996).

Estudos para a viabilidade da produção de baculovírus *in vitro* foram iniciados pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília, DF, em parceria com a Universidade do Rio Grande do Norte, em Natal, RN. Estratégias foram estabelecidas para a produção do baculovírus anticarsia (*Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus*)

(Rezende, 2008; Almeida, 2010) e do baculovírus *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* em cultura de células (Almeida, 2005).

A produção *in vitro* do baculovírus SfMNPV a partir do isolado 18 utilizando o sistema de produção em batelada em linhagem de células de inseto Sf9 adaptadas ao meio HyClone (HyQ SFX-InsectTM) com adição de soro fetal bovino (SFB) foi estudada por Almeida (2005). Foram testadas as células Sf9 e Sf21 com relação à produção de OBs. Em seus estudos, Almeida (2005) verificou em testes preliminares de infecção que 100% das células foram infectadas após 72 h.p.i constatando uma potencial viabilidade de produção *in vitro* do vírus SfMNPV em cultivo em suspensão, a partir do isolado 18. Decorridos 10 dias de cultivo, foi observado uma produção volumétrica de $2,5 \times 10^8$ OB/mL correspondente a 110 OB/célula. O efeito durante a passagem seriada do SfMNPV (Isolado 18) em linhagem de células Sf9, a produção de OB em diferentes concentrações de SFB, parâmetros cinéticos estimados para o cultivo com células Sf9 e Sf21 como as velocidades específicas máximas de crescimento celular para as duas linhagens também foram mostrados neste estudo.

Segundo Almeida (2005), as células Sf9 produziram 2 vezes mais OB/mL de suspensão e 1,3 vezes mais OB/célula que as células Sf21. Houve uma redução no número de OB produzidos durante sete passagens do baculovírus. A comparação da produção de OB de SfMNPV em meio HyClone (HyQ SFX-InsectTM) com concentração de 5 e 2,5% SFB obteve resposta contrária à alguns estudos dos sistemas de produção *in vitro* de baculovírus já estudados em relação à adição de SFM (Chakraborty & Reid, 1999), onde a adição de 5% de SFB resultou em melhores resultados do que quando foram adicionados 2,5% de SFB no meio de cultivo. A melhor produção de OB pela linhagem Sf9 foi verificada pelas velocidades específicas de produção: $\mu_{pm\acute{a}x}$.

2.3. Efeito Passagem

Com a crescente utilização dos baculovírus como alternativa aos inseticidas químicos, limitações têm surgido quando se objetiva desenvolver sua produção,

principalmente, em sistemas *in vitro*. Um dos obstáculos da produção *in vitro* de baculovírus em larga escala é o acúmulo de alterações em seu genoma, através de ciclos de replicação em culturas de células ou em biorreatores, chamado de efeito passagem (Krell, 1996). Ou seja, sucessivas passagens do vírus em cultivo de células podem resultar em alterações genéticas levando à perda de virulência. As alterações mais comuns, denominadas como “efeito passagem”, referem-se à formação do fenótipo mutante FP (*few polyhedra*) e formações de partículas interferentes defectivas (DIP).

Os mutantes FP são caracterizados pela formação de poucos OB no núcleo da célula infectada (Chakraborty & Reid, 1999; Pedrini; Wolff; Reid, 2004). Além da redução de OB, oclusões que não contêm *virions* ou com *virions* de morfologia alterada, envelopamento intranuclear dos ODV (*occlusion derived viruses*) também anormal ou reduzido, aumento da liberação de vírus extracelulares (BV- *budded virus*) e diminuição da porcentagem de células que produzem OB caracterizam os mutantes tipo FP (*few polyhedra*) (Harrison & Summers, 1995).

A oclusão viral e a formação das partículas OB constituem um processo complexo que envolve vários genes virais, como o da *poliedrina*, *p10*, *PEP* e *25KFP* (Slavicek et al., 1998). O gene *25KFP* é essencial para a formação correta do OB e oclusão dos *virions* e sua deleção é suficiente para a aparição do fenótipo mutante FP (Beames & Summers, 1988 e 1989). As mutações FP estão correlacionadas a deleções no genoma viral ou inserções do DNA hospedeiro, o que pode ser detectado por digestão com endonucleases de restrição (Beames & Summers, 1988; Fraser; Smith; Summers, 1983; Wang; Fraser; Cary, 1989).

O outro tipo de alteração genética relacionada ao efeito passagem é a produção de DIPs. Estas partículas contêm apenas parte do genoma viral e replicam mais rapidamente que o vírus padrão. A maioria das partículas defectivas está presente em altas passagens seriadas do vírus (Souza et al., 2003). Wickham et al (1991) descreveram partículas interferentes defectivas selecionadas durante passagem seriada de uma linhagem recombinante E-2 de AgMNPV em três linhagens celulares. Essas partículas foram perdendo grande parte do genoma de AgMNPV, e também levam à diminuição da produção de corpos de oclusão (Pedrini et al., 2005).

O grau do efeito passagem depende do sistema célula-vírus em questão, mas frequentemente aparece até a décima passagem do vírus em cultura de células (Chakraborty & Reid, 1999). Na produção *in vitro* de baculovírus *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV), Pedrini; Wolf; Reid. (2004), observaram a rápida geração de fenótipo FP após somente duas passagens do isolado SfMNPV em cultura de células Sf9. Almeida (2005) utilizando também um isolado de SfMNPV cultivado em células Sf9, obteve uma maior estabilidade deste isolado, visto que a formação de mutantes do tipo FP foi identificada após a quarta passagem em células.

Pedrini et al. (2006a) atentam à importância da padronização do processo de aumento de escala dos bioinseticidas do tipo nucleopoliedrovirus nos primeiros estágios de seu desenvolvimento, especialmente quando se faz necessário o uso de meios de cultivo de baixo custo aliado à vírus purificados em placa. Estes autores observaram um declínio substancial da atividade biológica do vírus purificado em placa *Helicoverpa zea* NPV (HzSNPV) quando houve a troca do meio de cultivo original (Excell 401) para um meio de baixo custo desenvolvido por seu grupo de pesquisa (*in-house VPM medium*). Os autores sugerem ainda que vírus geneticamente homogêneos (como os purificados em placa) são menos adaptáveis às perturbações no meio nutritivo ambiente do que vírus selvagens. No entanto, nos dois casos, a mudança do meio durante o processo deve ser evitada.

2.4. Colesterol

O colesterol é um lipídio anfipático presente na membrana plasmática de todas as células de animais. Ele aumenta a rigidez da membrana e influencia também a sua permeabilidade.

As condições nutricionais em que uma linhagem celular é cultivada aumentam ou inibem várias etapas de uma replicação de baculovírus. Portanto, a determinação da composição ideal de um meio de cultura é necessária. Entre todos os nutrientes adicionados ao meio de cultura, os lipídios demonstram desempenhar um papel importante na sua

formulação. Esta suplementação lipídica tem como objetivos estimular o crescimento de células para obtenção de uma elevada densidade celular e permitir a replicação de baculovírus. De acordo com trabalhos anteriores, a replicação de baculovírus ocorre apenas quando o meio de cultura é suplementado com lipídios (Chernomordik et al., 1995).

Efeitos do colesterol sobre a replicação dos NPVs foram estudados visando otimizar a produção *in vitro* de baculovírus em culturas em suspensão de células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*). Estes estudos demonstraram que a adição de colesterol permitiu corrigir irregularidades morfológicas nas membranas dos OBs formados e dos *virions* oclusos nestes OBs observadas na replicação do *Galleria mellonella* nucleopolyhedrovirus (GmNPV). Sendo assim, o colesterol estimula o crescimento celular com a finalidade de se obter uma alta concentração de células permitindo a replicação de baculovírus (Belloncik; Akoury; Cheroutre, 1997).

Outros estudos têm abordado o estudo do colesterol na produção viral, como também no cultivo de célula animal. Dentre eles pode-se citar: Marheineke et al. (1998) que compararam a composição lipídica de duas diferentes linhagens de células de insetos comumente usadas como hospedeiros para produção de baculovirus, *Spodoptera frugiperda* (Sf9) e *Trichoplusia ni* (T. ni). Neste estudo, os autores encontraram concentrações similares nas duas linhagens de células estudadas, porém estas possuem uma concentração lipídica inferior às encontradas em células de mamíferos. Okonkowski et al. (2007) testaram a substituição do colesterol provenientes de fontes animais, tais como soro fetal bovino, por colesterol sintético para a produção de células mamíferas de ratos, dependentes de colesterol (células NSO) em biorreatores tipo *Wave*. Enquanto que a produção de células NSO dependentes de colesterol em biorreator *Wave* foi realizada sem problemas quando soro fetal foi utilizado ou quando a produção foi realizada utilizando o composto sintético em outro tipo de biorreatores (ex. biorreatores cujo tanque é feito de vidro), o crescimento das células foi problemático em biorreatores *Wave* utilizando o colesterol sintético. Os autores atribuem este problema a afinidade do colesterol sintético com o filme plástico do biorreator, o qual a afinidade é irreversível. Finalmente, o uso de soluções lipídicas, incluindo o colesterol, são utilizadas para aumentar a produtividade de proteínas recombinantes utilizando baculovírus

com vetor (BEVS- *Baculovirus Expression Virus System*) como aditivo em processos de batelada alimentada (Meghrouis et al., 2010, Palomares & Ramírez, 2009).

2.5. Ecdisona

Ecdisona é um pró-hormônio, que é convertido no hormônio ativo 20-hidroxiecdisona (Chapman, 1998). É um dos hormônios de insetos mais bem caracterizados, sendo responsável por regular vários genes que controlam crescimento, metamorfose e maturação sexual (Karim & Thummel, 1992).

A inativação da ecdisona cessa a metamorfose, mantendo o inseto em estado larval, resultando em um aumento da progênie viral, uma vez que este estado apresenta menor resistência à infecção viral. Além disso, ecdisteroides em geral, induzem alterações metabólicas que diminuem a permissividade da larva à infecção por baculovírus (O'Reilly; Hails; Kelly, 1998).

O aumento dos níveis deste hormônio leva ao início da muda. Quando a larva entra no estágio de muda, ela pára de se alimentar e o fluido de muda, que contém várias enzimas proteolíticas necessárias para a mesma, entra no espaço ecdisial. Neste ponto, as células epidérmicas entram em uma fase de aumento na síntese de proteínas (expressão do gene) e uma nova cutícula é produzida. Um decréscimo na concentração de 20-hidroxiecdisona desencadeia uma fase subsequente, que inclui a ativação das enzimas no fluido de muda, digestão da procutícula e reabsorção do fluido de muda. Na sequência, há mais um decréscimo na concentração de 20-hidroxiecdisona e outros hormônios, necessários para completar o processo de muda, são liberados, reiniciando-se, então, a alimentação.

Portanto, o crescimento e o desenvolvimento adequado dos insetos dependem da concentração de 20-hidroxiecdisona em vários estágios de diferenciação. Sugere-se que este hormônio esteroidal esteja relacionado com a regulação da expressão genética do genoma do inseto. Normalmente, os hormônios interagem com receptores específicos antes de iniciar um efeito fisiológico. O ecdisteroide obriga uma proteína receptora a regular as classes de genes

“antes” e “depois”. Os genes “antes” são ativados pelo complexo hormônio/receptor. As proteínas produzidas pelos genes “antes” reprimem a transcrição destes genes, ao mesmo tempo em que ativam a transcrição dos genes “depois”. Alguns dos produtos dos genes “antes” são fatores de transcrição. Os fatores de transcrição são proteínas que podem ligar-se a curtas seqüências de nucleotídeos, resultando no início ou regulação da transcrição (Wing, 1988).

O composto 20-hidroxiecdisona (20HE), além de ser considerado o principal agente indutor de metamorfose nos insetos (Dinan, 2001), é também o ecdisteróide encontrado em maior concentração tanto nas plantas como nos insetos (Dinan, 2001; Savchenko et al., 1998). A 20E é encontrada em concentrações variáveis em diversas espécies vegetais, dentre elas o milho, espinafre e samambaia (Dinan, 2001; Phillipova et al., 2003).

Linhagens de células de inseto desenvolvidas a partir de tecido ovariano (como é o caso das linhagens Sf21, Sf9 e T.ni) não produzem 20-Hidroxiecdisona (Lynn; Feldlaufer; Lusby, 1987) Porém, como revisado por Lynn; Feldlaufer; Lusby (1987), a exposição de ecdsteroides exógenos por células de inseto faz com que estas células sintetizem novas proteínas, como também são úteis como fator de crescimento para estas células. Além disso, adição de 20HE estimula a produção de proteínas recombinantes (Sarvari et. al, 1990, Chan et. al. 2002).

Sarvari et al. (1990) demonstraram a eficácia da adição de 20HE no aumento da produção de proteínas recombinantes utilizando baculovírus como vetor. Porém, a concentração do hormônio foi um fator importante. A adição de 2µg de HE/mL de meio de cultivo obteve um aumento na concentração da proteína, enquanto que a adição de 10µg/mL foi inibitória.

Chan et al. (2002) testaram o processo de batelada alimentada para produzir a glicoproteína recombinante do vírus da dengue NS1. Em estudos anteriores de processo de batelada alimentada para produção da proteína recombinante β-galactosidase (Chan; Greenfield; Reid, 1998), como neste estudo, estes autores conseguiram otimizar o processo através da adição de nutrientes (aminoácidos, lipídios, glicose e extratos de levedura) em culturas de células Sf9 em meio de cultivo SF900II (Invitrogen, USA). Porém, um aumento

em 20µg/ml de proteína NS1 foi encontrado, representando 5 vezes superior ao processo de batelada otimizado, quando foi adicionado 4µg/ml de 20HE ao meio de cultivo. Os autores sugerem que, como o 20HE pode estimular a síntese de RNA e proteínas em cultivos de células de inseto, é possível que a adição de 20HE pode reverter os problemas de toxicidade e alta osmolaridade das infecções quando processos de batelada alimentada são utilizados.

Capítulo 3

Metodología experimental

3. Metodologia experimental

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

3.1. Meio de cultura para manutenção e crescimento celular

O meio de cultura utilizado na manutenção das células e nos experimentos de infecção em cultura de células em suspensão foi o Meio SF900II SFM (Serum Free Medium) (GIBCO), ao qual foi adicionado 1% (v/v) de antibiótico (Antibiotic - Antimycotic) (Invitrogen Corporation) e conservado em geladeira a 4°C.

3.2. Células e determinação da concentração celular

Neste trabalho foi utilizada a linhagem de células Sf21 (*American Type Culture Collection, MD*) cedida pela Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF. Esta linhagem foi previamente adaptada pela Dra Andréa Farias de Almeida ao meio Sf900II, isento de soro fetal bovino. As células foram mantidas em suspensão com 20 mL colocados em frascos Erlenmeyers de 125 mL (Schott) operados a 120 rpm a 28°C em *shaker* orbital (Tecnal, TE - 422).

Utilizando um microscópio fase-contraste (Olympus, Japão) e um hemocítômetro, modelo Neubauer (Bright-Line Hemacytometer, Sigma) foi estimada a concentração celular conforme a Equação (1) em cada amostra. A contagem era realizada em triplicata, obtendo um erro de 15%, com aproximadamente 200 células contadas em ambos os lados do hemocítômetro (Nielsen; Smyth; Greenfield, 1991).

Através da técnica de exclusão pela coloração com Azul de Tripán (Sigma-Aldrich), a uma concentração final de 0,1% (v/v), foram determinadas a concentração de células viáveis e a viabilidade celular. As células que se tornaram azuladas devido à entrada do corante foram consideradas não-viáveis, enquanto que as células transparentes foram consideradas viáveis. A concentração celular é expressa em células por mL (células/mL).

$$C \left[\frac{\text{células}}{\text{mL}} \right] = \frac{N_{\text{células}} \cdot D}{18 \times 10^{-4} \rightarrow \text{volume de 2 lados do hemacitômetro}} \quad (1)$$

Onde:

C: concentração de células

$N_{\text{células}}$: número de células contadas

D : fator de diluição.

A viabilidade foi definida como a relação entre a quantidade total de células viáveis e não-viáveis.

3.3. Vírus

O vírus de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) isolado-18, foi cedido pelo Dr. Fernando Hercos Valicente da Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS), Sete Lagoas, MG.

3.3.1. Inóculo viral de SfMNPV

O inóculo viral, na forma de ODV (*occluded derived virus*) foi obtido segundo o método de Lynn (1994), conforme Figura 3.1.

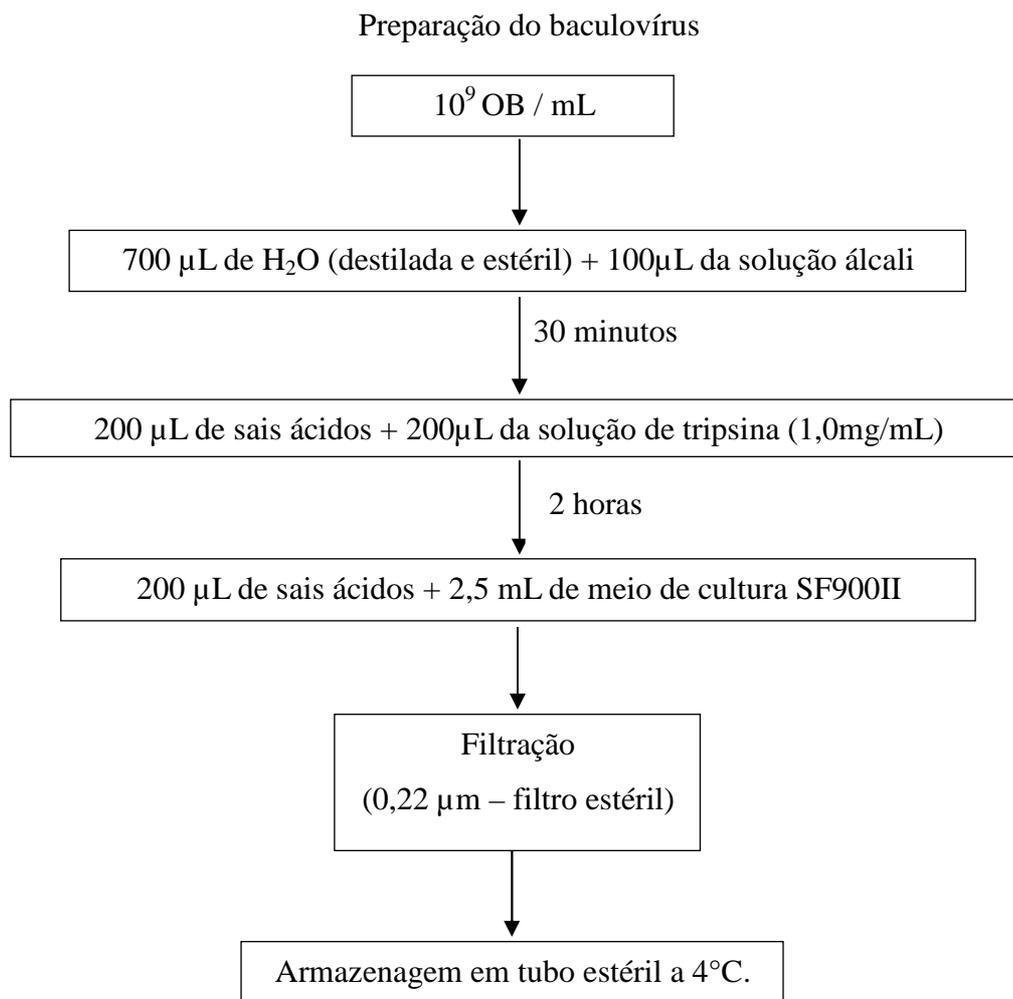


Figura 3.1. Preparação do inóculo de baculovírus (ODV).

O ODV foi utilizado como inóculo para infectar 20 mL de suspensão de células Sf21 com viabilidade média de 95% e concentração de $5,3 \times 10^5$ células viáveis/mL. Para os demais experimentos de infecção, foram utilizados como inóculo o vírus extracelular (BV) obtido a

partir da centrifugação (1000 rpm/10 minutos) de metade do volume de suspensão coletado após ter sido atingido o estabelecimento da infecção.

As infecções foram realizadas em *shaker* (120 rpm e 28°C) utilizando frascos Erlenmeyers de 125 mL (Schott). As concentrações de células não infectadas e infectadas foram acompanhadas diariamente até atingir viabilidade em torno de 50%, e a concentração de OB foi acompanhada até o final do processo de infecção.

Os experimentos referentes à passagem seriada foram realizados em duplicata apresentando erro médio de 5% para a contagem de células e 18% para contagem de OB. Os experimentos para verificar o efeito da adição dos adjuvantes (hormônio e colesterol), foram realizados conforme planejamento experimental descrito a seguir.

3.3.2. Quantificação dos corpos de oclusão (OB)

A concentração dos OBs foi determinada utilizando-se hemocitômetro onde as células foram dissolvidas em uma solução de 1% (p/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS) por 2 horas, permitindo, assim, o rompimento da membrana celular e conseqüentemente à liberação dos OBs.

Com a finalidade de permitir a contagem de 100 a 150 OBs no quadrante central de cada lado do hemocitômetro a suspensão contendo os OBs foi diluída com água purificada (18,3 MΩ-cm). A contagem dos OBs também foi feita em triplicata.

O cálculo da concentração dos OBs é dado pela seguinte Equação (2):

$$C_{OB} \left(\frac{OB}{mL} \right) = \frac{D \times 5 \times M_{OB}}{1 \times 10^{-4}} \quad (2)$$

Onde:

C_{OB} – Concentração de OB.

D – Fator de diluição.

M_{OB} – Média da contagem de OB.

O rendimento específico (OB/célula) foi calculada dividindo a concentração de OB pela maior concentração de células totais da cultura infectada.

3.4. Passagem seriada com SfmNPV

Foram realizadas cinco passagens do vírus SfmNPV em linhagem de células Sf21 cultivadas em meio SF900 II. Os experimentos foram realizados em Erlenmeyer de 125 mL (Schott) com volume de suspensão de 50 mL operados em shaker orbital a 120 rpm e temperatura controlada a 28°C. Todas as passagens foram feitas em duplicata.

Na passagem 1, as células Sf21 com viabilidade média de 97%, em 4 dias de cultivo, foram inoculadas com 10% (v/v) do BV do SfmNPV obtido da infecção com o ODV. Após o estabelecimento da infecção, 30 mL da suspensão infectada foi coletada, centrifugada a 1000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante (vírus extracelular) foi usado para inocular a passagem 2. As demais passagens seguiram o mesmo procedimento e cada sobrenadante serviu de inóculo para a passagem subsequente.

3.5. Adição de colesterol e de 20-Hidroxicdisona

Com base nos estudos de Belloncik ; Akoury; Cheroutre (1997) e Chan et al. (2002) foram estabelecidas as concentrações de hormônio e de colesterol utilizadas neste experimento. Inicialmente, 5 mg do hormônio 20 – HE foi diluído em meio SF900 II para um volume e concentração de estoque de 50 mL e 0,1 mg/mL e 0,01g de colesterol foram diluídos em 10 mL de meio SF900 II com concentração final de 1,0 mg/mL.

O efeito da adição de três diferentes concentrações destes adjuvantes foi estudado. O hormônio foi adicionado aos experimentos nas seguintes concentrações: 0,002; 0,004 e 0,006 mg/mL e o colesterol com as seguintes concentrações 0,01; 0,02 e 0,03 mg/mL. Para o cálculo do volume de solução de colesterol e de hormônio a serem adicionados à suspensão foi utilizada a Equação (3):

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (3)$$

Onde:

C_1 = concentração de estoque da solução de hormônio ou colesterol.

V_1 = volume de estoque da solução de hormônio ou colesterol.

C_2 = concentração final de hormônio ou colesterol.

V_2 = volume final da suspensão.

Através da Equação (3) foi determinado que a adição do hormônio seria de 0,5; 1,0; 1,5 mL e da solução de colesterol adicionado 0,25; 0,5; 0,75 mL.

3.6. Planejamento experimental

O processo de infecção foi realizado seguindo o delineamento experimental fatorial 2^2 adicionado de dois pontos centrais (Tabela 3.1). Este delineamento experimental foi empregado para verificar a influência das duas variáveis de entrada, concentração de hormônio (C_H) e concentração de colesterol (C_C), sobre os valores das variáveis de resposta (produção volumétrica e produção específica de OB) do processo, buscando definir as faixas ótimas de operação tentando reverter ou minimizar o efeito passagem.

Os cálculos dos efeitos e tratamentos estatísticos dos resultados foram realizados com o auxílio do software Statistica 7.0.

Tabela 3.1. Delineamento experimental composto.

	Variáveis Originais		Variáveis Naturais		Resposta
	Hormônio (μg)	Colesterol (μg)	X_1	X_2	Y
Fatorial	2	10	-1	-1	
	4	20	1	-1	
	6	30	-1	1	
	6	10	1	1	
Pontos Centrais	4	20	0	0	

Capítulo 4

Resultados e discussão

4. Resultados e discussão

4.1. Infecção preliminar utilizando o ODV como inóculo

O processo de infecção das células Sf21 para a obtenção dos OBs utilizando como fonte viral o ODV está representado pelas Figuras 4.1 e 4.2.

Constatou-se no segundo dia de infecção, que as células não infectadas e infectadas apresentaram diferenciação quanto ao crescimento ($1,8 \times 10^6$ células viáveis/mL e $5,2 \times 10^5$ células viáveis/mL, respectivamente) indicando o estabelecimento da infecção. Após este dia, as células infectadas desenvolveram-se menos devido à ação viral, enquanto as células não infectadas estavam em pleno desenvolvimento demonstrando a adaptação às condições de cultivo.

A determinação das multiplicidades de infecção (MOI) não foi realizada neste trabalho, porém será foco em estudos posteriores. Pela curva de crescimento celular (Figura 4.1), estima-se que a MOI foi igual ou superior a 5 pfu/mL, ou seja, a maioria da população celular (aproximadamente 100%) foi infectada no início do processo de infecção, onde o crescimento celular cessa após aproximadamente 24 h.p.i. (Palomares & Ramírez, 2009).

Para Pedrini, Wolff, Reid (2004) o uso do tratamento com tripsina também permitiu a obtenção de um processo de infecção utilizando ODV obtido a partir de aproximadamente 24 OB por célula. No entanto, o crescimento celular foi estabelecido aproximadamente 90 horas após a infecção, indicando que a maioria das células foram infectadas com uma multiplicidade de infecção inferior a 1, já que apenas uma parte da população celular foi infectada imediatamente após infecção (Volkman & Knudson, 1986). Quando existe um suprimento adequado de nutrientes, as células que não foram infectadas inicialmente continuam a se multiplicar-se até que estas sejam infectadas pela progênie viral produzidas pelas células infectadas inicialmente (Palomares & Ramírez, 2009).

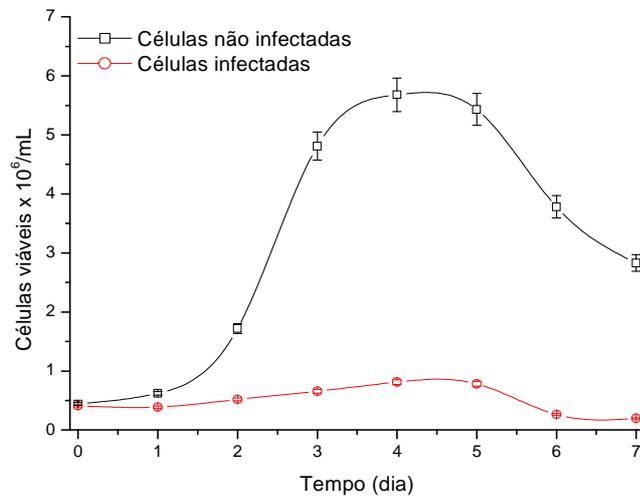


Figura 4.1. Curvas de crescimento das células não infectadas e infectadas com o ODV do baculovírus SfMNPV.

Analisando o processo de infecção de modo geral, no processo *in vivo* de infecção, os nucleocapsídeos que infectam as células são liberados dos corpos de oclusão (OB) em condições alcalinas, o que normalmente ocorre no trato digestivo do hospedeiro suscetível, facilitando a entrada do vírus nos tecidos do inseto (Paschke & Summers, 1975). As linhagens de células, normalmente, não são infectadas utilizando-se OB, pois os *virions* não são liberados em pH neutro do meio de cultura, e então, não estão disponíveis para infecção (Elam; Vail; Schreiber, 1990). Em contraste, é relativamente fácil estabelecer infecções *in vitro* com isolados virais em culturas de células utilizando-se vírus não oclusos (BV), derivados da hemolinfa de insetos infectados ou sobrenadante de células previamente infectadas (King & Possee, 1992). Em um estudo comparativo entre a infectividade de BV e ODV, Volkman; Summers; Hsieh (1976) estimaram que BV é em torno de 1700 a 1900 vezes mais infeccioso do que o ODV. Assim, o uso de BV é usualmente a primeira escolha para a propagação viral em cultura de células.

No entanto, é possível o uso de vírus derivados de oclusão (ODV) como fonte de *virions* infecciosos, desde que estes sejam liberados usando soluções alcalinas e tratados com

proteínases podendo melhorar este processo (Lynn, 1994). No trabalho desenvolvido pelo nosso grupo, Almeida (2005) obteve bons resultados utilizando ODV de SfMNPV e células Sf9. Portanto, neste estudo, a infecção preliminar também foi realizada utilizando como inóculo o ODV liberado a partir do OB do baculovírus selvagem SfMNPV produzido *in vivo*. Isso foi realizado para obtenção de BV para as demais infecções, uma vez que, como foi citado anteriormente, o BV é normalmente mais infectivo do que o ODV.

Lynn (1994) demonstrou que o tratamento do ODV com 90 µg/mL de tripsina por 2 horas resultou em melhorias significativas na capacidade do ODV para infectar as células em suspensão. No presente estudo, 530 µL de baculovírus, possuindo concentração de $1,88 \times 10^9$ OB/mL, foram utilizados para a liberação do ODV através de soluções alcalinas. Com este procedimento, foram utilizados aproximadamente 100 OB para infectar cada célula e o crescimento celular foi estabelecido 24 horas após infecção.

A Figura 4.2 mostra a produção volumétrica e específica dos OBs da infecção das células Sf21 infectadas pelo ODV obtido a partir do OB do baculovírus SfMNPV produzido *in vivo*.

Observou-se que a produção dos OBs apresentou o mesmo comportamento para a produção volumétrica e específica que foram acompanhadas diariamente até 10 dias do processo de infecção.

A produção de OB nos primeiros dias de infecção foi mais lenta, especificamente entre os dias 2 e 5 do processo de infecção, observado claramente na curva de produção viral (Figura 4.2). Este fenômeno pode ter ocorrido devido ao processo de infecção não ter alcançado o sincronismo necessário para a intensa produção viral. A Figura 4.1 mostra que as células infectadas conseguiram crescer lentamente até o quinto dia do processo de infecção e isto pode ter levado a baixa produção de OB observada neste período. A intensa produção de vírus extracelular constatada pelo declínio da concentração das células infectadas, após o quinto dia de infecção, proporcionou o aumento considerável na produção de OB observados nos dias subsequentes até o final do processo de infecção.

Ao final de 10 dias de infecção, a produção volumétrica e específica de OB foi em média de $(6,71 \pm 1,41) \times 10^7$ OB/mL e $92,28 \pm 19,38$ OB/Célula, respectivamente. Comparando os resultados obtidos, neste sistema, com alguns resultados na literatura, percebe-se um potencial da produção *in vitro* do isolado 18 do baculovírus SfMNPV utilizando o ODV como fonte viral em sistemas de cultivo livre de soro fetal. Almeida (2005) utilizando a linhagem Sf9 em meio Hyclone (HyQ SFX-InsectTM) suplementado com 5% (v/v) soro fetal bovino (SFB) obteve produção volumétrica de $(2,5 \pm 0,38) \times 10^8$ OB/mL e produção específica de $110 \pm 23,10$ OB/Célula. Neste trabalho, a produção específica ($92,28 \pm 19,38$ OB/Célula) foi próxima ao valor obtido no estudo citado mesmo utilizando a linhagem Sf21 e outro meio de cultura (SF900II SFM).

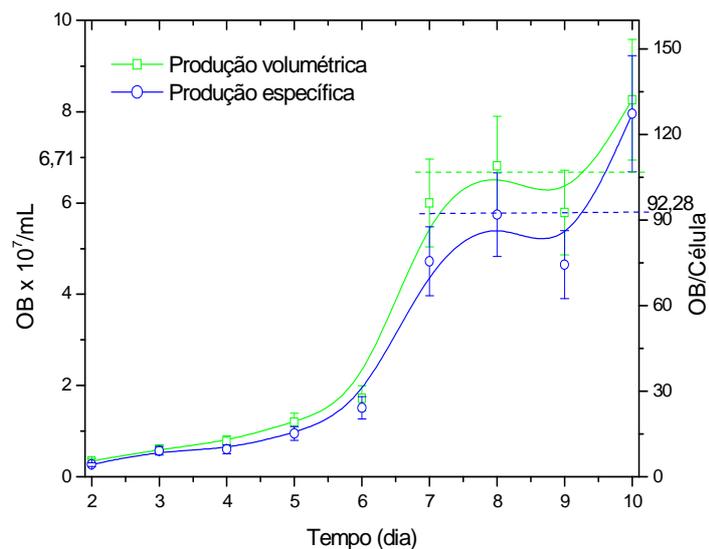


Figura 4.2. Curvas de produção volumétrica e específica de OB da infecção de células por SfMNPV.

A produção de baculovírus *in vitro* pode ser influenciada pela linhagem de células ou isolado viral utilizado. Primeiramente, o nível de produção de OB pode não ser o mesmo entre diferentes tipos de tecido de um mesmo hospedeiro, como também entre diferentes linhagens de células. Além disso, a escolha da linhagem pode influenciar a estabilidade do

vírus, já que certas linhagens podem induzir uma maior velocidade de mutação do vírus, devido, por exemplo, a maior variabilidade genética (Fraser et al., 1985). Pedrini; Wolff; Reid (2004), utilizando o isolado SL, linhagem celular Sf9 e meio de cultura SF900II, obtiveram uma rápida geração de vírus mutantes, mostrando que o sistema por eles utilizado foi menos estável. Isolados de SfMNPV foram identificados a partir de *S. frugiperda* coletadas em diversas regiões das Américas (Maruniak; Brown; Kundson, 1984; Berretta; Rios; De Cap, 1998; Escribano et al., 1999; Barreto et al., 2005). Estes isolados geográficos são frequentemente compostos de cepas que diferem em seus perfis de restrição enzimática e suas capacidades de infectar os seus hospedeiros.

4.2. Passagem seriada

Os sistemas de expressão tendo baculovírus como vetores (BEVS), os quais utilizam culturas de células de inseto, constituem uma tecnologia relativamente nova quando comparada aos sistemas de expressão em células de mamíferos. Seleção de linhagens adequadas de isolados virais, a otimização do processo para o aumento de escala da produção *in vitro*, além da formulação e caracterização do produto final são alguns dos elementos-chave, que devem ser pesquisados, para o sucesso da comercialização de inseticidas à base de baculovírus produzidos por processos fermentativos (Black et al., 1997).

Devido à instabilidade genética durante a passagem seriada de baculovirus em cultivo de células de inseto, o desenvolvimento da produção *in vitro* de bioinseticidas virais é o maior desafio para a produção massal deste bioproduto. Passagens sucessivas de vírus usando BVs leva ao aparecimento de formas aberrantes de vírus, processo conhecido como “efeito de passagem”. As principais características do fenótipo FP são a diminuição da produção de poliedros e o aumento da produção de vírus extracelulares, adquirindo uma vantagem seletiva durante o processo *in vitro* (Slavicek; Hayes-Plazolles; Kelly, 2001; Pedrini; Wolff; Reid, 2004; Pedrini, et al., 2005; Pedrini, et al., 2006a; 2006b). Como o produto desejado neste processo são os OBs, este fenômeno dificulta a produção de bioinseticidas utilizando os

cultivos celulares. A estabilidade da produção do baculovírus selvagem SfMNPV, isolado 18 foi verificada através da passagem seriada em cultivo de células Sf21.

A Figura 4.3 mostra as curvas de crescimento das células não infectadas e infectadas durante cinco passagens destas células. Na primeira passagem (P1), a suspensão de células Sf21 foi inoculada com 10% do BV do baculovírus SfMNPV obtido da infecção preliminar com o ODV (resultados mostrados no item 4.1). As demais passagens seguiram o mesmo procedimento e cada sobrenadante (vírus extracelular) servindo de inóculo para a passagem subsequente. Este vírus extracelular foi coletado após 3 ou 4 dias de infecção, tempo no qual houve um decréscimo na concentração celular devido à maior atividade viral durante o processo.

Constatou-se que na primeira passagem (P1) a concentração de vírus extracelular foi baixa devido ao crescimento das células infectadas. Apesar de ter sido observado indícios de infecção já nas primeiras horas, o processo de infecção foi estabelecido somente no terceiro dia, onde houve o declínio da concentração celular. Este fato pode ter ocorrido devido ao tipo de inóculo utilizado no processo, haja vista, que o BV utilizado nesta passagem foi obtido da infecção com o ODV. Sabendo que o ODV é menos infectivo (Volkman et al., 1976), o BV produzido a partir dele poderá conter menos partículas virais, ocasionando baixa infecção.

A concentração viral, nas passagens P2, P3 e P4, foi similar e maior que a indicada na P1, identificada pelo comportamento apresentado nas curvas de crescimento celular. A infecção das células foi observada logo no primeiro dia, onde a concentração das células infectadas foi menor que a concentração das células não infectadas. Já a passagem cinco (P5) demonstrou diminuição na concentração viral, visto pelo acentuado crescimento das células infectadas, isto ocorreu provavelmente devido à formação de mutantes gerados durante a passagem seriada. As curvas de crescimento das células Sf21 durante a passagem seriada estão dispostas nos Anexos de A a E.

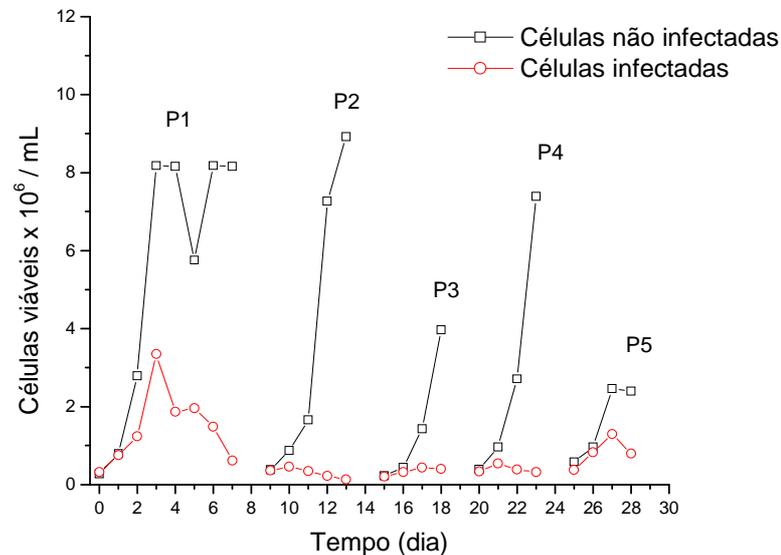


Figura 4.3. Passagem seriada em células Sf21.

Pedrini et al. (2006b) também utilizaram 10% (v/v) de inóculo viral para a realização da passagem seriada durante a produção do vírus *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus em células de *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae), ao invés de utilizar um volume pré-determinado estimado pela determinação da MOI, cujo valor varia entre 1 e 10 pfu/mL para este tipo de processo. Da mesma forma que o observado por Pedrini et al. (2006b), neste trabalho, as MOIs utilizadas foram suficientemente altas permitindo infecções sincrônicas, observando-se um crescimento pós infecção mínimo. Este método se apresentou mais prático, evitando problemas de contaminação e perda de virulência dos baculovírus durante o armazenamento dos inóculos virais, até que a determinação do título viral seja realizada.

A Figura 4.4 apresenta a produção específica de OB (OB/célula). Observou-se uma produção específica de 170 OB/célula na terceira passagem. Este resultado é superior quando comparado a outros sistemas como *Trichoplusia ni* NPV em células *T. ni* (Potter et al., 1976), os quais obtiveram 70 OB/célula e o sistema *Lymantria dispar* MNPV em células *Lymantria dispar* (Linnaeus., 1758) (Lepidoptera: Lymantriidae) (Slavicek et al, 1996), obtiveram 57

OB/célula. Mas, inferior quando comparado ao sistema estudado por Almeida (2005) que obteve 399 OB/célula e ao sistema *Helicoverpa armigera* SNPV em células de *Helicoverpa zea* com 222 OB/célula (Lua et al., 2002).

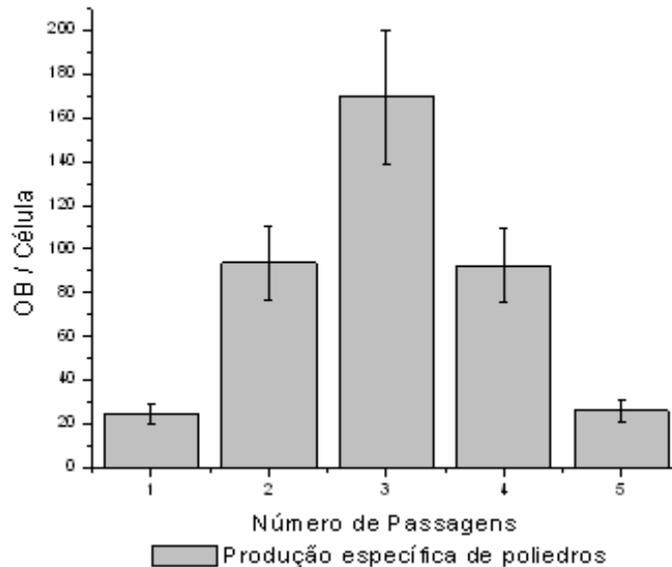


Figura 4.4. Produção específica de corpos de oclusão em células Sf21.

No sistema estudado, observou-se a indicação do efeito de passagem devido à redução na produção de OB de 170 para 92 da terceira para quarta passagem. Enquanto o sistema *Lymantria dispar* MNPV em células *Lymantria dispar* (citado anteriormente) os autores observaram redução de 57 para 35 OB/célula durante cinco passagens e Almeida (2005) em seu sistema observou redução de 399 a 109 OB/célula durante sete passagens.

Diante dos resultados obtidos durante a passagem seriada, constatou-se que houve declínio na quarta passagem. Como foi descrito anteriormente, este declínio é fator considerável na produção *in vitro* de bioinseticidas virais devido à instabilidade genética do vírus, que dificulta a ampliação da escala de produção (*scale up*).

4.3. Produção de OB após adição de hormônio e colesterol

Alguns estudos estão sendo realizados com intuito de aumentar a estabilidade durante as passagens sucessivas em células de inseto ou aumentar a produtividade durante a produção visando à produção de bioprodutos utilizando baculovirus como vetor. No caso do aumento da estabilidade, foram testados isolados purificados em placas (Pedrini et al., 2005, 2006a, 2000b, Rezende, 2008; Almeida, 2010). No que se refere ao aumento da produtividade, a adição de nutrientes ou substâncias que permitem o aumento da produção de bioprodutos, tais como proteínas recombinantes, em meios de cultivo também são comuns (Chan; Greenfield; Reid, 1998; Palomares & Ramirez, 2009).

Na Tabela 4.1, encontram-se os níveis das variáveis de entrada reais e codificadas. O nível 0 corresponde aos valores das concentrações de referência de hormônio e colesterol (4 μ g/mL e 20 μ g/mL, respectivamente), a partir destes valores houve uma variação para os níveis inferior (-1) e superior (+1) de duas unidades para a concentração de hormônio e de dez unidades para a concentração de colesterol.

Tabela 4.1. Níveis reais e codificados das variáveis de entrada

Variáveis	Nível	Nível	Nível
	-1	0	+1
C _{HORMÔNIO} (μ g/mL)	2	4	6
C _{COLESTEROL} (μ g/mL)	10	20	30

Na Tabela 4.2 encontra-se a matriz de planejamento com as respostas (produção volumétrica e produção específica de OB), as quais foram obtidas a partir dos experimentos realizados com as combinações dos níveis estudados.

Tabela 4.2. Matriz do planejamento fatorial 2² e dados experimentais

Ensaio s	C _H (µg mL ⁻¹)	C _C (µg mL ⁻¹)	Produção volumétrica (OB / mL)	Produção específica (OB / Célula)
1	-1	-1	5,95 x 10 ⁷	78,76
5	+1	-1	9,42 x 10 ⁷	128,35
6	-1	+1	4,65 x 10 ⁷	60,95
2	+1	+1	4,57 x 10 ⁷	56,12
3	0	0	7,23 x 10 ⁷	87,26
4	0	0	6,90 x 10 ⁷	82,67

Os coeficientes de variação explicada (R²) foram satisfatórios (92% e 99% para a produção volumétrica e produção específica, respectivamente) e a razão de F_{calculado} por F_{tabelado} está acima de 1, para um nível de confiança de 95%, indicando que o modelo é, estatisticamente significativo (Barros Neto; Scarminio; Bruns, 2007). Assim, o ajuste do modelo linear com 4 parâmetros (Anexo F), para a produção volumétrica e produção específica encontra-se descritos nas Equações 4 e 5.

$$\text{Produção específica} = 50,57167 + 19,2 C_H + 0,47 C_C - 0,68025 C_H C_C \quad (4)$$

$$\text{Produção volumétrica} = 42833333 + 13112500 C_H + 237500 C_C - 443750 C_H C_C \quad (5)$$

Onde C_H e C_C representam concentrações de hormônio e colesterol, respectivamente.

As Equações (4) e (5) representam os modelos empíricos codificados da regressão linear ajustados aos dados experimentais para a produção específica e produção volumétrica do baculovírus selvagem SfMNPV, respectivamente.

O modelo obtido pode não ser exatamente aquele que descreve a região estudada do sistema e, neste caso, não pode ser utilizado para fazer estimativas para deslocamento e muito menos para extrair conclusões sobre a região ótima. A maneira mais confiável de se avaliar a qualidade do ajuste do modelo é empregando a análise de variância (ANOVA) (Calado & Montgomery, 2003; Barros Neto; Scarminio; Bruns, 2007). Embora, neste estudo, o modelo representado pela análise de variância obtida pelo *Statistica Software*[®] (versão 7.0), não reproduziu a variação das respostas, tanto para a produção volumétrica como a específica (Anexos G e H), foram calculadas as novas análises de variância (ANOVA) para a produção específica e a produção volumétrica, mostradas nas Tabelas 4.3 e 4.4, respectivamente. Esta análise permite avaliar numericamente a qualidade de ajuste de um modelo (Barros Neto; Scarminio; Bruns, 2007).

Tabela 4.3. ANOVA calculada para a produção específica com o erro puro e a falta de ajuste.

FONTE DE VARIACÃO	SQ	GL	MQ	F_{CAL}	F_{TAB}	F_{CAL}/F_{TAB}
Regressão	3268,048	3	1089,35			
Resíduos	31,023	2	15,5115	70,2	19,16	3,66
Falta de ajuste	20,489	1	20,489			
Erro puro	10,534	1	10,534	1,94	161,4	0,01
Total	3299,071	5	659,8			

Tabela 4.4 ANOVA calculada para a produção volumétrica com o erro puro e a falta de ajuste.

FONTE DE VARIÇÃO	SQ	G L	MQ	F_{CAL}	F_{TAB}	F_{CAL}/F_{TAB}
Regressão	$1,55 \times 10^{15}$	3	$5,16 \times 10^{14}$			
Resíduos	1,076	2	0,54	$9,55 \times 10^{14}$	19,16	$4,98 \times 10^{13}$
Falta de ajuste	$5,445 \times 10^{12}$	1	$5,445 \times 10^{12}$			
Erro puro	$5,4450 \times 10^{12}$	1	$5,4450 \times 10^{12}$	1	161,4	0,0062
Total	$1,66561 \times 10^{15}$	5	$3,3312 \times 10^{14}$			

Utilizando o programa computacional *Statistica Software*[®] (versão 7.0), foi possível construir as superfícies de resposta (MSR) e o diagrama de Pareto. A superfície de resposta permite analisar as faixas ótimas de operação das variáveis de entrada que maximizam as respostas em estudo. A metodologia de superfície de resposta (MSR) baseia-se na construção de modelos matemáticos empíricos que geralmente empregam funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, dão condições de explorar (modelar e deslocar) o sistema até sua otimização (Calado & Montgomery, 2003). A superfície de resposta para o sistema estudado neste trabalho está representada nas Figuras 4.5 e 4.6.

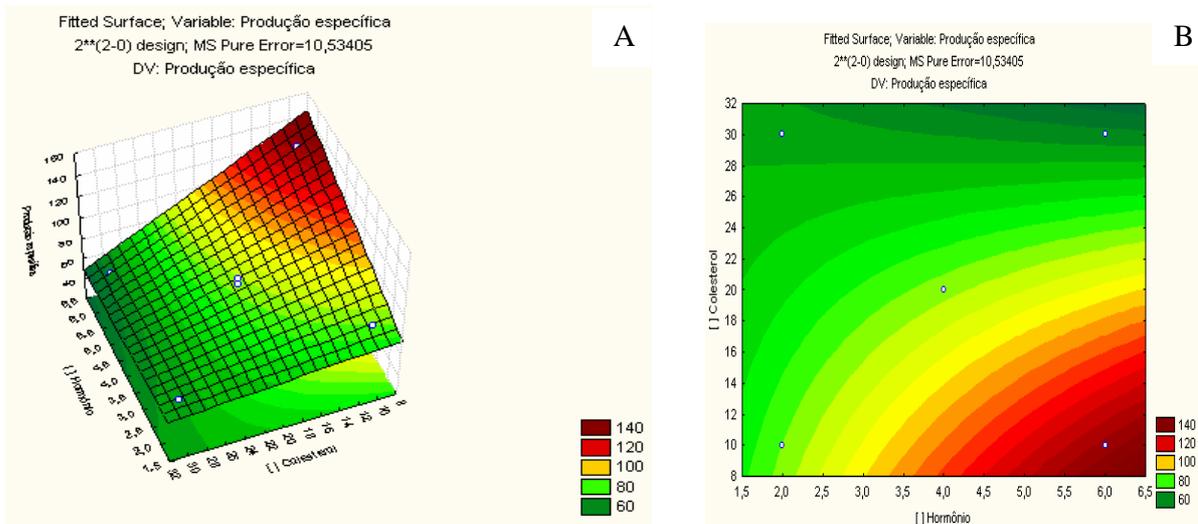


Figura 4.5. Superfície de resposta (A) e a curva de nível (B) para a produção específica.

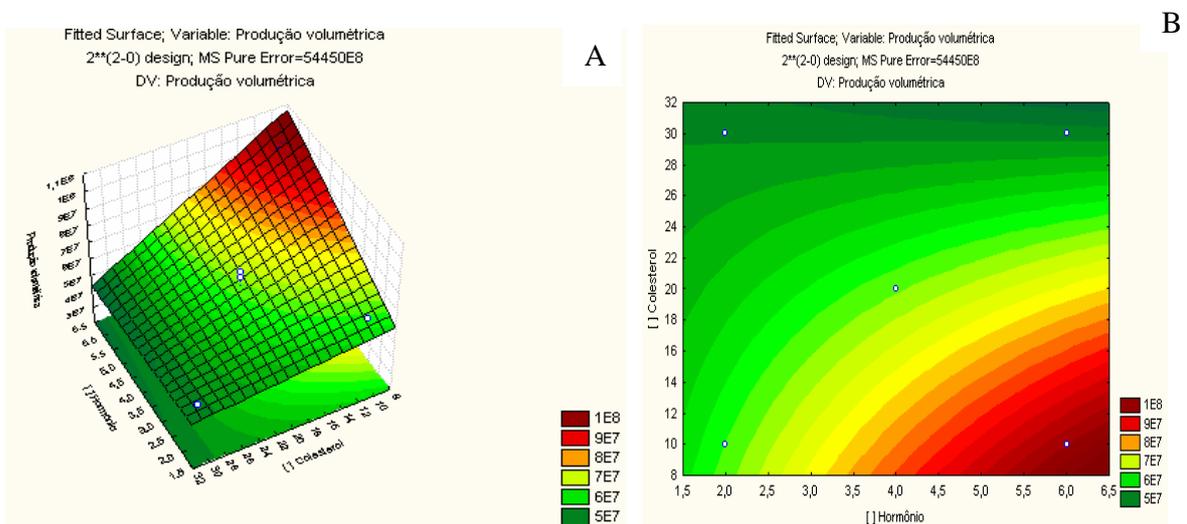
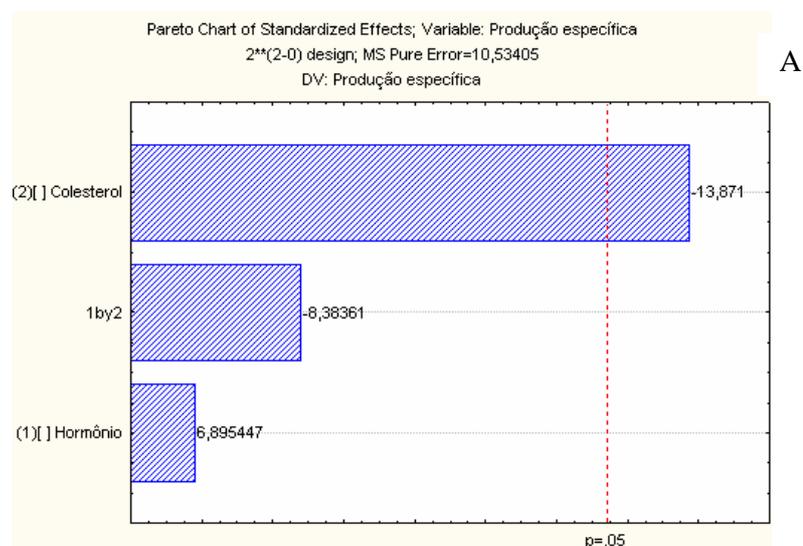


Figura 4.6 Superfície de resposta (A) e a curva de nível (B) para a produção volumétrica.

A adição de colesterol foi testada com intuito de otimizar a produção *in vitro* de baculovírus em culturas em suspensão de células Sf21 (Linhagem de células de *Spodoptera frugiperda*, clone21), pois em um estudo realizado por Belloncik; Akoury; Cheroutre (1997) demonstraram que a adição de 20µg/mL de colesterol ao meio de cultivo permitiu corrigir irregularidades morfológicas nas membranas dos poliedros formados e dos *virions* oclusos nestes OBs observadas na replicação do *Galleria mellonella* nucleopoliedrovirus (GmNPV). Além disso, suplementação lipídica tem como objetivos estimular o crescimento de células para obtenção de uma elevada densidade celular e permitir a replicação de baculovírus (Wilkie et al., 1980). Analisando as superfícies de resposta e as curvas de níveis (Figuras 4.5 e 4.6), observou-se a existência de uma região ótima para a produção de OB onde se encontra uma faixa de concentração de colesterol (8 a 10µg/mL), ou seja, inferior à utilizada por Belloncik; Akoury; Cheroutre (1997) e concentração de hormônio (5 a 6,5µg/mL), bem representados na região vermelha da superfície de resposta. No caso do hormônio, a faixa ideal foi maior que a utilizada por Chan et. al (2002) e Sarvari et al. (1990) que conseguiram aumentar a produção de proteínas recombinantes utilizando baculovirus como vetor de expressão, com 4µg/mL e 2µg/mL, respectivamente.

A Figura 4.7 mostra o diagrama de Pareto para a produção específica (A) e produção volumétrica (B) de OB.



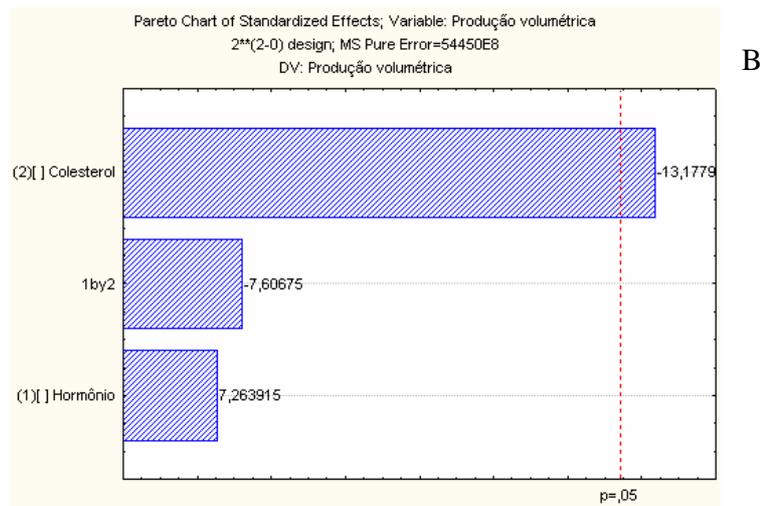


Figura 4.7. Diagrama de Pareto para a produção específica (A) e volumétrica (B).

De acordo com o diagrama de Pareto (Figura 4.7), observou-se que o colesterol teve, na verdade, uma influência negativa significativa nos resultados de produção volumétrica e específica de OB. Isto é evidente pelo sinal negativo mostrado no diagrama. Também houve uma influência negativa a interação do hormônio e do colesterol. Já a adição do 20-hidroxiecdisona (20HE) foi positiva, porém significativa. No entanto, a morfologia das células infectadas observadas por microscopia ótica demonstra um processo infectivo eficiente, com células com evidente produção de OBs, para todas as concentrações de 20HE e colesterol testadas.

A Figura 4.8 apresenta a produção de OB após a adição de colesterol e hormônio na quarta passagem. Independente dos resultados do diagrama de Pareto, os resultados demonstraram um aumento de 1,3 em relação ao resultado sem adição de hormônio e colesterol, quando 6µg de 20HE e 10µg de colesterol foram adicionados por mL de meio de cultivo. Estes estão de acordo com o modelo obtido representados pelas equações 4 e 5, como também o de superfície de resposta (Figuras 4.5 e 4.6), o qual indica melhores resultados entre a faixa de concentração de colesterol de 8 a 10µg/mL e concentração de hormônio entre 5 a 6,5µg/mL.

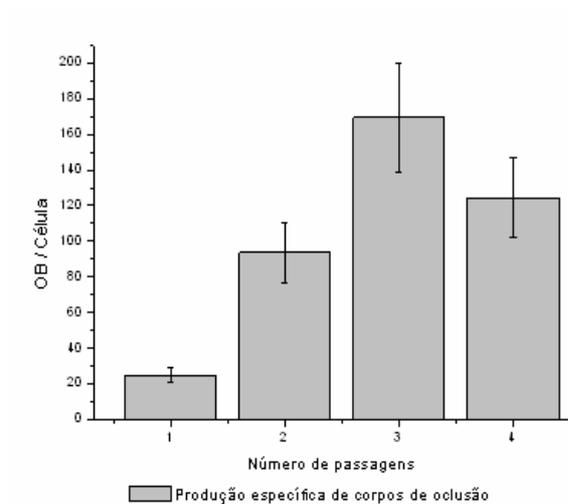


Figura 4.8. Produção específica de OBs após adição de colesterol e hormônio na quarta passagem.

4.3.2. Adição individual de hormônio e colesterol

Diante dos resultados obtidos no planejamento, a maior produção de OB foi atingida com a menor concentração de colesterol (10 $\mu\text{g/mL}$) e maior concentração de 20HE (6 $\mu\text{g/mL}$). Assim, realizaram-se experimentos com estas concentrações individuais para análise da produção de OB de forma independentemente.

A Figura 4.9 mostra as curvas de crescimento das células não infectadas e infectadas quando 6 $\mu\text{g/mL}$ de 20HE foi adicionada ao meio de cultivo. Observou-se, que as células não infectadas e infectadas apresentaram diferenciação quanto ao crescimento, já no primeiro dia de infecção, indicando o estabelecimento da mesma. O hormônio favoreceu a infecção devido ao baixo crescimento celular observado, onde a concentração máxima das células infectadas foi de $9,31 \times 10^5$ células viáveis/mL.

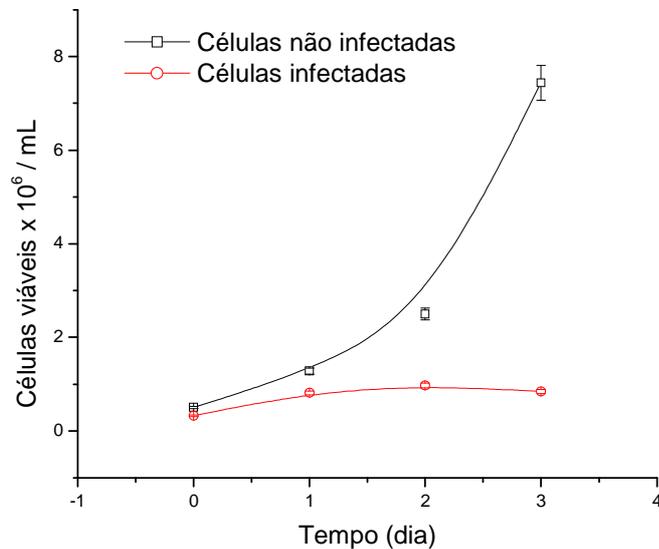


Figura 4.9. Curvas de crescimento das células não infectadas e infectadas com meio de cultivo adicionado 6 μ g/mL de 20-Hidroxicidisona.

A Figura 4.10 mostra as curvas de crescimento das células não infectadas e infectadas quando 10 μ g/mL de colesterol foi adicionado ao meio de cultivo. Observou-se, que as células não infectadas e infectadas apresentaram diferenciação quanto ao crescimento, indicando o estabelecimento da infecção. Porém, houve um crescimento maior de células infectadas. Um maior número de células representa mais células infectadas ao final do processo, o qual pode afetar a concentração volumétrica, quando comparado ao produto obtido com infecções onde o crescimento é mínimo. Todavia, o comportamento encontrado para praticamente todos os processos infectivos testados neste trabalho, foi de diferenciação das células infectadas e não infectadas já nos primeiros dias de infecção. Este fato demonstra a boa capacidade de infecção do isolado 18 do SfMNPV (Barreto et al., 2005) às células Sf21.

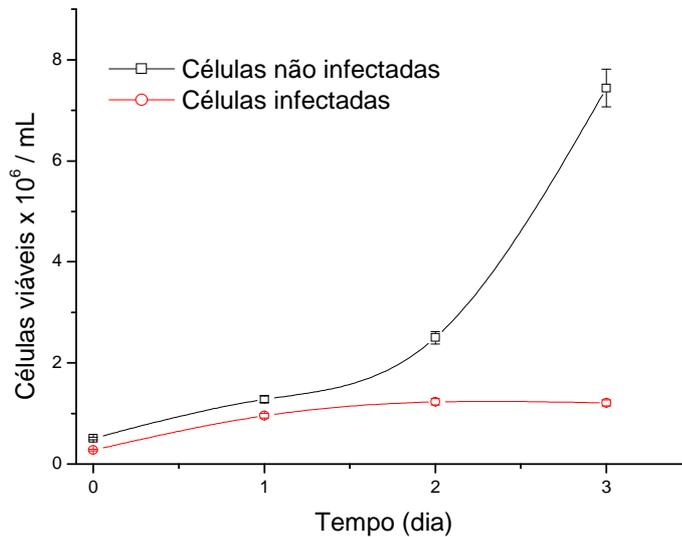


Figura 4. 10. Curvas de crescimento das células não infectadas e infectadas com meio de cultivo adicionado com 10 μ g/mL de colesterol.

Observando os resultados obtidos em relação à produção volumétrica (OB/mL) e específica (OB/célula) de OBs (Figuras 4.11 e 4.12), a influência somente do hormônio foi superior ao do melhor resultado do planejamento experimental realizado com adição de 20HE e colesterol. Enquanto que o melhor resultado do planejamento (ensaio 5) obteve uma produção volumétrica de $9,4 \times 10^7$ OB/mL e específica de 128,4 OB/célula, com a adição de somente 6 μ g/mL de 20-Hidroxiecdisona estas concentrações aumentaram para $1,83 \times 10^8$ OB/mL e 154,8 OB/célula, respectivamente. Estes resultados confirmam que o hormônio influi positivamente no aumento da produção de OB e, devido à ausência de colesterol, os resultados foram ainda superiores quando a mesma concentração de hormônio foi utilizada.

Observando ainda nas Figuras 4.11 e 4.12, os resultados obtidos em relação à adição somente de colesterol, na menor concentração estudada (10 μ g/mL), confirmam a sua influência negativa ao processo de produção de OB. Enquanto que o resultado da produção sem adição do colesterol (realizado durante a passagem seriada) obteve uma produção específica de 99 OB/célula, esta concentração diminuiu para 60 OB/célula (Figura 4.11).

Todavia, a produção volumétrica passou de $5,7 \times 10^7$ OB/mL para $1,33 \times 10^8$ OB/mL, na passagem seriada e com a adição de somente $10\mu\text{g/mL}$ de colesterol, respectivamente. A maior concentração volumétrica foi devido, provavelmente, a maior concentração de células (Figura 4.12).

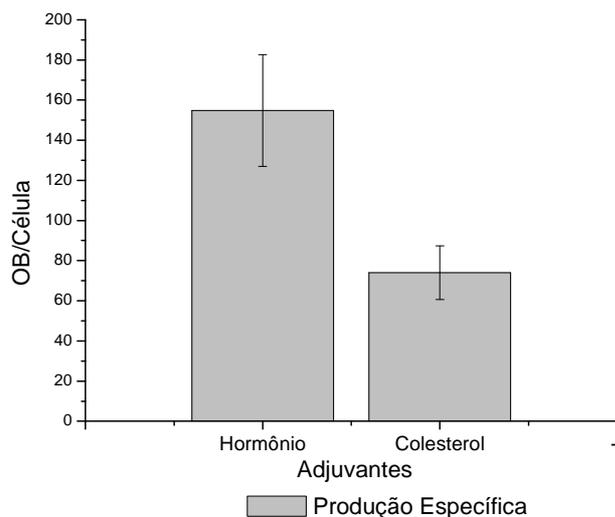


Figura 4.11. Produção específica de OB com adição de adjuvantes

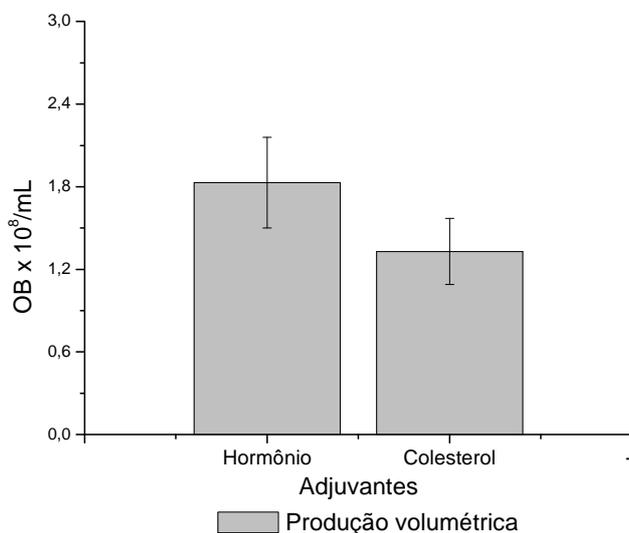


Figura 4.12. Produção volumétrica de OB com a adição de adjuvantes.

Estes resultados foram confirmados através da análise de variância (ANOVA), onde foram observadas que as médias são significativamente diferentes, com nível de confiança de 95%, entre os resultados de produção volumétrica (OB/mL) e produção específica (OB/célula) de OB da passagem seriada, do planejamento experimental, da adição somente de hormônio e da adição somente de colesterol. A análise de variância da produção volumétrica e da produção específica está mostrada nas Tabelas 4.5 e 4.6 respectivamente.

Tabela 4.5. Resultado da ANOVA para a produção volumétrica de OB

Experimentos	Média	Variância	N
Passagem Seriada	$5,34667 \times 10^7$	$6,85033 \times 10^{13}$	3
Planejamento Experimental	$9,43 \times 10^7$	$9,643 \times 10^{13}$	3
Adição de Hormônio	$1,83333 \times 10^8$	$3,82333 \times 10^{14}$	3
Adição de Colesterol	$1,33 \times 10^8$	$3,07 \times 10^{14}$	3
$F_1 = 43,097$		$F_2 = 2,77026 \times 10^{-5}$	
As médias são significativamente diferentes com 95% de nível de confiança			

Tabela 4.6. Resultado da ANOVA para a produção específica de OB.

Experimentos	Média	Variância	N
Passagem Seriada	92,46333	205,12903	3
Planejamento Experimental	122,84667	161,49843	3
Adição de Hormônio	154,79667	286,07743	3
Adição de Colesterol	73,97667	77,27303	3
$F_1 = 20,67364$		$F_2 = 3,9968 \times 10^{-4}$	
As médias são significativamente diferentes com 95% de nível de confiança			

Com base nos resultados obtidos dos experimentos referentes à passagem seriada, ao planejamento experimental, à adição somente de hormônio e à adição somente de colesterol foram plotados os gráficos da produção específica e produção volumétrica de OB durante os processos de infecção, (Figuras 4.13 e 4.14 respectivamente).

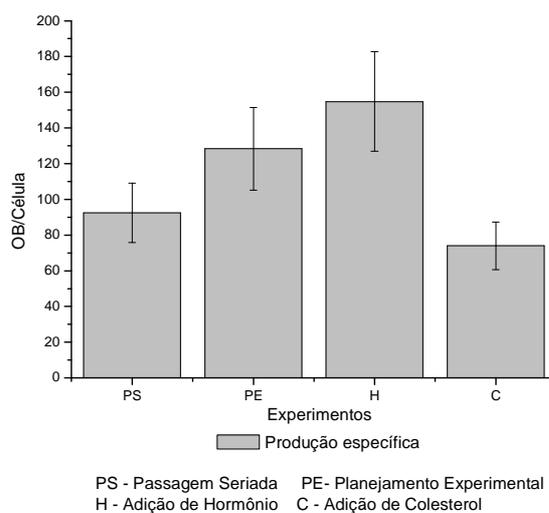


Figura 4.13. Produção específica de OB dos diferentes experimentos.

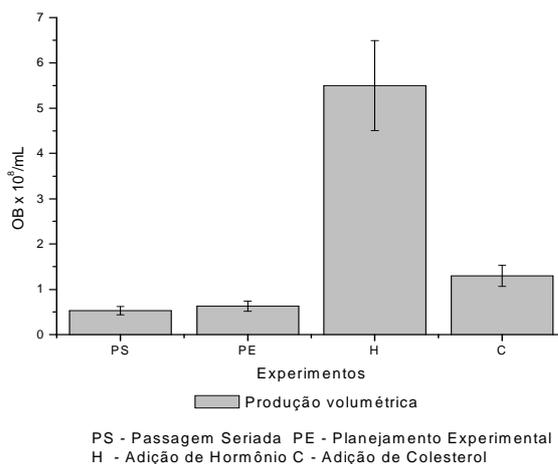


Figura 4.14. Produção volumétrica de OB dos diferentes experimentos.

Observou-se que a produção específica de OB foi diferente em todos os experimentos, (Tabela 4.6). A maior produção específica foi observada quando adicionado somente hormônio 20HE ao meio de cultivo atingindo produção de 154,8 OB/Célula. A produção volumétrica com adição somente de 20HE também foi maior do que os demais experimentos realizados ($1,83 \times 10^8$ OB/mL), indicando a melhor estratégia para o aumento de produção de OB, minimizando, assim, o efeito passagem durante a passagem seriada, favorecendo uma futura ampliação de escala de produção do bioinseticida *spodoptera*.

Capítulo 5

Conclusão

5. Conclusão

A infecção inicial realizada com o ODV do SfMNPV foi satisfatória. Após 10 dias de infecção, obteve-se uma produção de $6,71 \times 10^7$ OB/mL e 92,28 OB/célula. Este resultado mostra a viabilidade de produção dos OB utilizando o sistema de cultivo *in vitro* do bioinseticida *spodoptera* (isolado 18), podendo também ser utilizado como base para novos cultivos de células de inseto.

Observou-se que, através do sistema utilizado neste estudo, o hormônio 20HE influencia positivamente e o colesterol negativamente nas concentrações estudadas (2 a 6 $\mu\text{g/mL}$ e 10 a 30 $\mu\text{g/mL}$ para o hormônio e colesterol, respectivamente) na produção de corpos de oclusão (OB). Com o planejamento experimental fatorial 2^2 foi possível um aumento de 92 para 128 OB/célula mostrando que é possível diminuir o efeito do acúmulo de mutantes FP que tem como principal característica o rápido declínio na produção de corpos de oclusão. Observou-se a existência de uma região ótima para a produção de OB onde se encontra uma faixa de concentração de colesterol (8 a 10 $\mu\text{g/mL}$), e concentração de hormônio (5 a 6,5 $\mu\text{g/mL}$), bem representados na região vermelha nos gráficos de superfície de resposta.

Um aumento ainda mais expressivo foi obtido quando somente o hormônio 20HE foi adicionado (6 $\mu\text{g/mL}$) obtendo-se uma produção de $1,9 \times 10^8$ OB/mL e 182,9 OB/célula, para a produção volumétrica e específica de OB, respectivamente, confirmando a influência positiva da adição de hormônio.

Referências
bibliográficas

Referências bibliográficas

ADAMCZYK, J. J.; HOLLOWAY, J. W.; LEONARD, B. R.; GRAVES, J. B. Susceptibility of fall armyworm collected from different plant hosts to selected insecticides and transgenic Bt cotton. **Journal of Cotton Science**, Bossier, v. 1, p. 21-28, 1997.

AGUDELO, F.; ROMANO, M.; WASSINK, H.; UZCATEGUI, R. C. Una poliedrosis de *Spodoptera frugiperda* en Venezuela. *Turrialba*, v.33, n.3, p.219-222, 1983.

ALMEIDA, A. F. *Avaliação preliminar da viabilidade de produção in vitro de um isolado brasileiro de baculovírus Spodoptera frugiperda MNPV*. 2005. 110f. Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

ALMEIDA, A. F. *Estratégias de Produção in vitro de Bioinseticida Viral: Influências do Isolado, da Cinética e do Modo de Operação*. 2010. 133f. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. Brasil.

ALMEIDA, A. F.; MACEDO, G. R.; CHAN, L. C. L.; PEDRINI, M. R. S. Kinetic Analysis of *in vitro* Production of Wild-Type *Spodoptera frugiperda* Nucleopolyhedrovirus, **Brazilian Archives Biotechnology and Technology**, v. 53, p. 285-291, 2010.

ALVES, S. B.; ZUCCHI, R. A.; VENDRAMIM, J. D. Pragas do milho, arroz, trigo e sorgo. In: CURSO de entomologia aplicada à agricultura. Piracicaba: FEALQ, p. 273-310, 1992.

AUGUSTO, E. F. P.; BARRAL, M. F.; PICCOLI, R. A. M. Modelos de crescimento e formação de produtos no cultivo de células animais. In: Moraes, A. M.; Augusto, E. F. P.;

Castilho, L. R. *Tecnologia do Cultivo de Células Animais de Biofármacos a Terapia Gênica*. São Paulo: Roca, 2007, p.170-215.

BARRETO, M. R.; GUIMARÃES, C. T.; TEIXEIRA, F. F.; PAIVA, E.; VALICENTE, F. H. Effect of baculovirus *spodoptera* isolates in *spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepdoptera: Noctuidae) larvae and their characterization by RAPD. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 1, p. 067-075, 2005.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 3ª edição. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2007.

BEAMES, B.; SUMMERS, M. D. Location and nucleotide sequence of the 25K protein missing from baculovirus few polyhedra (FP) mutants. **Virology**, San Diego, CA, v. 168, p. 344-353, 1989.

BEAMES, B.; SUMMERS; M. D. Comparisons of host cell DNA insertions and altered transcription at the site of insertions in few polyhedra baculovirus mutants. **Virology**, San Diego, CA, v. 162, p. 206-220, 1988.

BELLONCIK, S. A.; AKOURY, W. E.; CHEROUTRE, M. Importance of cholesterol for nuclear polyhedrosis virus (NPV) replication in cell cultures adapted to serum-free medium. **Virology Research Center**, p. 141, 1997.

BERRETTA, M. F; RIOS, M. L; DE CAP, A. S. Characterization of a nuclear polyhedrosis virus of *Spodoptera frugiperda* from Argentina. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.71, p. 280-282, 1998.

BERTELS, A. Estudos da umidade sobre a dinâmica de flutuação de lepidópteros, pragas do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 5, n. 1, p. 67-79, 1970.

BILIMORIA, S. L. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. In: KURSTAK, E. (Ed.). **Viruses of invertebrates**. New York: Marcel Dekker, p.1-72, 1991.

BISCHOFF, D.; SLAVICEK, J. M. Phenotypic and genetic analysis of *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus few polyhedral mutants: mutations in the 25K FP gene may be caused by DNA replication errors. **Journal of Virology**, v. 71, n.2, p. 1097-1106, 1997.

BLACK, B. C.; BRENNAN, L. A.; DIERKS, P. M.; GARD, I. E. Commercialization of baculoviral insecticides. Em: *The Baculoviruses*, p. 341-387. Editado por L. K. Miller. New York: Plenum Press, 1997.

BLISSARD, G. W. Baculovirus - insect cell interactions. **Cytotechnology**, v.20, p.73-93, 1996.

BUSATO, G. R.; GRÜTZMACHER, A. D.; GARCIA, M. S.; GIOLO, F. P.; MARTINS, A. F. Consumo e utilização de alimento por *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) originária de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, das culturas do milho e do arroz irrigado. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 4, p. 525-529, 2002.

BUSATO, G. R.; GRÜTZMACHER, A. D.; OLIVEIRA, A. C.; ZIMMER, P. D.; KOPP, M. M.; VIEIRA, E. A.; MALONE, G. Caracterização genética de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) provenientes das culturas do arroz irrigado e milho no Rio Grande do Sul através da técnica de AFLP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 3.; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 25., 2003, Balneário Camburiú, SC. **Anais**. Itajaí: EPAGRI, 2003, p. 377-379.

BUSATO, G. R.; GRÜTZMACHER, A. D.; OLIVEIRA, A. C.; VIEIRA, E. A.; ZIMMER, P. D.; KOPP, M. M.; BANDEIRA, J. M.; RODRIGUES, T. R. Análise da estrutura e diversidade molecular de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera:

Noctuidae) associadas ao milho e arroz no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, Vacaria, v. 33, n. 6, p. 709-716, 2004.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. Planejamento de experimentos usando o *Statistica*. Rio de Janeiro: E-Papers Serviços Editoriais, 2003.

CARINHAS, N.; BERNAL, V.; YOKOMIZO, A. Y.; CARRONDO, M. J. T.; OLIVEIRA, R.; ALVES, P. M. Baculovirus production for gene therapy: the role of cell density, multiplicity of infection and medium exchange. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.81, p. 1041-1049, 2009.

CASTRO, M. E. B.; SOUZA, M. L.; BILIMORIA, S. L. Host-specific transcription of nucleopolyhedrovirus gene homologues in productive and abortive *Anticarsia gemmatilis* MNPV infections. **Arch Virol**, v. 144, n.6, p. 1111-1121, 1999.

CASTRO, M. E. B.; RIBEIRO, Z. M. A.; SOUZA, M. L. Infectivity of *Anticarsia gemmatilis* nucleopolyhedrovirus to different insect cell lines: Morphology, viral production, and protein synthesis. **Biological Control**, v. 36, p.299-304, 2006.

CHAKRABORTY, S.; REID, S. Serial passage of a *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus in *Helicoverpa zea* cell cultures. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.73, n.3, p.303-308, 1999.

CHAN, L. C. L.; GREENFIELD, P. F.; REID, S. Optimising fed-batch production of recombinant proteins using the baculovirus expression vector system, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 59, n.2, p. 178-188, 1998.

CHAN, L. C. L.; YOUNG, P. R.; BLETCHLY, C.; REID, S. Production of the baculovirus-expressed dengue virus glycoprotein NS1 can be improved dramatically with optimised regimes for fed-batch cultures and the addition of the insect moulting hormone, 20-Hydroxyecdysone. **Journal of Virology Methods**, v. 105, p. 87-98, 2002.

CHAPMAN, R. F. *The insect structure and function*. New York: American Elsevier Publishing Company, p.132-141, 1998.

CHEN, X.; IJKEL, W. F. J.; TARCHINI, R. The sequence of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome. **Journal Gen. Virol.** V. 82, p. 241–257, 2001.

CHERNOMORDIK, L.; LEIKINA, E.; CHO, M. S.; ZIMMERBERG, J. Control of baculovirus gp64-induced syncytium formation by membrane lipid composition. **Journal of Virology**, v.69, p.3049-3058, 1995.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) *Acompanhamento de safra brasileira: grãos, sexto levantamento*, 42 p, março/2010 – Brasília. 2010. http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/4graos_07.01.10.pdf. Acesso em 30.06.10.

CRUZ, I. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa CNPMS, 1995. 45p.

CRUZ, I.; MONTEIRO, M. A. R. Controle Biológico da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, utilizando o parasitóide de ovos, *Trichogramma pretiosum*. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 2004. 4 p . (**Comunicado Técnico**, 98).

DINAN, L. Phytoecdysteroids: biological aspects. **Phytochemistry**, v. 57, p.325-339, 2001.

ELAM, P.; VAIL, P. V.; SCHREIBER, F. Infectivity of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus extracted with digestive fluids of *Heliothis zea*, *Estigmene acrea*, and carbonate solutions, **J. Invertebr. Pathol.** 55: p. 278-283, 1990.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Cultivo do milho**. 3^a ed. Sete Lagoas: EMBRAPA, CNPMS, 2007 (Sistemas de Produção, 2). Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/index.htm>>. Acesso em 17 maio 2010.

ESCRIBANO, A.; WILLIAMS, T.; GOULSON, D.; CAVE, R. D.; CHAPMAN, J. W.; CABALLERO, P. Selection of a nucleopolyhedrovirus for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): structural, genetic, and biological comparison of four isolates from the Americas. **Journal of Economic Entomology**, v. 92, p. 1079-1085, 1999.

FEDERICI, B. A. A Perspective on Pathogens as Biological Control Agents for Insect Pests. In **Handbook of Biological Control**; Fisher et al (eds.); Academic Press: San Diego, CA, p. 517–550. 1999.

FILLIPOVA, V. N.; ZORINYANTS, S. E.; VOLONDINA, S. O.; SMOLENSKAYA, I. N. Cell cultures of ecdysteroid-containing *Ajuda reptans* and *Serratula coronata* plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.50, p.501-508, 2003.

FRANCKI, R. I. B; FAUQUET, C. M; KNUDSON, D. L; BROWN, F. Classification and nomenclature of viruses: fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. **Arch. Virol.** v. 2, p. 117–23, 1991.

FRASER, M. J.; BRUSCA, J. S.; SMITH, G. E.; SUMMERS, M. D. Transposon-mediated mutagenesis of a baculovirus, **Arch Virol.** v. 145 p. 356-361, 1985.

FRASER, M. J.; SMITH, G. E.; SUMMERS, M. D. Acquisition of host cell DNA sequences by baculoviruses: relationship between host DNA insertions and FP mutants of *Autographa californica* and *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Virology**, Washington, D C, v. 47, p. 287-300, 1983.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTIFILHO, E.; 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.

GASSEN, D. N. Manejo de pragas associadas à cultura do milho. Passo Fundo - RS. Aldeia Norte, 1996.

GERK, A. O.; KITAJIMA, E. W.; SOUZA, M. L. Identificação e caracterização de isolado brasileiro do vírus de poliedrose nuclear da lagarta do cartucho do milho. **An. Soc. Entomol. Brasil**, v.26, n.3, p.507-515, 1997.

GOTOH, T.; AWA, H.; KIKUCHI, K. I; TAKAHASSHI, S. Expression and in situ processing of human prorenin to active rennin in baculovirus-infected Sf-9 insect cell cultures under several infective conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, p.216-220, 2009.

GRIFFITHS, J. B. **Scale-up of suspension cells and anchorage-dependent cells**. Methods in Molecular Biology, v. 5, p.49-63, Humana Press, CLIFTON, N. J.; POLLARD J. W.; WALKER, J. M. (eds). 1990.

GRÜTZMACHER, A. D.; MARTINS, J. F. da S.; CUNHA, U. S. da. Insetos-pragas das culturas do milho e sorgo no agroecossistema de várzea. In: PARFITT, J. M. B. Produção de milho e sorgo em várzea. Pelotas, EMBRAPA Clima Temperado, 2000. p. 87-102.

HARRISON, R. L.; SUMMERS, M. D. Mutations in the *Autographa californica* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus 25 kDa protein gene result in reduced virion occlusion, altered intranuclear envelopment and enhanced virus production. **Journal of General Virology** 76, 1451±1459. 1995.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: Schmidell, W. et al. **Biociologia Industrial**, São Paulo: Edgard Blücher. v. 2, p. 93-122, 2001.

HORTON, H. M.; BURAND, J. P. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. **Journal of Virology**. 67: 1860-1868, 1993.

JEHLE, J. A.; BLISSARD, G. W.; BONNING, B. C.; CORY, J. S.; HERNIOU, E. A.; ROHRMANN, G. F.; THEILMANN, D. A.; THEIM, S. M.; VLAK, J. M. On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. **The Arch. Virol.**, v. 151, p. 1257-1266, 2006.

KARIM, F. D.; THUMMEL, C. S. Temporal coordination of regulatory gene expression by the steroid hormone ecdysone. **EMBO J.**, v. 11, P. 4083-4093, 1992.

KING, L. A.; POSSEE, R. D. *The baculovirus expression system: a laboratory guide* London; New York: Chapman & Hall, p. xiv, 229 p, 1992.

KNIPLING, E. F. Regional management of the fall armyworm – a realistic approach? **Florida Entomologist**, Ottawa, v. 63, n. 4, p. 468-480, 1980.

KNUDSON, D. L.; HARRAP, K. Replication of a nuclear polyhedrosis virus in a continuous cell culture of *Spodoptera frugiperda*: microscopy study of the sequence of events of the virus infection. **Journal of Virology**, v.17, p.254-268, 1976.

KOGAN. M. Integrate pest management historical, perspectives and contemporary developments. **Annual Review Entomology**. v. 43, p. 243- 270, 1998.

KRELL, P. Passage effect of virus infection in insect cells. **Cytotechnology**, v. 20, 125–137, 1996.

LUA, L. H. Challenges posed by *in vitro* production of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus biopesticide. Brisbane – Australia: The University of Queensland, 2000.

LUA, L. H. L.; PEDRINI, M. R. S.; REID, S.; ROBERTSON, A.; TRIBE, D. E. Phenotypic and genotypic analysis of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus serially passaged in cell culture. **Journal General Virology**, v.83, n.4, p.945-955, 2002.

LYNN, D. E. Enhanced infectivity of occluded virions of *Gypsy Moth* nuclear polyhedrosis virus for cell cultures. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.63, p.268-274, 1994.

LYNN, D. E.; FELDLAUFER, M. F.; LUSBY, W. R. Isolation and identification of 20-hydroxyecdysone from a Lepidopteran continuous cell line. *Archive Insect Biochemistry and Physiology* 5: 71-79. 1987.

MARHEINEKE, K.; GRÜNEWALD, S.; CHRISTIE, W.; REILÄNDER, H. Lipid composition of *Spodoptera frugiperda* (Sf9) and *Trichoplusia ni* (Tn) insect cells used for baculovirus infection. **FEBS Letters** 441, 1998.

MARTINEZ, S. S.; VAM EMDEN, H. F. Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera frugiperda* (Boisduval) (Lepdoptera: Noctuidae) caused by Azadirachtin. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 1, p. 113-125, 2001.

MARUNIAK, J. E.; BROWN, S. E.; KUNDSON, D. L. Physical maps of SfMNPV baculovirus DNA and its genomic variants. **Virology**, v. 136, p. 221-234, 1984.

MEGHROUS, J.; MAHMOUND, W.; JACOB, D.; RICK, C.; COX, M.; KAMEN, A. A. Development of a simple and high-yielding fed-batch process for the production of influenza vaccines. **Vaccine**, v.28, p.309-316, 2010.

MILLER, L. K. Introduction to the baculoviruses. In: *The Baculoviruses* .Ed. 1-6, 1997.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, v. 44, p.257-289, 1999.

MOSCARDI, F.; SOUZA, M. L. Baculovírus para o controle de pragas: Panacéia ou realidade? **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 24, 22-29, 2002.

MURHAMMER, D. W. Use of viral insecticides for pest control and production in cell culture. **Appl. Biochem. Biotechnol**, v. 59(2), p. 199–220, 1996.

NIELSEN, L. K.; SMYTH, G. K.; GREENFIELD, P. F. Hemocytometer cell count distributions: implications of non-poisson behaviour. **Biotechnology Progress**, v.7, p.560-563, 1991.

OKONKOWSKI, J.; BALASUBRAMANIAN, U.; SEAMANS, C.; FRIES, S.; ZHANG, J.; SALMON, P.; ROBINSON, D.; CHARTRAIN, M. Cholesterol Delivery to NS0 Cells: Challenges and Solutions in Disposable Linear Low-Density Polyethylene-Based Bioreactors. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, vol. 103, n. 1, p. 50–59. 2007.

O'REILLY, D. R.; HAILS, R. S.; KELLY, T. J. The impact of host developmental status on baculovirus replication. **Journal. Invert. Pathol**, v. 72, p. 269-275, 1998.

PALOMARES, L. A.; RAMIREZ, O. T. Challenges for the production of virus-like particles in insect cells: The case of rotavirus-like particles. **Biochemical Engineering Journal**. 45 p.158–167, 2009.

PARRA, J. R. P. Criação de insetos para estudos com patógenos In: ALVES, S. B. (Org.). Controle microbiano de insetos com patógenos. São Paulo: Manole,1986. p. 348-376.

PARRA, J. R. P. Criação massal de inimigos naturais. In: PARRA, J. R. P. *et al* (Eds.). **Controle biológico no Brasil**. São Paulo: Manole, 2002.p. 143-164.

PARRA, J. R. P; OMOTO, C. Cada vez mais terríveis. **Cultivar**, v. 6, n. 59, p. 18-20, 2004.

PASCHKE, J. D.; SUMMERS, M. D. Early events in the infection of arthropod gut by pathogenic insect viruses. In *Invertebrate Immunity*. Edited by K. Maramorosh & R. E. Shops. New York: Academic Press. 1975.

PASHLEY, D. P. Host-associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): a sibling species complex? **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, US, v. 79, p. 898-904, 1986.

PASHLEY, D. P. Quantitative genetics, development, and physiological adaptation in host strains of fall armyworm. **Evolution**, Columbia, v. 42, n. 1, p. 93-102, 1988.

PASHLEY, D. P. Causes of host-associated variation in insect herbivores: an example from fall armyworm, In: KIM, K. C.; MCPHERON, B. A. (Eds.). **Evolution of insect pests: patterns of variation**. New York: John Wiley & Sons, p. 351-359, 1993.

PEDIGO, L. P. Entomology and pest management. New York: MacMillan, 646p, 1989.

PEDRINI, M. R. S.; WOLFF, J. L. C.; REID, S. Fast accumulation of few polyhedra mutants during passage of a *Spodoptera frugiperda* multicapsid nucleopolyhedrovirus (Baculoviridae) in Sf9 cell cultures. **Annals of Applied Biology**, v.145, p. 107-112, 2004.

PEDRINI, M. R. S.; NIELSEN, L. K.; REID, S.; CHAN, L. C. L. *Division of Chemical Engineering, The University of Queensland, St. Lucia, Queensland 4072, Australia*, 2005.

PEDRINI, M. R. S.; CHRISTIAN, P.; NIELSEN, L. K.; REID, S.; CHAN, L. C. L. Importance of virus-medium interactions on the biological activity of wild-type Heliothine nucleopolyhedroviruses. **Journal of Virological Methods**, 136 (1), p.267-272, Sep 2006a.

PEDRINI, M. R. S.; CHRISTIAN, P.; NIELSEN, L. K.; REID, S.; CHAN, L. C. L. Importance of virus-medium interactions on the biological activity of wild-type Heliothine nucleopolyhedroviruses propagated via suspension insect cell cultures. *Journal of Virological Methods* 136, 267-272. 2006b.

PEDRINI, M. R. S.; MENDONÇA, R. Z. Bioinseticidas. In: Moraes, A. M.; Augusto, E. F. P.; Castilho, L. R. *Tecnologia do Cultivo de Células Animais de Biofármacos a Terapia Gênica*. São Paulo: Roca, 2007, p. 451-461.

POTTER, K. N.; FAULKNER, P.; MACINNON, E. A. Strain selection during serial passage of *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Virology**, Washington, DC, v. 18, p. 1040-1050, 1976.

QUEIROZ, P. R.; MARTINS, E. S.; LIMA, L. H. C.; MONNERAT, R. G. Análise da variabilidade genética de populações das Américas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) por meio de marcadores moleculares. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 18 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 80), 2005.

REZENDE, S. H. M. S.; CASTRO, M. E. B.; SOUZA, M. L. Accumulation of few-polyhedra mutants upon serial passage of *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus in cell culture. **Journal of Invertebrate Pathology**. 2008, doi: 10.1016/j.jip.2008.12.002.

RHODES, D. J. Economics of baculovirus - insect cell production systems. **Cytotechnology**, v. 20, p. 291-297, 1996.

RODAS, V. M.; MARQUES, F. H.; HONDA, M. T.; SOARES, D. M.; JORGE, S. A. C.; ANTONIAZZI, M. M.; MEDUGNO, C.; CASTRO, M. E. B.; RIBEIRO, B. M.; SOUZA, M. L.; TOUSO, A.; PEREIRA, C. A. Cell culture derived AgMNPV bioinseticida: biological constraints and bioprocess issues. **Cytotechnology**, v. 48, p. 27-39, 2005.

ROHRMANN, G. F. Nucleopolyhedrovirus. In: A. Granoff; R. G. Webster (Ed.). **Encyclopedia of Virology**. New York: Academic Press, v.1, p.146-152, 1999.

SANTOS, B. Avanços na produção massal de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) infestadas com o seu vírus de poliedrose nuclear, em laboratório e do bioinseticida à base deste vírus. 89f. Tese(Doutorado em Entomologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

SARVARI, M.; CSIKOS, G.; SASS, M.; GAL, P.; SCHUMAKER, V. N.; ZAVODSZKY, P. Ecdysteroids increase the yield of recombinant protein produced in baculovirus insect cell expression system. **BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS**. P. 1154-1161.v. 167, n.3. 1990.

SAVCHENKO, T.; WHITING, P.; SARKER, S. D.; DINAN, L. Distribution and identity of phytoecdysteroids in *Gomphrena spp.* (Amaranthaceae). **Biochemical Systematics And Ecology**. 26(3): 337-346, 1998.

SAXEMA, R. C. Inseticides from neem, p. 110-129. In J. T. Arnason; B. J. R. Philogene; P. Morand (Ed) Inseticides of Plant origin. Washington: **Americas chemical society**, 213 p. 1989.

SCHMIDT, F. G. V.; MONNERAT, R.; BORGES, M.; CARVALHO, R. Criação de insetos para avaliação de agentes entomopatogênicos e semioquímicos. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular técnica, 11).

SINGH, P. A general purpose laboratory diet mixture for rearing insects. **Insect Science and its Application**, Oxford, v.4, n. 4, p.357-362, 1983.

SINOGAS, C. Virologia. Textos de apoio e Manual prático. Departamento de Biologia, Universidade de Évora. 2006-2007.

SLAVICEK, J. M.; MERCER, M. J.; KELLY, M. E.; HAYES-PLAZOLLES, N. Isolation of a baculovirus variant that exhibits enhanced polyhedra production stability during serial passage in cell culture. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 67, p.153-160, 1996.

SLAVICEK, J. M.; MERCER, M. J.; POHLMAN, D.; KELLY, M. E.; BISCHOFF, D. S. Identification of a novel *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus mutant that exhibits abnormal polyhedron formation and virion occlusion. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.72, n.1, p.28-37. 1998.

SLAVICEK, J. M.; HAYES-PLAZOLLES, N.; KELLY, M. E. Identification of a *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus isolate that does not accumulate few-polyhedra mutants during extended serial passage in cell culture. **Biological Control**, v. 22, p.159 – 168, 2001.

SOUZA, M. L.; CASTRO, M. E. B.; SIHKER, W.; DALMOLIN, C. C.; PEDRINI, M. R. S.; SILVA, F. R. Caracterização do gene 25K FP de *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, v. 44. Brasília: 16. p. 2003.

SOUZA, M. L.; CASTRO, M. E. B.; SILHER, W.; RIBEIRO, Z. M. A.; MOSCARDI, F. Caracterização de baculovírus utilizados no controle de pragas: técnicas de caracterização de vírus de insetos. **Biotecnologia Ciências & Desenvolvimento**, v. 24, 2002.

STRAUSS, A.; FENDRICH, G.; HORISBERGER, M. A.; LIEBETANZ, J.; MEYHACK, B.; SCHLAEPPI, J.M.; SCHMITZ, R. Improved expression of kinases in Baculovirus-infected

insect cells upon addition of specific kinase inhibitors to the culture helpful for structural studies. **Protein Expression and Purification**, v.56, p.167-176, 2007.

THEILMANN, D. A.; BLISSARD, G. W.; BONNING, B.; JEHL, J.; O'REILLY, D. R.; ROHRMANN, G. F.; THIEM, S.; VLAK, J. M. Family Baculoviridae. In: *Virus Taxonomy: Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Fauquet, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. Ed). 177-185. 2005.

VALICENTE, F. H.; CRUZ, I. Controle biológico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovírus. Circular Técnica nº 15, 1991.

VALICENTE, F. H.; PEIXOTO, M. J.; PAIVA, E.; KITAJIMA, E. W. Identificação e purificação de um vírus de poliedrose nuclear da lagarta-de-cartucho *Spodoptera frugiperda*. In: *Anais da Sociedade de Entomológica Brasileira*, v.18, p. 71-82, 1989.

VALICENTE, F. H.; TUELHER, E. S. Controle Biológico da Lagarta do Cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com Baculovírus. Circular Técnica nº 114, 2009.

VOLKMAN, L. E.; SUMMERS, M. D.; HSIEH, C. H. Occluded and nonoccluded nuclear polyhedrosis virus grown in *Trichoplusia ni*: comparative neutralization comparative infectivity, and in vitro growth studies, **J. Virol.** v. 19, p. 820–832, 1976.

VOLKMAN, L. E.; KNUDSON, D. L. In vitro replication of baculoviruses. In *The Biology of Baculoviruses*, pp. 109-127. Edited by R. R. Granados & B. A. Federici. Boca Raton, FL.: CRC Press. 1986.

WANG, H. G. H.; FRASER, M. J.; CARY, L. C. Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of TFP3 lepidopteran transposon insertions at the FP locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Gene*, Amsterdam, v. 81, p. 97-108, 1989.

WEBER, W.; WEBER, E.; GEISSE, S.; MEMMERT, K. Optimization of protein expression and establishment of the Wave bioreactor for baculovirus/insect cell culture. **Cytotechnology**. V. 38, p.77–85, 2002.

WHITFORD, M.; STEWART, S.; KUZIO, J.; FAULKNER, P. Identification and sequence analysis of gene encoding gp67, an abundant envelope glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Virology**, v. 63, p. 1393-1399, 1989.

WICKHAM, T. J.; DAVIS, T.; GRANADOS, R. R.; HAMMER, D. A.; SHULER, M. L.; WOOD, H. A. Baculovirus defective interfering particles are responsible for variations in recombinant protein production as a function of multiplicity of infection. **Biotechnology Letters**, v.13, p.483-488, 1991.

WING, K. D. RH 5849, A nonsteroidal ecdysone agonist: effects on a *Drosophila* cell line. **Science** **241**, p. 467–469, 1988.

WOLFF, J. L. C.; VALICENTE, F. H.; MARTINS, R.; OLIVEIRA, J. V. C.; ZANOTTO, P. M. A. Analysis of the genome of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SfMNPV-19) and of the high genomic heterogeneity in group II nucleopolyhedroviruses. *Journal of General Virology*, Cambridge, v. 89, n. 5, p. 1202-1211, 2008.

WU, J.; QIAN RUAN, H. Y.; PETETR, L. Evaluation of spent medium recycle and nutrient feeding strategies for recombinant protein production in the insect cell–baculovirus process. **Journal of Biotechnology**, v.66, p. 109–116, 1998.

Anexos

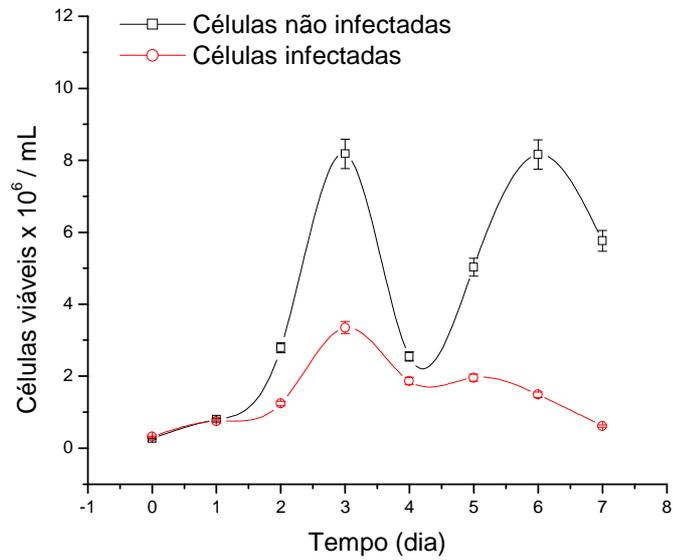


Figura A.1 - Curva de crescimento das células Sf21 infectadas e não infectadas com o baculovírus SfMNPV (passagem 1).

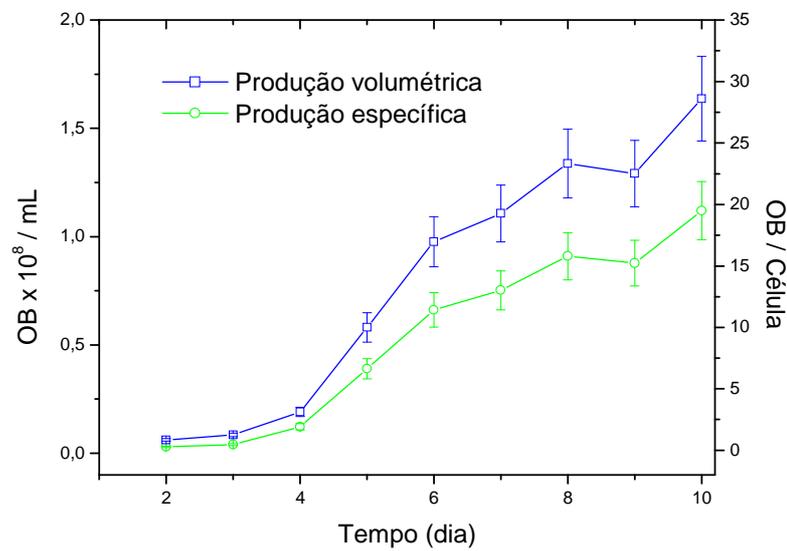


Figura A.2 - Curvas de produção volumétrica e específica de OB da infecção de células por SfMNPV (passagem 1).

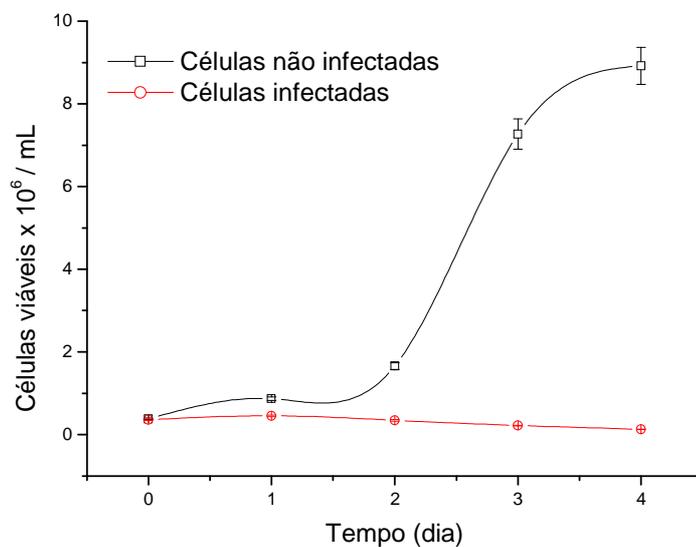


Figura B.1 - Curva de crescimento das células Sf21 infectadas e não infectadas com o baculovírus SfMNPV (passagem 2).

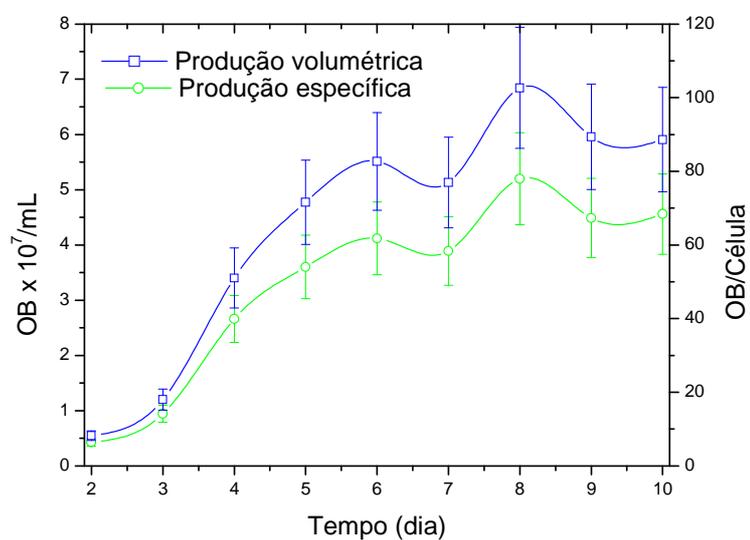


Figura B.2 - Curvas de produção volumétrica e específica de OB da infecção de células por SfMNPV (passagem 2).

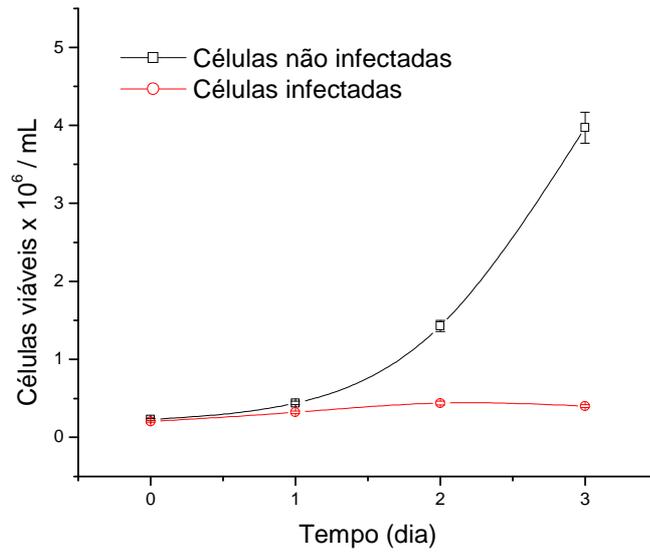


Figura C.1 - Curva de crescimento das células Sf21 infectadas e não infectadas com o baculovírus SfMNPV (passagem 3).

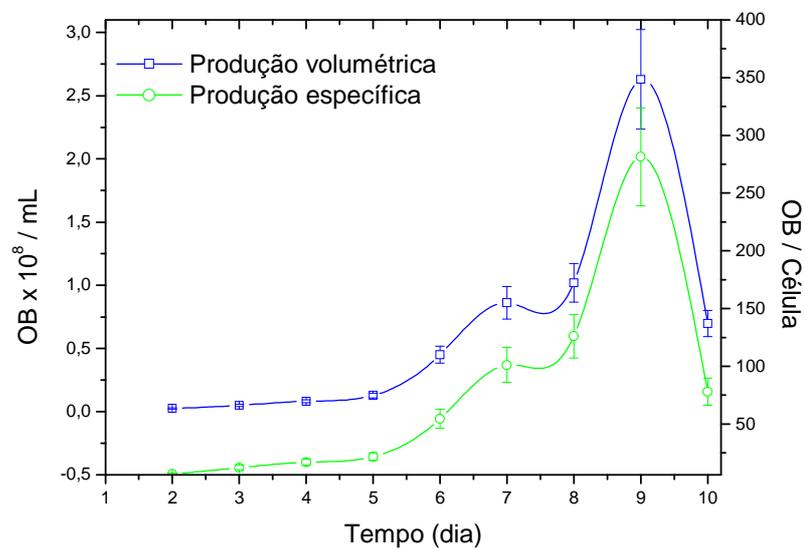


Figura C.2 - Curvas de produção volumétrica e específica de OB da infecção de células por SfMNPV (passagem 3)

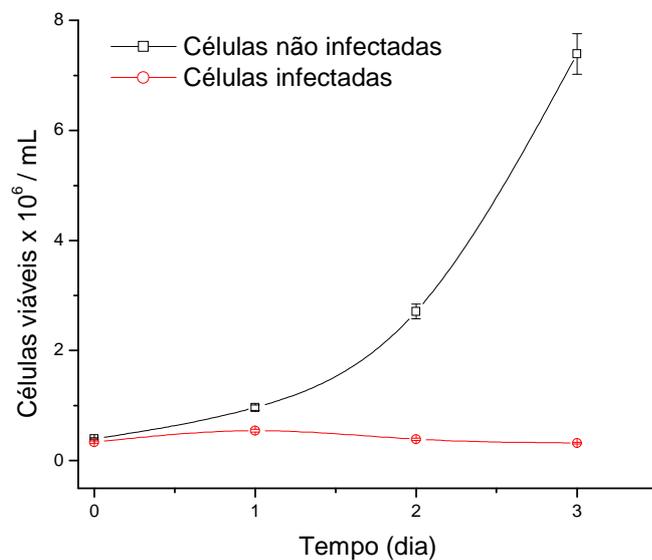


Figura D.1 - Curva de crescimento das células Sf21 infectadas e não infectadas com o baculovírus SfMNPV (passagem 4).

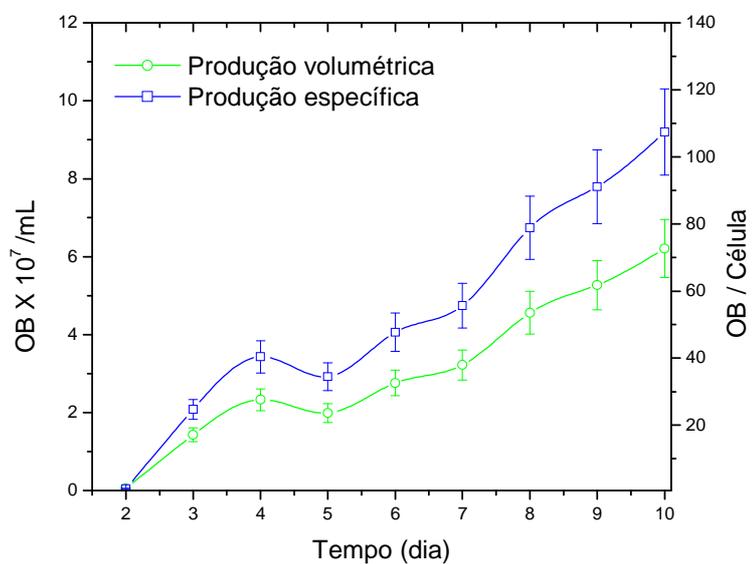


Figura D.2 - Curvas de produção volumétrica e específica de OB da infecção de células por SfMNPV (passagem 4).

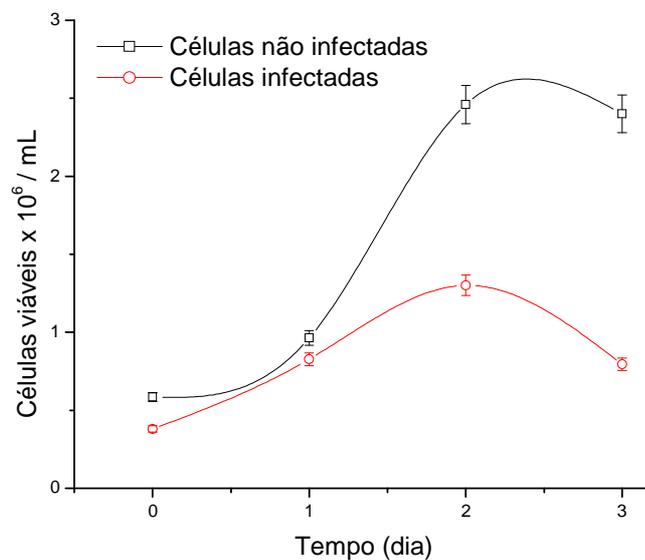


Figura E.1 - Curva de crescimento das células Sf21 infectadas e não infectadas com o baculovírus SfMNPV (passagem 5).

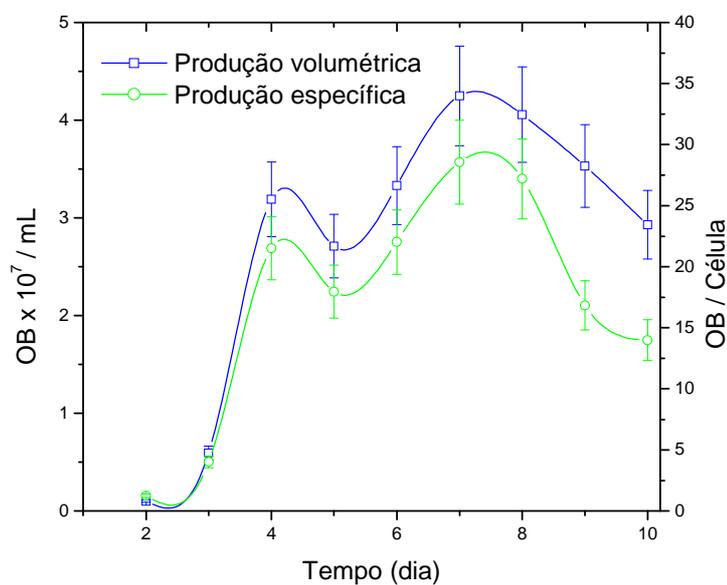


Figura E.2 - Curvas de produção volumétrica e específica de OB da infecção de células por SfMNPV (passagem 5).

Regr. Coefficients; Var.:Produção volumétrica; R-sqr=.92934; Adj;.82336 (Planejamento - Statistic) 2**(2-0) design; MS Pure Error=54450E8 DV: Produção volumétrica						
Factor	Regressn Coeff.	Std.Err. Pure Err	t(1)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	42833333	5794610	7,39193	0,085604	-30794162	116460829
(1) [] Hormônio	13112500	1304440	10,05221	0,063124	-3461976	29686976
(2) [] Colesterol	237500	260888	0,91035	0,529853	-3077395	3552395
1 by 2	-443750	58336	-7,60675	0,083214	-1184983	297483

Figura F 1 – Coeficientes de regressão para produção volumétrica gerada pelo programa *Statistica Software*® (versão 7.0).

Regr. Coefficients; Var.:Produção específica; R-sqr=.9906; Adj;.97649 (Planejamento - Statistic) 2**(2-0) design; MS Pure Error=10,53405 DV: Produção específica						
Factor	Regressn Coeff.	Std.Err. Pure Err	t(1)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	50,57167	8,059775	6,27458	0,100614	-51,8375	152,9808
(1) [] Hormônio	19,20000	1,814357	10,58226	0,059981	-3,8536	42,2536
(2) [] Colesterol	0,47000	0,362871	1,29522	0,418562	-4,1407	5,0807
1 by 2	-0,68025	0,081141	-8,38361	0,075579	-1,7112	0,3507

Figura F 2 – Coeficientes de regressão para produção específica gerada pelo programa *Statistica Software*® (versão 7.0).

ANOVA; Var.: Produção volumétrica; R-sqr=,92934; Adj:,82336 (Planejamento - Statistic) 2**(2-0) design; MS Pure Error=54450E8 DV: Produção volumétrica					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1) [] Hormônio	2,873025E+14	1	2,873025E+14	52,7645	0,087094
(2) [] Colesterol	9,455625E+14	1	9,455625E+14	173,6570	0,048217
1 by 2	3,150625E+14	1	3,150625E+14	57,8627	0,083214
Lack of Fit	1,122408E+14	1	1,122408E+14	20,6136	0,138014
Pure Error	5,445000E+12	1	5,445000E+12		
Total SS	1,665613E+15	5			

Figura G 1 – ANOVA para produção volumétrica gerada pelo programa *Statistica Software*® (versão 7.0).

ANOVA; Var.: Produção específica; R-sqr=,9906; Adj:,97649 (Planejamento - Statistic) 2**(2-0) design; MS Pure Error=10,53405 DV: Produção específica					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1) [] Hormônio	500,864	1	500,864	47,5472	0,091685
(2) [] Colesterol	2026,800	1	2026,800	192,4047	0,045816
1 by 2	740,384	1	740,384	70,2848	0,075579
Lack of Fit	20,489	1	20,489	1,9450	0,396022
Pure Error	10,534	1	10,534		
Total SS	3299,071	5			

Figura G 2 – ANOVA para produção específica gerada pelo programa *Statistica Software*® (versão 7.0).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)