

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**QUANTIFICAÇÃO DE APOPTOSE E NECROSE  
MEDIANTE CORANTES FLUORESCENTES E  
ANÁLISE DE IMAGENS NO CULTIVO DE CÉLULAS  
DE INSETO: O CASO DA *Drosophila melanogaster* S2**

**Bruna Gabriela Silva**

**São Carlos – SP  
2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**QUANTIFICAÇÃO DE APOPTOSE E NECROSE MEDIANTE  
CORANTES FLUORESCENTES E ANÁLISE DE IMAGENS,  
NO CULTIVO DE CÉLULAS DE INSETO: O CASO DA  
*Drosophila melanogaster* S2**

**Bruna Gabriela Silva**

**Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Química da Universidade  
Federal de São Carlos como parte dos  
requisitos necessários à obtenção do título  
de Mestre em Engenharia Química, Área  
de Concentração em Pesquisa e  
Desenvolvimento de Processos Químicos  
Orientador: Prof. Dr. Cláudio  
Alberto Torres Suazo**

**São Carlos – SP  
2007**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S586qa

Silva, Bruna Gabriela.

Quantificação de apoptose e necrose mediante corantes fluorescentes e análise de imagens, no cultivo de células de inseto : o caso da *Drosophila melanogaster* S2 / Bruna Gabriela Silva São Carlos : UFSCar, 2007.  
101 f.

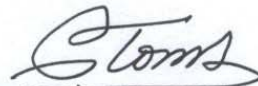
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Engenharia química. 2. Células - morte. 3. Yo-Pro-1. 4. Células de inseto. 5. Processamento de imagens. I. Título.

CDD: 660 (20<sup>a</sup>)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado DE  
**BRUNA GABRIELA SILVA**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SÃO CARLOS, EM 28 DE MARÇO DE 2007.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Claudio Alberto Torres Suazo  
**Orientador, PPG-EQ/UFSCar**



Prof. Dr. Aldo Tonso  
**DEQ/EPUSP**



Prof. Dr. Charles Dayan Farias de Jesus  
**UFSCar**

Dedico este trabalho à minha família e amigos

“Em vez de dizer: ‘isto não pode ser feito’, continue questionando  
seu cérebro: ‘como isto pode ser feito?’”

(Lair Ribeiro)

“Conhece-te, aceita-te, supera-te!”

(Santo Agostinho de Hipona)

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Cláudio Alberto Torres Suazo, pela orientação, pela amizade, pela paciência e por ter me recebido como sua orientada praticamente no último semestre do mestrado.

Ao professor Dr. Paulo Ignácio Fonseca de Almeida por ter me recebido com entusiasmo no início do mestrado, pela ótima orientação e amizade até nos momentos mais difíceis.

Ao pessoal do LATECC pela ajuda, Douglas, Kamilla, Mabel, Nickeli, Patrícia e principalmente ao Lucas por ter me aturado tanto tempo, e ao Rafael pela super cooperação na fase inicial dos meus experimentos e pelos finais de semana perdidos....

Ao André, mais conhecido por Tigrão por me aturar na salinha quente do microscópio e pela ajuda nos momentos de nervoso... e ao Edson pela paciência em me ajudar com a revisão na fase inicial do meu primeiro projeto e também por nunca deixar a música faltar ao laboratório...

Ao Paulo, meu veterano na graduação e colega de curso na pós, pelas verdades ditas, pela ajuda nos estudos ( e que ajuda!) e por ter feito pós pelos mesmos motivos que eu e agora continuando juntos no doutorado, mais 4 anos um aturando o outro...

À Raquel, pela amizade e companheirismo e que mesmo estando longe as longas horas no msn e as baladas animadas tornaram esses dois anos de mestrado muito mais divertidos.

À Carmen Lúcia, amiga muito querida, pelas idéias mirabolantes para tentar explicar porque só minhas coisas contaminavam.... e também pelo apoio nas horas que eu mais precisei.

Aos meus pais, Lena e Paulo, pelo apoio e incentivo, e paciência por passarmos tanto tempo longe um do outro. A minha irmã Bárbara pela cooperação e animação.

A Deus por todas as graças que tem concedido em minha vida.

Agradeço também a todos que de alguma maneira me ajudaram de alguma forma nesse trabalho.

À CNPq pela bolsa concedida.

## RESUMO

Em cultivos de células animais existem dois tipos de morte celular: apoptose (morte celular programada) e necrose (morte devido a lesões causadas por fontes externas). O método inovador de identificação dessas mortes de células que tem atraído muito interesse é o uso de microscopia de fluorescência e corantes celulares fluorescentes capazes de tingir moléculas de DNA e RNA. Técnicas de análise de imagem têm se tornado uma ferramenta útil nessa quantificação de morte celular, uma vez que é não destrutiva para a cultura e de fácil aplicação com o uso de softwares adequados.

Baseado nessas novas tendências tecnológicas, o presente trabalho teve como meta o desenvolvimento de uma metodologia para quantificação de morte apoptótica e necrótica no cultivo de células de inseto *Drosophila melanogaster* (S2). Essa metodologia envolveu o desenvolvimento de um procedimento experimental utilizando corantes novos no mercado: o YO-PRO-1 e o Iodeto de Propídio, que têm apresentado vantagens sobre os outros corantes por não serem destrutivos para a cultura e discriminarem claramente a morte apoptótica da necrótica. A metodologia que faz uso destes corantes foi comparada com o método de exclusão por Azul de Tripán e com os corantes fluorescentes Laranja de Acridina e Brometo de Etídio. Além de serem menos tóxicos as células, o YO-PRO-1 e o Iodeto de Propídio mostraram mais sensibilidade na identificação da morte e posterior cálculo da viabilidade celular. A metodologia também envolveu o desenvolvimento de um algoritmo baseado em técnicas de análise de imagens para quantificação dos dois tipos de morte celular, menos subjetiva que os métodos manuais atualmente utilizados. O algoritmo se mostrou eficiente, rápido e de fácil aplicação, gerando um erro de 2% quando comparado com a metodologia manual. Também realizou-se o cálculo da concentração celular por método computacional, ficando os valores bem próximos dos experimentais.

**Palavras chave:** morte celular, análise de imagens, YO-PRO-1, célula de inseto, S2

## **ABSTRACT**

In animal cell cultures there are two kinds of cell death: apoptosis (programmed cell death) and necrosis (cell death due to external sources). The innovative method of cell death identification that have attracted interest is the use of fluorescence microscopy and fluorescent dye (to bind DNA and RNA). Image analysis techniques has become a useful tool in cell death quantification, once they are non destructive for the culture and have easy application with using adjusted softwares.

Based in these new technological trends, the present work considers the development of a methodology for quantification of apoptotic and necrotic cell death in cultures of insect cells *Drosophila melanogaster* (S2). This methodology involved the development of a experimental procedure using new dyes (YO-PRO-1 and Propidium Iodide), that have presented advantages over the others because they are non destructive to the culture an are able to clearly discriminate between apoptotic and necrotic cell death. The use of this dyes was compared with the method of exclusion of Trypan blue and fluorescent dyes Acridine Orange and Ethidium Bromide. Besides being less toxic to cells S2, YO-PRO-1 and Propidium Iodide showed more sensitivity in the identification of death and in the calculation of cell viability. It also envolved the development of an algorithm based on image analysis techniques for quantification of the two kinds of cell death, less subjective than the manual methods currently used. The algorithm showed to be efficient, fast an of easy application with a error around 2% when compared to manual methodology. The calculated cell concentration by the algorithm was very close to experimental.

**Keywords:** cell death, image analysis, YO-PRO-1, insect cell, S2



## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Esquema geral do processo de necrose em células animais.....	17
Figura 3.2: Esquema geral do processo de apoptose em células animais .....	18
Figura 3.3: Representação unitária do <i>Pixel</i> .....	25
Figura 3.4: Relação de vizinhança entre <i>pixels</i> , vizinhança-de-quatro e vizinhança-de-oito.....	26
Figura 3.5: Relação de conectividade entre <i>pixels</i> . .....	26
Figura 3.6: Várias operações de análise morfológica da célula de inseto <i>S. frugiperda</i> (Sf9): a) imagem em tons de cinza original; b) Thresholding; c) Erosão; d) Dilatação; e) Abertura; f) Fechamento.....	28
Figura 4.1: Representação esquemática do procedimento seguido nos experimentos de cultivo celular .....	35
Figura 4.2: Procedimento geral seguido pelo algoritmo computacional em linguagem Matlab para contagem de células de imagens adquiridas em cultivos da célula S2 através de microscópio ótico e um sistema de aquisição de imagens. ....	42
Figura 5.1: Resultados de imagens obtidas com microscópio ótico fluorescente em diferentes concentrações do corante YP com a finalidade de estabelecer uma concentração mínima útil na identificação de células apoptóticas. Concentrações: a) 0,5 $\mu\text{M}$ , b) 1 $\mu\text{M}$ e c) 2 $\mu\text{M}$ .....	44
Figura 5.2: Resultados de imagens obtidas com microscópio ótico fluorescente em diferentes concentrações do corante IP com a finalidade de estabelecer uma concentração mínima útil na identificação de células necróticas. Concentrações: a) 5 $\mu\text{M}$ , b) 10 $\mu\text{M}$ e c) 20 $\mu\text{M}$ .....	45
Figura 5.3: Resultados de concentração e viabilidade celular em função do tempo obtidos em cultivo em frascos T de células S2 em meio Sf900-II a 28°C com medidas realizadas através dos métodos de exclusão de azul de trypan e de corantes fluorescentes YP e IP para fins comparativos. As barras indicam o erro padrão. ....	46
Figura 5.4: Identificação de várias populações de células em microscópio de fluorescência durante o cultivo de células S2 neste trabalho. a) células viáveis não apoptóticas (VNA), b) células não viáveis apoptóticas (NVA), c) células viáveis apoptóticas (VA), d) células necróticas (NEC), e) células livres de cromatina (CF).....	49
Figura 5.5: Exemplo de imagem adquirida de células coradas com os corantes YP/IP. As células verdes são apoptóticas e as vermelhas são células necróticas. ....	49
Figura 5.6: Resultados de concentração e viabilidade celular em função do tempo para o cultivo de células S2 em frasco T a 28 °C com corantes fluorescentes YP e IP adicionado ao meio de cultura Sf900-II.....	50
Figura 5.7: Resultados de concentração de células totais em função do tempo para cultivos de célula S2 sem e com corante YP/IP no meio de cultura Sf900-II. ....	52
Figura 5.8: Resultados de concentração e viabilidade celular em função do tempo para o cultivo de célula S2 em frasco Schott com meio Sf900-II a 28°C em shaker a 100 rpm a fim de comparar os diferentes métodos (exclusão e fluorescente) e também a sensibilidade dos corantes usados no método de corantes fluorescentes para obtenção da viabilidade celular...	53
Figura 5.9: Concentração de células S2 viáveis em função do tempo obtidas pelo método de exclusão de azul de tripan e pelo método fluorescente, levando em consideração para o cálculo apenas a concentração de células necróticas para verificação da equivalência dos métodos.....	55
Figura 5.10: Evolução de diferentes tipos de células S2 segundo a classificação de Merceille et al. (1994) utilizando-se LA e BE como corantes fluorescentes na quantificação das mortes	

apóptica e necrótica no cultivo de célula S2 em frasco Schott com meio Sf900-II a 28°C em shaker a 100 rpm. ....	56
Figura 5.11: Evolução de diferentes tipos de células S2 segundo a classificação de Merceille et al. (1994) utilizando-se YP e IP como corantes fluorescentes na quantificação das mortes apóptica e necrótica no cultivo de célula S2 em frasco Schott com meio Sf900-II a 28°C em shaker a 100 rpm. ....	57
Figura 5.12: Evolução da concentração celular total e concentração de células mortas por lise estimada por LDH em função do tempo para o cultivo realizado com célula S2 em frasco Schott com meio Sf900-II a 28°C em shaker a 100 rpm. ....	59
Figura 5.13: Evolução da concentração celular e de células mortas (lise, apoptose e necrose) obtidas pelos métodos de exclusão e corantes fluorescentes ao longo do tempo no cultivo de célula S2 em frasco Schott com meio Sf900-II a 28°C em shaker a 100 rpm. ....	60
Figura 5.14: Concentração celular total do cultivo em função do tempo, juntamente com a concentração de células viáveis descontando as células lisadas (medida por LDH) para o método de exclusão de azul de Tripán e métodos fluorescentes no cultivo de célula S2 em frasco Schott com meio Sf900-II a 28°C em shaker a 100 rpm. ....	61
Figura 5.15: Concentração celular e viabilidade em função do tempo pelo método de exclusão de corante e métodos fluorescentes. ....	62
Figura 5.16: Exemplo de imagem de amostra de células de inseto S2 sem corante contida no hemacitômetro ....	64
Figura 5.17: Exemplo de imagem de amostra de células S2 em solução de corante azul de tripan, contida no hemacitômetro ....	64
Figura 5.18: Exemplo de imagem obtida de amostra de células S2 em solução de corante azul de tripan contida entre a lâmina e a lamínula. ....	65
Figura 5.19: Exemplo de imagem de amostra de células S2 em solução de corantes fluorescentes (YO-PRO-1 e Iodeto de Propídio) preparadas em lâmina/lamínula. ....	66
Figura 5.20: Imagem original de células S2 de entrada do algoritmo computacional . A amostra foi corada com os corantes LA e BE. A imagem foi obtida de um cultivo em Frasco Schott com meio SF900-II agitado em shaker a 100 rpm e 28°C. ....	68
Figura 5.21: Imagem original de células S2 processada em tons de cinza para possibilitar o tratamento com o software MATLAB. ....	68
Figura 5.22: Imagem de células S2 em tons de cinza após o ajuste de contraste (com o software MATLAB) da imagem apresentada na Figura 5.21. ....	69
Figura 5.23: Ampliação (zoom) da célula S2 destacada na Figura 5.22 para mostrar a presença de ruídos. ....	69
Figura 5.24: Imagem filtrada das células S2 usando-se filtro da mediana para eliminação de ruídos da imagem da Figura 5.22. ....	70
Figura 5.25: Ampliação (zoom) da célula S2 tratada com filtro da mediana e destacada na Figura 5.24. ....	70
Figura 5.26: Histograma dos tons de cinza, da imagem na Figura 5.21. ....	71
Figura 5.27: a) Imagem do ajuste de contraste após aplicação do thresholding na imagem das células S2 da Figura 5.24, b) zoom da célula destacada. ....	71
Figura 5.28: a) Imagem de uma célula em tons de cinza. b) aplicação do thresholding após filtragem da imagem original em tons de cinza, c) aplicação do thresholding sem a filtragem prévia da imagem original em tons de cinza ....	72
Figura 5.29: a) Imagem binária de células S2 onde será realizada a identificação de regiões, b) Janela do programa com o resultado final do algoritmo para contagem de células totais. ...	73
Figura 5.30: Exemplo do processamento para identificação de regiões coloridas: a) Imagem original de células S2 b) Imagem da banda vermelha, c) Imagem da banda verde. ....	73

Figura 5.31: Exemplo do processamento para seleção das regiões coloridas a) Imagem binária do total de células, b) Imagem da banda vermelha a partir da imagem original, c) Imagem da banda verde a partir da imagem original. ....	74
Figura 5.32: Imagens de células S2 geradas após aplicação do critério de seleção de regiões coloridas: a) células consideradas vermelhas (necróticas), b) células consideradas verdes (apoptóticas). ....	75
Figura 5.33: Resultado do processamento realizado com o algoritmo computacional para quantificação das células S2 totais, células S2 apoptóticas e células S2 necróticas: a) Imagem original de entrada do algoritmo, b) Imagem da tela de saída dos resultados obtidos .....	75
Figura 5.34: Exemplo de imagem de amostra de células S2 que geram erro no algoritmo devido a aglomeração: a) imagem em tons de cinza antes da aplicação do thresholding, b) imagem binarizada.....	76
Figura 5.35: Exemplo de imagem de amostra de células S2 que geram erro no algoritmo por luminosidade inapropriada no momento da aquisição: a) imagem antes de aplicar o thresholding, b) imagem binária.....	77
Figura 5.36: Exemplos do uso do algoritmo computacional para células S2 coradas com YP e IP, onde a e a' são imagens de entrada e b e b' são as telas de saída do algoritmo para cada imagem, respectivamente .....	78
Figura 5.37: Esquema de uma das grades do hemacitômetro usado na contagem de células para obtenção de concentração e viabilidade celular. Áreas com L são referentes aos quadrantes e suas respectivas 16 subdivisões.....	80
Figura 5.38: Exemplo de imagem adquirida da amostra de células S2 num hemacitômetro, a)sem fluorescência e b)com fluorescência.....	80
Figura 5.39: Exemplo de imagem de amostra de células S2 adquirida sem fluorescência, após binarização, sem se retirar as linhas das subdivisões do quadrante do hemacitômetro.....	81
Figura 5.40: Imagem adquirida da amostra de células S2 sem o uso da luz fluorescente para identificação do total de células, a)imagem original e b)imagem em tons de cinza. ....	82
Figura 5.41: Imagem binária da amostra de células S2 após realização de thresholding (com valores para a identificação da região de interesse das linhas presentes na imagem adquirida), abertura e fechamento.....	82
Figura 5.42: : Exemplo do tratamento para eliminar a interferência das linhas (riscos no vidro) do hemacitômetro no cálculo da concentração celular: a)imagem original; b)imagem após a retirada das linhas. ....	83
Figura 5.43: Exemplo do processamento seguido depois da eliminação das linhas (riscos) do hemacitômetro na imagem para o cálculo da concentração de células S2: a)imagem binária, b)imagem binária após realização de fechamento, c)imagem após realização de abertura e d)tela de saída do algoritmo. ....	84
Figura 5.44: Imagem adquirida com luz fluorescente de amostra de células S2: a)imagem original e b)imagem após substituição dos <i>pixels</i> encontrados durante a etapa de remoção de linhas.....	84
Figura 5.45: Resultado do tratamento para identificação de células S2 mortas: a)imagem de entrada (após a substituição dos <i>pixels</i> referentes as linhas) do algoritmo para identificação das células mortas; b)tela de saída.....	85
Figura 5.46: Concentração de células S2 em função do tempo obtida experimentalmente por contagem manual tradicional em hemacitômetro e obtida através do algoritmo computacional desenvolvido neste trabalho. ....	86
Figura 5.47: Concentração celular obtida pelo algoritmo em função da concentração celular experimental para comparação dos métodos .....	86
Figura 5.48: Tela de entrada da interface para o usuário, para posterior identificação de células mortas e cálculo da viabilidade. ....	88

Figura 5.49: Abertura das imagens de entrada, para posterior identificação de regiões de interesse. ....	89
Figura 5.50: Execução do algoritmo computacional com o cálculo do número total de células S2, número de células apoptóticas e células necróticas e a viabilidade. ....	89

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Lista das nove linhagens de células de inseto investigadas com potencial para sistema de expressão de proteínas recombinantes.....	11
Tabela 3.2: Resumo das Vantagens e Desvantagens da Cultura em Monocamada e Suspensão .....	13
Tabela 4.1: Composição da solução tampão salina utilizada na diluição de amostras para determinação da concentração celular .....	33
Tabela 5.1: Valores de velocidade específica máxima calculados a partir das curvas de crescimento de células totais e células viáveis obtidas pelo método de exclusão de corantes e corantes fluorescente para o cultivo estático realizado em garrafa T.....	48
Tabela 5.2: Valores de velocidade específica máxima ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) calculados a partir das curvas de crescimento de células S2 totais e células viáveis obtidas pelo método de exclusão de corantes e corantes fluorescente para o cultivo dinâmico em meio SF 900 – II a 28°C em Schott agitado em shaker a 100 rpm.....	54

## SUMÁRIO

pág

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 :OBJETIVOS.....	5
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1 BIOTECNOLOGIA E CULTIVO CELULAR.....	6
3.1.1 Desenvolvimento da vacina anti-rábica.....	7
3.1.2 Expressão de proteína recombinante.....	9
3.1.3 Cultivo celular (célula de inseto).....	11
3.1.4 Célula de <i>Drosophila melanogaster</i> (S2).....	13
3.1.5 Estados fisiológicos da célula.....	15
3.1.6 Necrose.....	16
3.1.7 Apoptose.....	17
3.1.8 Viabilidade e Corantes celulares.....	19
3.1.9 YO-PRO-1 (YP) e Iodeto de Propídio (IP).....	21
3.1.10 Importância da análise de imagens na cultura de células de inseto.....	22
3.2 A IMAGEM DIGITAL.....	24
3.2.1 Definições.....	24
3.2.2 Análises Morfológicas.....	27
3.2.3 “Thresholding”.....	28
3.2.4 Erosão.....	28
3.2.5 Dilatação.....	29
3.2.6 Abertura (Open).....	29
3.2.7 Fechamento (Close).....	30
3.2.8 Softwares para tratamento de imagem.....	30
3.2.9 Processamento de Imagens Digitais.....	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 Materiais.....	32
4.1.1 Células de inseto.....	32
4.1.2 Meio de cultura.....	32
4.1.3 Corantes para identificação do tipo de morte celular.....	32
4.1.4 Solução Tampão Salina.....	33
4.1.5 Equipamentos.....	33
4.1.5.1. Câmara asséptica.....	33
4.1.5.2. Microscópio.....	34
4.1.5.3. Autoclave.....	34
4.1.5.4. Câmara de incubação rotatória.....	34
4.2 Métodos.....	35
4.2.1 Procedimento experimental para o cultivo das células.....	35
4.2.2 Avaliação de métodos para análise de viabilidade.....	36
4.2.2.1. Determinação da concentração e viabilidade celular.....	36

4.2.2.2. Quantificação de apoptose, necrose e viabilidade celular utilizando corantes fluorescentes.....	37
4.2.3 Determinação da velocidade específica máxima de crescimento.....	40
4.2.4 Determinação de células mortas por lise através do LDH.....	41
4.2.5 Etapas no desenvolvimento do Algoritmo.....	42
5 RESULTADOS .....	44
5.1 Determinação de metodologia para utilização dos corantes fluorescentes YP e IP. ....	44
5.2 Definição de metodologia para quantificação da viabilidade celular.....	45
5.3 Obtenção das imagens para quantificação de apoptose e necrose.....	63
5.4 Desenvolvimento do Algoritmo .....	67
5.4.1 Obtenção do total de células.....	67
5.4.2 Segmentação da imagem para identificação das regiões coloridas .....	73
5.4.3 Problemas encontrados durante testes com as imagens adquiridas.....	76
5.4.4 Testes do algoritmo utilizando-se os corantes YP e IP .....	78
5.4.5 Identificação de células S2 para cálculo de concentração e viabilidade celular com o algoritmo.....	79
5.5 Interface para o usuário .....	87
6 CONCLUSÕES .....	90
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	92
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	93
ANEXO A – Algoritmo simplificado para quantificação do tipo de morte celular.....	98
ANEXO B – Algoritmo simplificado para remoção de linhas e contagem de células totais. ....	100

## 1 INTRODUÇÃO

Os avanços conseguidos em engenharia genética durante os últimos 20 anos foram a principal causa para o desenvolvimento rápido da biotecnologia, com destaque para o desenvolvimento de diversos sistemas de expressão de proteínas recombinantes utilizando bactérias e leveduras, assim como, células de plantas e de animais.

A utilização de células animais para expressão de biomoléculas vem sendo cada vez mais preferida pelas indústrias farmacêuticas, devido à qualidade das proteínas obtidas com esse tipo de células. Neste sentido, as células de inseto vêm surgindo como importantes hospedeiros para a expressão de produtos gênicos recombinantes. As células de inseto apresentam alta capacidade de expressão gênica, sua manipulação e manutenção são mais baratas que as das células de mamíferos, seus cultivos são de fácil escalonamento e também permitem a obtenção de proteínas com as devidas transformações co-traducionais e pós-traducionais de células eucarióticas (PFEIFER, 1998).

Nos últimos 10 anos a célula de inseto de *Drosophila melanogaster* tem sido destaque na expressão de proteínas recombinantes de diversos tipos dentre os quais se pode citar: glicoproteína envelope recombinante (HOYLE, 1991), antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HbsAg) (DEML et al, 1999), proteína citosólica anexina XIIb (Anx XIIb) (BENTING et al, 2000), eritropoietina humana (hEPO) (HWA et al, 2002) e interleucina humana 2 (hIL-2) (HWA et al, 2003). Na maioria desses casos, as proteínas testadas foram processadas de forma inteiramente satisfatória e mostraram-se biologicamente ativas.

Sabe-se que a eficiência de um processo de cultivo é fortemente influenciada por mudanças no estado celular, o qual deve ser monitorado, interpretado e, se possível, propriamente manipulado. O monitoramento e controle da fisiologia celular são considerados as questões mais desafiantes da engenharia de processos moderna (KONSTANTINOV,



1996). A determinação do total de células e sua viabilidade estão entre as mais importantes medidas durante as fases de crescimento e de produção da biomolécula de interesse em cultivos com células de inseto (AGATHOS, 1996, RIESEBERG et al, 2001). Apesar disso, na prática, estas são as variáveis que menos se monitoram como consequência da dificuldade experimental normalmente encontrada na sua quantificação de forma asséptica, não invasiva, discriminativa (viável e não viável), em tempo real e, sobretudo, confiável.

Existem diversas maneiras de se mensurar a viabilidade celular, sendo a mais comum a detecção da integridade da membrana. Membranas defeituosas levam a perda de componentes intracelulares tais como proteínas (KOLBER et al, 1988). Essa detecção de integridade pode ser efetuada tanto por exclusão quanto por retenção de corante.

O corante ideal para quantificação de morte celular deve fornecer informação quantitativa da morte celular e não ser destrutivo para a cultura. Em adição, também deve diferenciar entre os dois tipos de morte celular: apoptose (morte celular programada) e necrose (morte devido a lesões causadas por fontes externas.), fornecendo um entendimento dos caminhos que levam à morte celular. Por último, a quantificação deve ser fácil, rápida e aplicável a várias condições de cultivo (GAWLITTA et al, 2004).

Nos últimos 10 anos, uma combinação de dois corantes fluorescentes, disponíveis comercialmente, YO-PRO-1 (YP) e Iodeto de Propídio (IP), tem sido usada com sucesso para discriminar entre as mortes apoptótica e necrótica em cultivos de células de mamíferos (SUZUKI et al, 1997; JEROME et al, 2001; GAWLITTA et al, 2004). O YP é capaz de penetrar nas células em estado de apoptose, tingindo o DNA e emitindo uma fluorescência verde. Já o IP pode atravessar apenas as membranas das células necróticas e não das apoptóticas, corando DNA e RNA presentes no citoplasma, e emitindo uma fluorescência vermelha. Ambos os corantes não são capazes de penetrar no interior das células viáveis.

Apesar da grande importância que vem ganhando a tecnologia de cultivo de células de inseto, não se encontram muitas informações na literatura que mostrem a utilidade desses corantes em cultivos desse tipo de células. A metodologia mais comum de obtenção da viabilidade celular em cultivos de células de inseto, a semelhança do que acontece com células de mamíferos, é com a utilização do microscópio óptico para contagem em hemacitômetro de células que apresentam uma membrana impermeável ao corante Azul de Tripán (FRESHNEY, 1994). Porém, esta metodologia, devido ao fato de não poder detectar células apoptóticas, superestima a viabilidade e não fornece informações sobre o tipo de morte que provoca a morte celular. Isto explica porque a combinação dos corantes YO-PRO-1 (YP) e Iodeto de Propídio (IP) vem ganhando tanto interesse entre os pesquisadores na área de cultivos celulares. Para se aproximar mais ainda do corante ideal, seria conveniente que o método de quantificação da viabilidade evitasse alguns problemas encontrados no método de exclusão de azul de tripán para tornar-se um método rápido, simples, menos subjetivo e mais preciso como proposto por BITTNER et al. (1998).

O recurso tecnológico que vem sendo utilizado para preencher essas necessidades, consiste de técnicas computacionais conhecidas como “técnicas de análises de imagens”. Estas técnicas se baseiam na aquisição de imagens através de um microscópio óptico e sua manipulação e tratamento no computador de forma simples e rápida, utilizando-se de “softwares” adequados.

A utilização dos corantes YP e IP, juntamente com um método computacional de análises de imagens, abrem a perspectiva de geração de uma ferramenta que poderá ser muito útil no monitoramento e controle de cultivos de células de inseto. A avaliação dessa metodologia neste trabalho será feita através do estudo do caso de cultivo de células de *Drosophila melanogaster* (S2), devido à importância destacada atual desta célula na pesquisa

e desenvolvimento de processos de cultivo para produção em grande escala de biomoléculas de interesse biotecnológico.

## **2 :OBJETIVOS**

O presente trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de uma metodologia simples, rápida e confiável para quantificação de viabilidade celular, assim como das mortes necrótica e apoptótica no cultivo da célula de inseto *Drosophila melagonaster* (S2).

A metodologia consiste de um procedimento experimental em que se utiliza corantes fluorescentes (YO-PRO-1 e Iodeto de Propídio) visando a distinção entre células apoptóticas e necróticas e também o desenvolvimento de um algoritmo computacional baseado em técnicas de análise de imagem. O algoritmo faz a contagem de células automaticamente e as classifica como vivas, apoptóticas e necróticas.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 BIOTECNOLOGIA E CULTIVO CELULAR

A biotecnologia conheceu nas últimas décadas do século XX uma expansão intensa, tanto na aquisição de novos conhecimentos, quanto no desenvolvimento de processos tecnológicos e de sua aplicação na área de produção de insumos para a área de saúde e de prestação de serviços (BOROJEVIC, 2006). Ela segue atualmente múltiplas vertentes, freqüentemente complementares e interativas.

- **Biotecnologia agropecuária e de produção de alimentos:** envolve estudos de novos produtos alimentares, de aplicação de microrganismos geneticamente modificados, animais e plantas transgênicas, e melhoria de qualidade dos vegetais e animais relevantes para a indústria agropecuária.

- **Biotecnologia celular aplicada à medicina e saúde:** envolve a área de genômica, com sua extensão para a terapia gênica, diagnóstico, prognóstico, tratamento e prevenção de doenças e de modulação de defeitos metabólicos. Uma área emergente da biotecnologia médica é a engenharia de tecidos e órgãos, associada com a biologia estrutural e a biomimética.

- **Biotecnologia molecular:** envolve estudos e desenvolvimento da química combinatorial de biomoléculas, os processos de biotransformação e aplicação de biocatalisadores, a tecnologia de ácidos nucléicos, a engenharia de proteínas, a aplicação de moléculas menores em controles de metabolismo e em farmacologia. As suas aplicações são essencialmente dirigidas

para a área de obtenção de produtos industriais de alto valor agregado. Na área de saúde, incluem-se nessa vertente a construção e produção de moléculas estruturais usada em engenharia tecidual, e de moléculas recombinantes de ácidos nucleicos e de proteínas, usadas em vacinação humana e animal.

A biotecnologia de moléculas contendo a informação genética trabalha com construções moleculares necessárias para a expressão de proteínas recombinantes em bioprocessos usando os organismos vivos.

A produção em grande escala de proteínas recombinantes já abrange os substitutos de hormônios ou mediadores intercelulares humanos e proteínas virais potencialmente usadas na vacinação ou imunomodulação em humanos e animais.

### **3.1.1 Desenvolvimento da vacina anti-rábica**

A raiva é uma doença que acomete a mamíferos, e que pode ser transmitida aos homens sendo, portanto, uma zoonose. O vírus da raiva causa uma forma fatal de encefalomielite, que frequentemente produz vítimas tanto em seres humanos como em animais domésticos e selvagens. A imunidade pode ser adquirida com a vacinação.

As vacinas da raiva humana são usadas normalmente como um agente terapêutico pós-exposição das pessoas mordidas por animal raivoso, entretanto, países em desenvolvimento não são auto-suficientes na produção de vacinas da raiva para uso humano.

A maioria das vacinas de raiva humana é produzida de cultivo de tecido infectado. Podemos destacar cultivos em células diplóides humanas (CDH) e células VERO (rim de macaco verde africano), cujas vacinas podem ser admitas para uso profilático sem preocupações com efeitos colaterais perigosos. Entretanto, o processo da produção da vacina

da raiva inclui passos que requerem cautela ao lidar com grandes quantias de materiais infecciosos (COSTA et al.2000).

No entanto, com desenvolvimento da engenharia genética está sendo possível o desenvolvimento de vacinas recombinantes preparadas a partir da glicoproteína do vírus da raiva. A glicoproteína do vírus da raiva é antígeno de superfície, responsável pela formação de anticorpos neutralizantes (COLL, 1995).

Esta é uma maneira promissora de combate a raiva, pois produz resposta imune suficiente em animais, embora as pesquisas indiquem a contribuição de uma nucleoproteína (N) para aumentar a resposta imune (SAKAMOTO et al, 1999).

Vários sistemas têm sido estudados para expressão da glicoproteína do vírus da raiva tais como bactérias, leveduras e células eucariontes. Dentre estes, a produção da glicoproteína em células eucariontes tem se demonstrado eficiente imunogenicamente e antigenicamente.

O estudo em células eucariontes tem a vantagem de que não há nenhuma manipulação de vírus vivo. Assim o antígeno da glicoproteína do vírus da raiva pode ser produzido sem risco de infecção para seres humanos ou animais. Além disso, a proteína recombinante é expressa continuamente no sobrenadante da cultura de células que pode ser purificado usando cromatografia de afinidade sem contaminantes celulares.

Diversos autores têm estudado a produção desta glicoproteína G por vírus rábico mutante ou células de mamíferos transfectadas, mas as tentativas utilizando células de inseto não são reportadas.

O interesse nas proteínas recombinantes para o tratamento desta e de diversas outras enfermidades, como o Câncer e a AIDS, cresce a cada ano, sendo assim a produção destas além de serem altamente específicas devem ser produzidas em escalas razoáveis para que o processo seja economicamente viável.

### 3.1.2 Expressão de proteína recombinante

A produção de proteínas recombinantes envolve uma série de passos, iniciando-se com a identificação e caracterização genética da proteína e das suas propriedades bioquímicas, e a definição dos requisitos estruturais para a sua atividade funcional, como o processamento pós-traducional, glicosilação e formação de heterodímeros (BOROJEVIC, 2006).

A produção propriamente dita envolve a escolha do vetor de expressão, a escolha de células em função da complexidade de processamento molecular necessário para a obtenção da proteína funcional, o aperfeiçoamento do bioprocessamento de produção, e a separação, purificação e preparo para o uso da proteína.

Nas últimas duas décadas inúmeros sistemas de expressão de proteínas recombinantes altamente eficiente têm sido desenvolvidos com base na utilização de bactérias, leveduras, células de mamíferos e insetos.

Dentre estes sistemas citados, as células de mamíferos e de insetos têm recebido especial atenção, pois proporcionam as modificações pós-traducionais necessárias à proteína. Quando as mesmas proteínas são produzidas por bactérias ou leveduras faltam a estas, mecanismos celulares para proporcionarem estas modificações químicas.

As células de inseto ainda levam vantagem sobre as células de mamíferos, uma vez que o custo de manutenção é menor, e ainda apresentam alta capacidade de expressão gênica e fácil *scale-up* (PFEIFER, 1998). Em contrapartida, apresentam uma sensibilidade ao cisalhamento maior que as células de mamíferos.

A célula de inseto em conjunto com o sistema vetor de expressão baculovirus (SVEB) tem sido alvo de inúmeros estudos tanto na produção de bioinseticidas quanto na



produção de proteínas recombinantes de interesse industrial. Nesse sistema de produção com o baculovírus, usa-se como contaminante o vírus contendo em seu genoma o gene de interesse e, durante a fase tardia do processo de infecção, a proteína de interesse é excretada.

Apesar de serem obtidos altos níveis de expressão, a infecção gera uma série de problemas para a maquinaria celular. SANDERSON et al. (1999) lista algumas dificuldades com o SVEB como a produção de proteases, não secreção de produto, lise da célula e incompleta glicosilação. Sendo o processo de glicosilação uma das etapas pós-traducionais mais relevantes quanto ao uso terapêutico destas proteínas em seres humanos (IKONOMOU et al., 2003).

Devido a estes inúmeros problemas relacionados ao sistema de expressão por infecção, existem inúmeros estudos tentando, através de plasmídeos, criar uma linhagem celular estável que expresse bem as proteínas desejadas.

KEITH et al. (1999) destacam em seu trabalho nove linhagens (Tabela 3.1) de células de inseto com potencial para o sistema de produção de proteína recombinante que podem ser obtidas comercialmente. Eles detiveram seus estudos em apenas cinco linhagens (Bm-5, High-Five, IPLB-LdFB, IZD-MB-0503, Sf-21).

Tabela 3.1: Lista das nove linhagens de células de inseto investigadas com potencial para sistema de expressão de proteínas recombinantes.

Linhagem de células	Espécies
Bm-5	<i>Bombyx mori</i>
Bm-N4	<i>Bombyx mori</i>
Hihg-Five	<i>Trichoplusia ni</i>
IAL-PiE	<i>Plodia interpunctella</i>
IPLB-HvE6	<i>Heliothis virescens</i>
IPLB-LdFB	<i>Lymantria dispar</i>
IZD-MB-0503	<i>Mamestra Brassicae</i>
Schneider's line 2	<i>Drosophila melanogaster</i>
Sf-21	<i>Spodoptera frugiperda</i>

Dentre as células de inseto que estão sendo estudadas como hospedeiros eucarióticos para a produção de proteínas recombinantes, a célula de *Drosophila melanogaster*, atualmente, tem recebido especial atenção devido a suas vantagens estruturais perante outras células.

### 3.1.3 Cultivo celular (célula de inseto)

Dentre as técnicas de cultivo de células animais existente, as mais utilizadas são cultura em monocamada, suspensão e aderidas a partículas (microcarregadores) (RIZZO et al., 1983).

Culturas em monocamadas são aquelas nas quais as células aderem a uma superfície sólida, sendo o meio de cultura líquido. Já as células em suspensão podem sobreviver e proliferar sem a necessidade de estarem aderidas a um substrato.

Uma vez que se deseja um aumento de escala, o método mais indicado é o de culturas em suspensão, uma vez que é mais fácil de monitorar, possui menor custo, requer menos espaço e as condições ambientais são mais homogêneas (FRESHNEY, 1994).

Células de inseto não são geralmente dependentes de ancoramento (adesão a um substrato), elas se adaptam facilmente a condições de cultura em suspensão, o que já difere, por exemplo, de células de mamíferos que necessitam o desenvolvimento de microcarregadores para serem cultivadas em suspensão.

A Tabela 3.2 apresenta as comparações entre culturas em monocamada e em suspensão.

As células de inseto *Drosophila melanogaster* S2 crescem bem tanto em cultivos em monocamada (frascos T) como em suspensão (frascos Erlenmeyers, Schotts, *spinners* e biorreatores) (SONDERGAARD, 1996; VALLE et al., 2001; ARANTES, 2004; CHA et al., 2005). Isto demonstra a versatilidade do uso destas células nas pesquisas com proteínas recombinantes.

Tabela 3.2: Resumo das Vantagens e Desvantagens da Cultura em Monocamada e Suspensão

	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Cultura em Monocamada (aderidas)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Manutenção fácil e de baixo custo;</li> <li>- Permite uma fácil inspeção visual com o uso do microscópio invertido;</li> <li>- Facilidade na troca de meio de cultivo;</li> <li>- A razão meio/célula é ajustada mais facilmente durante um experimento.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Manipulação mecânica (passagens) pode diminuir a viabilidade;</li> <li>- Requer múltiplos frascos para expressão em larga escala;</li> <li>- A densidade de células é limitada devido à monocamada. Isto pode limitar a produtividade de proteína por unidade de volume de cultura celular.</li> </ul>
<b>Cultura em Suspensão</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Facilita o aumento de escala de expressão de proteínas;</li> <li style="padding-left: 40px;">- Requer menos espaço;</li> <li>- Mais alta densidade de células. Isto pode aumentar a produtividade volumétrica de cultura celular;</li> <li>- Maior oxigenação e manipulação mínima podem aumentar a viabilidade. As viabilidades são normalmente maiores que 98%;</li> <li>- Células S2 não requerem adaptação e prontamente passam de culturas aderidas à suspensão e vice-versa.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Requer <i>spinners</i>, incubadoras. O <i>start up</i> pode ser de maior custo;</li> <li>- Requer diariamente a contagem de células e determinação da viabilidade para seguir padrões de crescimento;</li> <li>- Pode ser difícil manter a esterilidade.</li> </ul>

Fonte: Adaptado de Growth and Maintenance of Insect Cells Lines. Insect Cell Lines – Invitrogen Life Technologies (2002).

### 3.1.4 Célula de *Drosophila melanogaster* (S2)

A célula de inseto *Drosophila melanogaster* Schneider-2 (S2) descende de uma cultura primária de estágio tardio (20-24 horas) de embriões de *Drosophila melanogaster* (SCHNEIDER, 1972 *apud* INVITROGEN, 2003), e têm sido usadas progressivamente para expressão de proteínas heterólogas. Existem hoje por volta de 94 linhagens cultiváveis de *Drosophila*, das quais 12 são facilmente obtidas, mas a maioria dos estudos tem utilizado a

linhagem Schneider S2 e S3 ou derivadas da linhagem Kc de Ohanession (Mc CARROLL & KING, 1997).

Um aspecto único das células de inseto S2 é a possibilidade de completar cerca de 1000 cópias de células transfectadas em um evento de transfecção–seleção. Portanto, um longo período de amplificação plasmídica e seleção de células clones não são requeridos (DEML et al., 1999). O mesmo não se vê em células de mamíferos, uma vez que estas requerem meses de seleção para conseguir um alto número de cópias de gene alvo e altos níveis de produção de proteína.

Outra característica importante das células S2 é a capacidade de recuperação de grandes intervalos de hipóxia sem sofrer dano algum e o crescimento em suspensão de culturas com altas densidades celulares como mostra o trabalho de SWIECH (2005). Elas também podem tanto ser cultivadas em meio suplementado com soro fetal bovino (FBS – *fetal bovine serum*) como serem adaptadas para cultivo em meio livre de soro (SFM – *serum free medium*) (ARANTES, 2004).

A Tabela 3.3 apresenta algumas proteínas que foram expressas de maneira satisfatória por células de *Drosophila melanogaster*.

Além disso, para o cultivo de células de inseto, não são necessárias incubadoras com CO<sub>2</sub> e umidade controlada, a temperatura de cultivo varia em torno de 25 a 30 °C.

Tabela 3.3: - Lista de algumas proteínas produzidas por células de *Drosophila* S2.

<b>Proteína</b>	<b>Referência</b>
Dopamina humana $\beta$ -hidroxilase	(LI et al., 1996)
HIV-1 gp120	(CULP et al., 1991)
IgG1 Humano	(KIRKPATRICK et al., 1995)
Interleucina Humana 5 (IL5)	(JOHANSON et al., 1995)
Interleucina Humana 12 (IL12)	(LEHR et al., 2000)
Receptor Glucagon Humano	(TOTA et al., 1995)
H-ras (Val <sup>12</sup> mutante)	(JOHANSEN et al., 1989)
Receptor GABA <i>Drosophila</i>	(MILLAR et al., 1994)
Caopitina <i>Drosophila</i>	(KRANTZ & ZIPURSKY, 1990)
$\alpha\beta$ heterodímeros MHC classe II I-E <sup>d</sup>	(WLLNY et al., 1995)

Fonte 1: Invitrogen Life Technologies - Catálogo nº R690-07, versão F, 050202, 28-0172.

### 3.1.5 Estados fisiológicos da célula

O estado fisiológico é quantificado por um vetor composto de várias variáveis de processo que fornecem informações significativas sobre o estado celular.

A eficiência do bioprocesso é fortemente influenciada por mudanças no estado celular, o qual deve ser monitorado, interpretado e, se possível, propriamente manipulado. O monitoramento e controle da fisiologia celular são considerados as questões mais desafiadoras da engenharia de processo moderna. (KONSTANTINOV, 1996).

O ponto central da otimização de um processo é o estudo das interações entre células e os componentes químicos, bioquímicos e físicos do ambiente da cultura, e o impacto destes fatores na produtividade da proteína, na proliferação e morte das células. Entretanto a

determinação do total de células e sua viabilidade estão entre as mais importantes medidas durante ambas as fases, de crescimento e de produção, em cultivos com células de inseto (AGATHOS, 1996).

A morte celular em cultivos por muito tempo foi designada apenas pelo termo necrose, de acordo com os pesquisadores da área. Hoje demonstra-se que muitas das linhagens de células de mamífero e também linhagens de células de insetos, usadas na produção de proteínas recombinantes em escala industrial, submetem-se realmente à morte programada (apoptose) no ambiente do biorreator (AL-RUBEAI et al, 1998; COWGER et al., 1999; MENESES-ACOSTA et al., 2001).

Um dos fatores que pode ser identificado como potencial indutor de apoptose é o uso de sistemas baseados em vírus para expressão da proteína e de agentes citostáticos.

Os dois tipos de morte celular, necrose e apoptose, são descritos mais detalhadamente nos itens a seguir.

### **3.1.6 Necrose**

Necrose é a morte patológica ou acidental da célula, isto é, quando a célula é impedida de manter seus processos vitais por lesões físicas ou químicas causadas por fatores externos, como temperaturas extremas, radiação, traumas, produtos tóxicos e falta de oxigênio. Esse tipo de morte celular foi o único conhecido pelos cientistas mais antigos.

Na necrose a célula normalmente incha e as organelas do citoplasma, em particular as mitocôndrias, são danificadas, mas o núcleo não sofre alterações significativas. (Figura 3.1). Tais lesões internas impedem o controle do equilíbrio interno: a água e alguns íons (em especial sódio e cálcio), normalmente bombeados para fora, fluem livremente para dentro da célula, que incha e se rompe. A ruptura libera no meio o conteúdo celular, rico em

proteases (enzimas que hidrolisam outras proteínas) e outras substâncias tóxicas (ABASTADO, 1996). Além da toxicidade direta para as células vizinhas, o derrame gera substâncias que atraem células do sistema imune, causando intensa reação inflamatória: alguns tipos de glóbulos brancos (em especial neutrófilos e macrófagos) convergem para o tecido em necrose e digerem as células mortas.

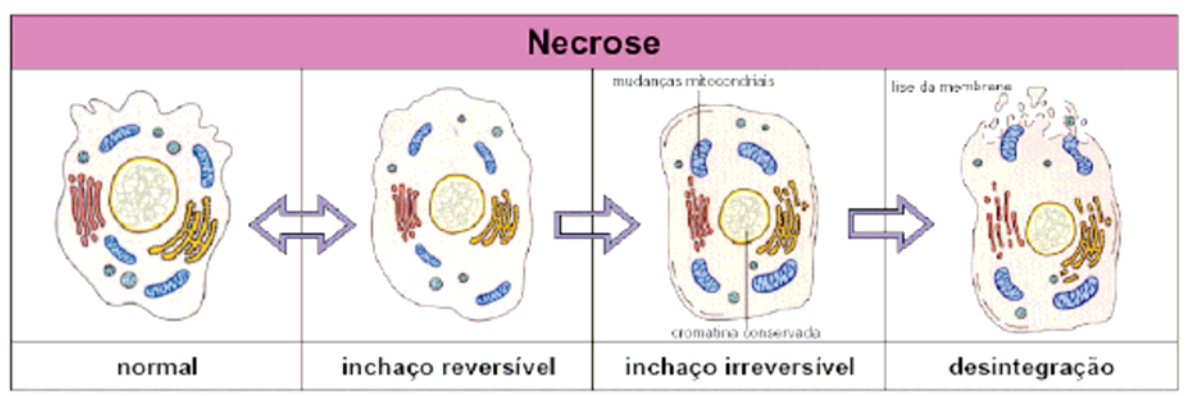


Figura 3.1: Esquema geral do processo de necrose em células animais (BioAgency 2004)

### 3.1.7 Apoptose

A apoptose é um processo fisiológico normal e totalmente regulado. Em grego arcaico, a palavra apoptose significa o ato de cair, e foi escolhida porque sugere perdas (a morte celular, no caso) benéficas, necessárias ao bom funcionamento e à sobrevivência do organismo (HORTA et al, 1999).

Essa noção foi inicialmente proposta por Kerr et al (1972) que descreveram os diferentes aspectos das células na morte programada e na patológica, seguindo análises de amostras de tecidos tratadas com radioterapia. Em outros estudos também sugeriram que na apoptose ao contrário do que acontece na necrose, a célula participa da própria destruição, e que poderia haver ligação entre a ativação incorreta do “suicídio celular” e doenças



degenerativas (como o mal de Alzheimer) e entre sua inibição incorreta e doenças replicativas (como o câncer).

As idéias inovadoras geradas pelo grupo de Kerr no início dos anos 70 passaram despercebidas por mais de uma década, até que suas previsões começaram a ser confirmadas. Hoje, inúmeros cientistas pesquisam a apoptose e, embora muitas questões continuem sem resposta, vários princípios básicos já foram descobertos.

Ao contrário da necrose, na apoptose a célula encolhe-se, destaca-se das células vizinhas e começa a apresentar bolhas em sua superfície (processo chamado de zeiose). A membrana e as organelas mantêm sua estrutura intacta e não há alterações evidentes no citoplasma. O núcleo, porém, sofre mudanças dramáticas: normalmente dispersa, a cromatina é condensada ao longo da membrana nuclear, depois forma esferas em formas crescentes. Subsequentemente a célula é fragmentada em estruturas membranosas compactas chamadas de corpos apoptóticos, e então são fagocitadas por macrófagos e removidas do tecido sem gerar uma resposta inflamatória. A Figura 3.2 apresenta um esquema do processo de apoptose em célula animal.

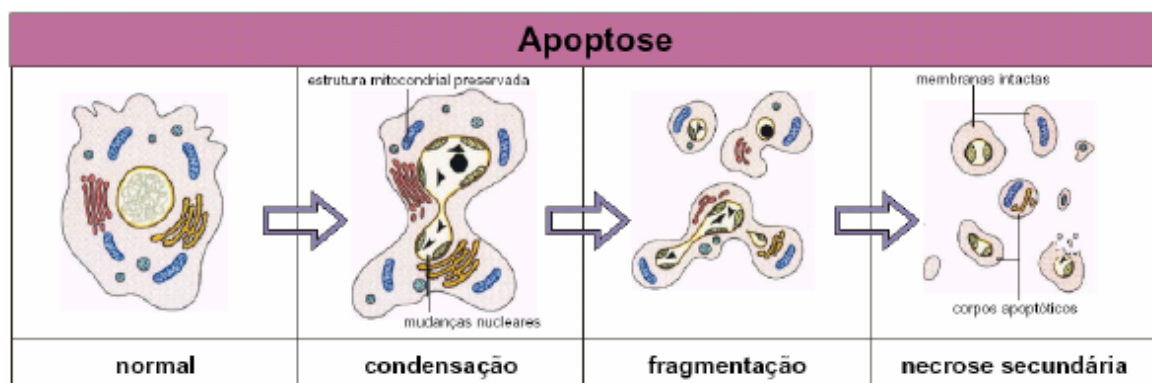


Figura 3.2: Esquema geral do processo de apoptose em células animais (BioAgency, 2004)

A expressão de vários genes tem sido associada à indução de morte celular em bioprocessos com células animais. Há um grande interesse em definir quais são os genes que bloqueiam e os que ativam a morte celular programada.

Entretanto, para cultivo de células de inseto as pesquisas estão focadas em determinar os fatores-chaves não relacionados aos genes, que possam estar associados ao aparecimento de apoptose.

Diversos métodos estão disponíveis para avaliar morte celular em culturas, mas ou eles são destrutivos para as culturas ou são incapazes de diferenciar entre apoptose e necrose (PARK et al., 2000). Corantes celulares fluorescentes, monitorados por microscopia de fluorescência oferecem vantagem nesse aspecto.

### **3.1.8 Viabilidade e Corantes celulares**

A concentração de células viáveis em um cultivo é uma das medidas mais importantes para quantificação de bioprocessos (RIESEBERG et al, 2001). Existem diversas maneiras de se obter viabilidade, sendo a mais comum a detecção da integridade da membrana. Membranas defeituosas levam a perda de componentes intracelulares tais como proteínas (KOLBER et al, 1988).

A integridade da membrana pode ser detectada por exclusão de corantes ou retenção de corante. Exclusão por corantes tingem ácidos nucleicos em células com membranas defeituosas (geralmente consideradas como sendo células mortas). Os corantes mais comuns usados são Iodeto de Propídio e Brometo de Etídio, que tingem DNA e RNA.

Corantes com uma alta eficiência tem sido desenvolvidos para organismos com baixo conteúdo de DNA. Por exemplo, o corante fluorescente Sytox Green tem sido usado para monitorar viabilidade bacteriana (ROTH et al, 1997). Em contraste, o método de

retenção utiliza substratos esteráticos não fluorescentes que servem como experimentos de viabilidade. O corante é degradado por enzimas intracelulares (encontradas somente em células vivas) para produzir produtos fluorescentes (ex. fluorescein diacetato).

A interação da célula com o corante pode ser descrita esquematicamente em três níveis:

- 1. Nível celular** – no qual as células são tingidas com o corante
- 2. Nível subcelular** – no qual organelas ou compartimentos intracelulares são tingidos
- 3. Nível molecular** – no qual moléculas da célula interagem com o corante

A estrutura química do corante define se ele ficará na membrana plasmática, na superfície da célula ou se ele progredirá dentro do citoplasma, possibilitando entrar em alguns compartimentos celulares. Esses fatores podem ser determinados pela escolha certa do corante.

O corante ideal para quantificação de morte celular deve fornecer informação quantitativa da morte celular e não ser destrutivo para a cultura. O desenvolvimento da morte celular deve ser acessível *online* por vários dias na mesma cultura. Em adição, também deve diferenciar entre apoptose e necrose fornecendo um entendimento dos caminhos que levam à morte celular. Por último, a quantificação deve ser fácil, rápida e aplicável a várias condições de culturas (GAWLITTA et al, 2004).

Atualmente os corantes fluorescentes mais utilizados nas análises de morte celular são o Laranja de Acridina e Brometo de Etídio, que em conjunto são capazes de diferenciar a morte por apoptose da morte por necrose. Mesmo sendo uma técnica amplamente utilizada, são muito nocivos para a cultura. Pesquisas para síntese de novos tipos de corantes menos tóxicos vem sendo desenvolvidas nos últimos anos.

### 3.1.9 YO-PRO-1 (YP) e Iodeto de Propídio (IP)

Recentemente, uma nova série de corantes intercalantes de DNA (YOYO, YO-PRO, BOBO, BOPRO, TOTO, TOPRO e derivados) que fluorescem sob fixação com o próprio DNA, têm sido sintetizados. Eles foram os primeiros utilizados em substituição ao brometo de etídio em gel de agarose, pois têm uma razão de fluorescência alta (Glazer e Rye, 1992). O corante YO-PRO-1 (YP) tem sido usado desde a avaliação de conteúdo do DNA celular após permeabilização com metanol até a detecção de células mortas (Haughland, 1992-1994).

No trabalho de Idziorek et al (1995), eles demonstraram que na ausência de permeabilização celular, o YP pode ser usado para a detecção de apoptose induzida por vários agentes tais como glucocorticóides, irradiação ou remoção de fatores de crescimento. Ele é um corante com fluorescência verde, que entra na célula, uma vez que sua membrana plasmática já alcançou um certo grau de permeabilidade. A membrana celular se torna parcialmente permeável durante a apoptose e YP pode entrar livremente na célula e corar seus ácidos nucleicos com um incrível aumento na intensidade da fluorescência.

Apoptose pode ser visualizada tanto por citometria de fluxo quanto por microscopia de fluorescência. Usando a microscopia de fluorescência, as células coradas com YP demonstraram características morfológicas de células submetidas a apoptose tais como encolhimento nuclear e fragmentação.

Uma característica importante deste corante que o diferencia de outros corantes nucleares também usados para detecção de apoptose é que ele não penetra em células vivas, que é um fator importante na quantificação de morte e na viabilidade celular.

Diferentes caminhos podem levar à morte celular por necrose e um deles é a apoptose. Mas necrose também pode ocorrer “espontaneamente”. Para ser capaz de

discriminar entre apoptose e necrose, um corante adicional é requerido (GAWLITTA et al, 2004). Se apoptose pode ser detectada, é possível se reconhecer os efeitos contrários da viabilidade celular mais cedo no processo e determinar se o caminho apoptótico precede ao necrótico.

Dentre os corantes mais utilizados, o Iodeto de Propídio (IP) é aplicado para corar necrose com sua fluorescência vermelha. Esse corante pode apenas atravessar membranas de células necróticas e não aquelas de células apoptóticas. IP não tinge apenas DNA, mas também RNAs presentes no citoplasma (SUZUKI et al, 1997). A membrana celular de células viáveis é impermeável para esse corante.

Até agora, uma combinação desses dois corantes, disponíveis comercialmente (Molecular Probes, V13243), tem sido usada em diversos trabalhos para discriminar entre ambos estágios de morte celular. Essa técnica foi aplicada para seções de tecido fixas (SUZUKI et al, 1997), em experimentos em micropratos (WRONSKI et al, 2002), em medidas com citometria de fluxo (JEROME et al, 2001, McGUIRE et al, 2001) e em tecidos 3D (BOFFA et al, 2005).

A análise de imagens dos cultivos celulares utilizando essa combinação de corantes obtidas através de microscopia de fluorescência tem sido uma técnica muito útil para a quantificação celular.

### **3.1.10 Importância da análise de imagens na cultura de células de inseto**

A metodologia mais comum de obtenção da viabilidade celular utiliza o microscópio óptico para contagem de células via hemacitômetro. Porém, se esta contagem for realizada por métodos manuais leva a um procedimento trabalhoso e a um considerável grau

de subjetividade nos resultados e conseqüentemente a elevados erros estatísticos. (BITTNER et al, 1998).

Nos últimos 30 anos muitos métodos para estimação *online* têm sido apresentados como alternativas, merecendo destaque a técnica de análise de imagens. Mas devido aos rígidos requerimentos da indústria de biotecnologia, muitos deles não tem encontrado aplicações práticas na indústria.

O fácil acesso à computadores de baixo custo, bem como o aumento da velocidade de processamento e a criação de poderosos algoritmos de análise e processamento tornou a técnica de análise de imagens uma poderosa ferramenta no controle de bioprocessos.

Desta forma, a aplicação das técnicas de análises de imagens com o intuito de quantificar a biomassa e caracterizar a fisiologia da célula, vem sendo objeto de muita pesquisa.

No desenvolvimento de técnicas de análise de imagens para o monitoramento de bioprocessos, encontrou-se vantagens na digitalização das imagens das estruturas celulares ao invés da utilização de imagens analógicas das câmeras tradicionais em razão da maior nitidez e precisão obtidas. A princípio, todas as técnicas baseadas na microscopia óptica (luz direta, campo escuro, fase de contraste, contraste de interferência, fluorescência, etc...) podem ser aplicadas nas técnicas de análise de imagens, fornecendo uma ampla gama de informação a respeito da célula (BITTNER et al. 1998).

Pons et al. (1998) fizeram uma revisão bibliográfica detalhada a respeito de aplicações de corantes em células, com a utilização conjunta de técnicas de análises de imagens e de técnicas de microscopia óptica. Concluíram que a ação conjunta destas três técnicas oferece um grande potencial para a investigação da fisiologia de células.

O uso da técnica de análise de imagens já foi bem sucedido em culturas de células de inseto. Akhnoukh et al. (1996), cultivou células de inseto de *Spodoptera frugiperda*

(Sf9) para produção de  $\beta$ -galactosidase recombinante em condições de cultivo bem controladas. A concentração total de células foi monitorada *online* por medidas de densidade óptica e pela medição de viabilidade celular *in situ* pelas medidas da intensidade de cultura de fluorescência de plano de fundo corrigido, utilizando-se Iodeto de Propídio.

Pelo exposto nos parágrafos anteriores, percebe-se então a importância do uso de técnicas de análise de imagens para o monitoramento de concentração celular em cultivos de células de inseto.

O presente trabalho versará sobre o estudo das técnicas de análise de imagem no cultivo de células de *Drosophila melanogaster*, devido à grande importância biotecnológica dessa célula e a ampla vantagem da técnica utilizada.

## **3.2 A IMAGEM DIGITAL**

### **3.2.1 Definições**

A maioria das imagens é originada a partir de uma forma óptica. Uma imagem óptica pode ser convertida para um sinal elétrico com uma câmera de vídeo ou similar. Essa conversão muda a representação da imagem de uma forma de luz óptica para um sinal elétrico que varia continuamente. Esse sinal elétrico é chamado de sinal analógico. Assim, a imagem analógica pode ser digitalizada e transformada em uma forma de dados digital.

Uma imagem digital pode ser definida como uma função  $I(x,y)$  bidimensional, definida numa certa região. Para a maior parte das imagens, sua região de definição é um subconjunto limitado do plano e os valores assumidos pela função são números inteiros, limitados e não negativos. Em geral, essa função mede, de alguma forma, a energia refletida por objetos e captada por um sistema de obtenção de imagens.

Ao valor  $I(x,y)$  da imagem no ponto  $(x,y)$  dá-se o nome de nível de cinza (grau de luminosidade do ponto), enquanto que  $x$  e  $y$  representam as coordenadas espaciais. Cada ponto na grade bidimensional que representa a imagem digital é denominado elemento de imagem ou *pixel* (abreviação de “Picture Element”). A Figura 3.3 mostra a representação de um *pixel*.

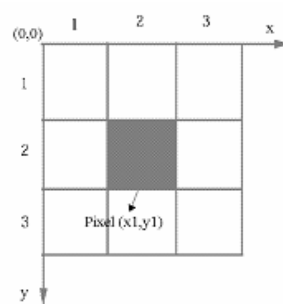


Figura 3.3: Representação unitária do *Pixel*

A definição de uma imagem indica o número de matrizes de *pixels* que compõem a imagem. A imagem em tons de cinza possui apenas um plano contendo o valor de luminosidade (“graus de cinza”) do *pixel* na sua respectiva coordenada, enquanto uma imagem colorida possui três planos (padrão RGB: um para o componente vermelho ou Red, outro para o componente verde ou Green e outro para o componente azul ou Blue).

Os *pixels* possuem vizinhança, que pode ser determinada como vizinhança-de-quatro e vizinhança-de-oito (Fig. 3.4), sendo que, na primeira, apenas os localizados na região superior, inferior e lateral do *pixel* central são considerados como vizinhos. Na vizinhança-de-oito, as diagonais em relação ao *pixel* central também são consideradas (GONZALEZ et al., 1992).





Figura 3.4: Relação de vizinhança entre *pixels*, vizinhança-de-quatro e vizinhança-de-oito

Um conceito importante registra a conectividade entre *pixels*, destacando a detecção de bordas em objetos e os componentes da região de uma imagem. A conectividade pode ser estabelecida entre os *pixels* como conectividade-de-4, conectividade-de-8 ou conectividade mista (quando apenas um caminho pode ser tomado entre os *pixel*). Os *pixels* apresentam conectividade quando evidenciam alguma similaridade entre si, como o nível de cinza (GONZALEZ et al., 1992; CENTENO, 2005). A Figura 3.5 mostra esses tipos de conectividade.

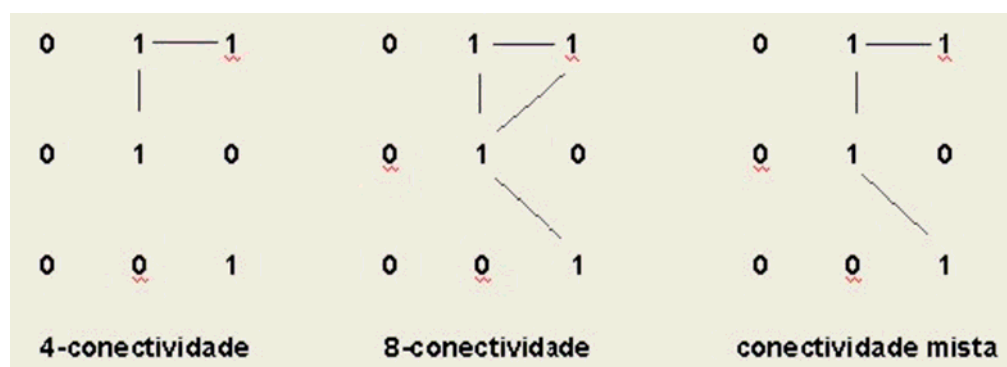


Figura 3.5: Relação de conectividade entre *pixels*.

A qualidade de uma imagem digital está diretamente relacionada com o número de *pixels*, juntamente com os valores de luminosidade (brilho) alocados na imagem. Esses aspectos são conhecidos como resolução da imagem.

Resolução da imagem é a capacidade da imagem digital de representar os elementos da cena original. Para imagens digitais, as características de resolução podem ser

divididas em duas partes primárias – a resolução espacial e a resolução de luminosidade ou brilho (ou resolução de cor, se a imagem é colorida).

O termo resolução espacial é usado para descrever quantos *pixels* constituem a imagem, ou seja, o número de linhas e colunas de *pixels* utilizadas em sua representação. Uma imagem  $y_m$  versus  $x_n$  possui  $n$  *pixels* ao longo de seu eixo horizontal e  $m$  *pixels* ao longo do eixo vertical. Quanto mais *pixels* tiver a imagem, maior é sua resolução espacial.

Cada *pixel* na imagem digital representa a intensidade da imagem original na localização espacial onde está representada. O conceito de resolução de luminosidade mostra o quão exatamente o brilho do *pixel* digital pode representar a intensidade da imagem original.

Para ser passível de manipulação por computadores digitais, é necessário que a imagem esteja no formato digital, o que corresponde, em geral, a um grande volume de dados. Uma imagem de televisão requer cerca de 500 x 500 amostras quantizadas com 256 níveis (8 bits)

### 3.2.2 Análises Morfológicas

Análises morfológicas são transformações que extraem e alteram a estrutura dos objetos em uma imagem. São utilizadas para diversas finalidades, entre elas tem-se: preparação de objetos em análises quantitativas, observação de geometrias de regiões, identificação de dados de interesse, etc.

Algumas das operações de análises mais utilizadas estão exemplificadas na Figura 3.6 e serão definidas nos itens a seguir.

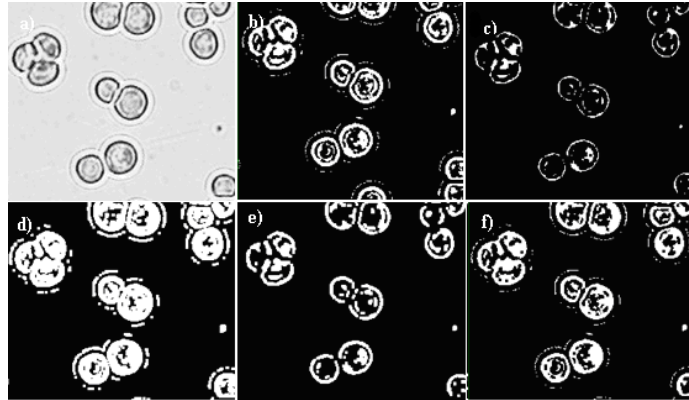


Figura 3.6: Várias operações de análise morfológica da célula de inseto *S. frugiperda* (Sf9): a) imagem em tons de cinza original; b) Thresholding; c) Erosão; d) Dilatação; e) Abertura; f) Fechamento

### 3.2.3 “Thresholding”

Consiste em segmentar uma imagem em tons de cinza, em duas regiões: uma região objeto e uma região do plano de fundo. Este é realizado pelo ajuste de 1 para todos os *pixels* que pertencem a um certo intervalo de tons de cinza, chamado de intervalo de “threshold”. Todos os outros *pixels* na imagem são ajustados para 0 pertencendo ao plano de fundo. Esta operação pode ser usada para extrair áreas que correspondem a estruturas significativas na imagem e para focar as análises nestas áreas. Ver Figura 3.6-b.

### 3.2.4 Erosão

A operação de erosão (Figura 3.6-c) consiste em eliminar *pixels* isolados no plano de fundo, erodindo o contorno dos objetos em respeito à base definida como elemento estruturante.

Elemento estruturante pode ser definido por uma estrutura com diferente formas, como por exemplo, retangular ou hexagonal binária (composta apenas em tons preto e branco). É utilizado para determinar qual vizinho de um *pixel* contribui para seu novo valor.

Quando o elemento estruturante está centrado em um *pixel*  $P_0$ , este valor passa a ser uma função de seus *pixels* vizinhos. Se o valor de  $P_0$  for 1, seus vizinhos são ajustados no mesmo valor. Se o valor do *pixel* é 0, simplesmente é descartado pela função. Pode-se utilizar o elemento estruturante para pesar o efeito destas funções na forma e na borda dos objetos.

### 3.2.5 Dilatação

A dilatação tem um efeito reverso de uma erosão porque dilatar objetos é equivalente a erodir o plano de fundo. Esta função (Figura 3.6-d) elimina finos buracos isolados em objetos e expande o contorno dos objetos com respeito a sua base definida como elemento estruturante.

### 3.2.6 Abertura (Open)

A operação de abertura é uma erosão seguida por uma dilatação. Ela remove pequenos objetos e “alisa” suas bordas. Exemplificada na Figura 3.6-e.

Esta operação não altera a área e a forma dos objetos significativamente porque a erosão e a dilatação são transformações duais. As bordas removidas pela erosão são restauradas pela dilatação. Contudo, pequenos objetos que desaparecem durante a erosão não reaparecerão depois da dilatação.

### 3.2.7 Fechamento (Close)

A operação de fechamento é uma dilatação seguida de uma erosão (ver exemplo na Figura 3.6-f). Ela preenche pequenos buracos e “alisa” suas bordas.

Esta operação também não altera significativamente a área e a forma dos objetos. Bordas expandem pela dilatação e são reduzidas pela erosão. Contudo, pequenos buracos preenchidos durante a dilatação não reaparecem depois da erosão.

### 3.2.8 Softwares para tratamento de imagem

O tratamento de imagens só é possível através da escolha de *softwares* que se ajustam melhor a metodologia que se deseja.

Nessa linha, o MATLAB (*MATrix LABoratory*) é um software interativo de alta performance voltado para o cálculo numérico cujo elemento básico de informação é uma matriz que não requer dimensionamento. Esse sistema permite a resolução de muitos problemas numéricos em apenas uma fração do tempo que se gastaria para escrever um programa semelhante em linguagem Fortran, Basic ou C. Os elementos de entrada no programa constituem as matrizes para a representação das imagens no computador. As principais áreas de atuação deste programa incluem: otimização, programação, manipulação algébrica, redes neurais, processamentos de sinais entre outras áreas. Nesta pesquisa, utilizou-se o MATLAB para implementação de um algoritmo de quantificação de imagens

### **3.2.9 Processamento de Imagens Digitais**

A área de processamento de imagens digitais é interdisciplinar, derivando seus procedimentos da Ótica, Neurofisiologia, Colorimetria, Engenharia Elétrica e Ciência da Computação.

Por Processamento de Imagens Digitais entende-se a manipulação de uma imagem por computador de modo que a entrada e a saída do processo sejam imagens.

A área de processamento de imagens digitais tem atraído grande interesse nas últimas duas décadas. A evolução da tecnologia de computação digital, bem como o desenvolvimento de novos algoritmos para lidar com sinais bidimensionais está permitindo uma gama de aplicações cada vez maior (MASCARENHAS, 1996).

Como resultado dessa evolução, a tecnologia de processamento de imagens digitais vem ampliando seus domínios, que incluem as mais diversas áreas, como por exemplo: análise de recursos naturais e meteorologia por meio de imagens de satélites; transmissão digital de sinais de televisão; análise de imagens biomédicas, incluindo a contagem automática de células e exame de cromossomos, etc.

No campo de bioprocessos de interesse industrial, a análise digital de imagens vem se mostrando uma promissora técnica de quantificação do crescimento para o monitoramento e controle do processamento.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Materiais**

#### **4.1.1 Células de inseto**

Foi utilizada uma linhagem de célula recombinante de *Drosophila melanogaster* Schneider-rS2 transfectada com o gene da glicoproteína do vírus da raiva cedida pelo Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan de São Paulo.

#### **4.1.2 Meio de cultura**

O meio de cultura utilizado foi o meio comercial livre de soro Sf-900 II SFM da Gibco.

#### **4.1.3 Corantes para identificação do tipo de morte celular**

Foi utilizada uma solução aquosa de 0,4% Azul de Tripan (Trypan Blue, Sigma T-6146), como corante para ser utilizado com o método de exclusão de corante para determinação da concentração e viabilidade celular durante os experimentos.

Também foram utilizados os corantes fluorescentes: Iodeto de Propídio (P3566, Molecular Probes)/YO-PRO-1 iodide (491/509 nm, Y3603, Molecular Probes), da marca Invitrogen e Laranja de Acridina ( $C_{17}H_{20}ClN_3 \cdot 1/2ZnCl_2$ )/Brometo de Etídio

(C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>Br), da marca Sigma, para a análise de células apoptóticas, necróticas e viabilidade pelo método da fluorescência.

#### 4.1.4 Solução Tampão Salina

A solução tampão com pH 7,4, é fornecida pela Cultilab, apresentando a composição descrita na Tabela 4.1. Esta solução foi utilizada para diluir as amostras retiradas dos cultivos para identificação da morte celular.

Tabela 4.1: Composição da solução tampão salina utilizada na diluição de amostras para determinação da concentração celular

Composto	Quantidade
NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 g
Água destilada	q.s.p. 1L

#### 4.1.5 Equipamentos

##### 4.1.5.1. Câmara asséptica

Foi utilizada câmara asséptica de fluxo laminar Sterilgard III, classe II da Baker Company (USA), provida de lâmpada germicida UV, em todas as etapas nas quais eram manipuladas as células.



#### 4.1.5.2. Microscópio

Microscópio de campo invertido da marca Olympus, modelo CK3 foi utilizado para a contagem de células por exclusão de corante.

Microscópio óptico Olympus BX 50 (campo direto), acoplado a uma câmera de vídeo SONY CCD-Iris DXC-107A com placa de aquisição de imagens vídeo modelo Blaster (resolução 480x640 *pixels*), foi utilizado na obtenção de imagens da cultura para quantificar células necróticas e apoptóticas através do método de fluorescência. O filtro que se utilizou para a aquisição foi o de luz azul.

#### 4.1.5.3. Autoclave

As vidrarias e demais utensílios envolvidos na realização dos cultivos de células foram esterilizados em autoclaves da marca FABBE LTDA, por 30 minutos a 121°C.

#### 4.1.5.4. Câmara de incubação rotatória

Utilizou-se em todas as etapas de preparação de amostras o incubador rotatório (*shaker*) marca Superohm. Um suporte foi acoplado na parte interna do equipamento com capacidade para 8 frascos T de 25 cm<sup>2</sup>, uma vez que os frascos T de cultura não devem ser agitados e, no entanto, devem ter sua temperatura controlada.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Procedimento experimental para o cultivo das células

O seguinte procedimento, apresentado na Figura 4.2, foi adotado nos experimentos realizados para as células de rS2:

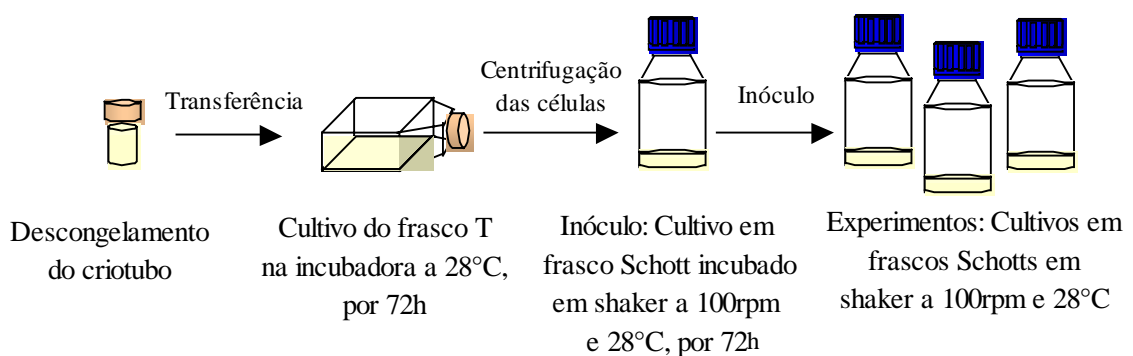


Figura 4.1: Representação esquemática do procedimento seguido nos experimentos de cultivo celular

As células que estavam estocadas em nitrogênio líquido (-196 °C) foram ativadas e, depois de recuperar sua atividade normal foram inoculadas em 5 mL de meio livre de soro, SF-900 II (Gibco), em frascos T de 25 mL de capacidade. O meio de cultura (normalmente conservado em geladeira para evitar sua degradação) utilizado foi levado à temperatura ambiente (25 °C) antes do uso.

As células no frasco T foram colocadas para incubação à temperatura de 28 °C sem agitação e cultivadas durante 3 dias para recuperar completamente suas atividades normais.

Após este período de incubação os experimentos seguiram duas etapas. A primeira etapa consistiu no cultivo em meio estático, onde as células foram mantidas no frasco T durante todo o tempo de cultivo até atingirem a fase estacionária.

A segunda etapa consistiu no cultivo dinâmico, onde após o período de incubação em frasco T, as células foram centrifugadas e ressuspensas em um frasco Schott de 100 ml com um volume de trabalho de 20 ml a 100 rpm no shaker durante 2 dias, afim de que se adaptassem a agitação e atingissem a fase exponencial para então serem utilizadas como inóculo para o experimento.

Nas duas etapas, amostras para determinação de concentração e avaliação da viabilidade celular foram retiradas diariamente. Os frascos T e os Schotts dos experimentos foram abertos somente dentro da câmara asséptica todos os dias para aeração.

#### **4.2.2 Avaliação de métodos para análise de viabilidade**

##### **4.2.2.1. Determinação da concentração e viabilidade celular**

A contagem manual de células, foi realizada através do método de exclusão de corante azul de Tripan (Trypan Blue Sigma) (FRESHNEY, 1994). Neste método as concentrações de células viáveis e não viáveis foram determinadas pela contagem em hemacitômetro (câmara de Neubauer).

Foi retirada uma alíquota de 20 $\mu$ L de cada frasco (T e Schott), e então diluída com 160 $\mu$ L de solução tampão salina. Em seguida acrescentou-se 20 $\mu$ L de uma solução etílica 0,4% de azul de Tripan, completando um volume 200  $\mu$ L. Com ajuda de uma micropipeta colocou-se uma alíquota de 10  $\mu$ L da amostra corada na câmara de Neubauer. A contagem foi realizada em microscópio OLYMPUS CK3, utilizando a objetiva de 10x.

A solução de azul de Tripan penetra nas células não viáveis (mortas por necrose) deixando-as coradas em azul.

A concentração total das células é dada pela somatória do número de células não coradas (viáveis) mais o número de células coradas (não viáveis) e multiplicado pelo fator de diluição. As equações 4.1, 4.2 e 4.3 , apresentam os cálculos dessa concentração total de células, bem como a concentração e porcentagem de células viáveis.

Equação 4.1:Concentração total de células:

$$(n_v + n_d) \times D \times 10^4 = \text{células} / \text{mL} \quad 4.1$$

Equação 4.2:Concentração de células viáveis:

$$n_v \times D \times 10^4 = \text{células} / \text{mL} \quad 4.2$$

Equação 4.3: Porcentagem de células viáveis:

$$\frac{n_v}{n_v + n_d} \times 100 = \% \text{ células viáveis} \quad 4.3$$

$n_v$  = número total de células viáveis

$n_d$  = número total de células não viáveis

$D$  = fator de diluição (no caso descrito D=10)

**4.2.2.2. Quantificação de apoptose, necrose e viabilidade celular utilizando corantes fluorescentes.**

A utilização de corantes fluorescentes teve dois objetivos: determinar a viabilidade celular e quantificar as células apoptóticas e necróticas durante os cultivos. Comparou-se a utilização do protocolo de MERCILLE et al (1994), que usa os corantes fluorescentes Laranja de Acridina (LA) e Brometo de Etídio (BE), com a utilização de corantes novos no mercado, YO-PRO-1 (YP) e Iodeto de Propídio (IP).

#### **Protocolo de Mercille et al (1994)**

Uma solução da mistura de corante de 100 µg/mL de LA e 100 µg/mL BE foi preparada em solução tampão salina livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . Um volume de 4 µL desta mistura de corante foi adicionado a uma amostra de 100 µL de suspensão de células.

Após preparação da amostra, colocou-se no hemacitômetro e examinou-se no microscópio BX50 Olympus (Melville, NY) com uma objetiva de 20x de magnificação e a seguinte combinação de filtros: faixa de excitação 470-490 nm; emissão de 515 nm.

O LA permeia a membrana das células viáveis e também das células apoptóticas. Quando reage com a cromatina, forma um composto esverdeado. Já o BE permeia a membrana das células necróticas e, interagindo com a cromatina, gera um composto laranja-vermelho.

Foram contadas no mínimo 200 células por amostra e de acordo com a coloração, as células foram classificadas em:

- (i) VNA: células viáveis com núcleo não apoptótico;
- (ii) VA: células viáveis com núcleo apoptótico;
- (iii) NEC: células necróticas, células não viáveis com núcleo normal;
- (iv) NVA: células não viáveis com núcleo apoptótico;
- (v) CF: células livres de cromatina.

A porcentagem de cada estado celular em relação ao total de células foi obtida de acordo com a Equação 4.4, similarmente para os outros quatro estados celulares:

Equação 4.4: Porcentagem de células viáveis com núcleo não apoptótico

$$\%VNA = \left( \frac{VNA}{VNA + VA + NEC + NVA + CF} \right) \times 100 \quad 4.4$$

### **YO-PRO-1 (YP) e Iodeto de Propídio (IP)**

Primeiramente preparou-se uma solução estoque do YP de concentração 6 $\mu$ M e do IP com 60 $\mu$ M.

Testes foram realizados utilizando-se concentrações de acordo com o protocolo de Gawlitta, 2004 (1  $\mu$ M de YP e 10  $\mu$ M de IP), metade e o dobro dessas concentrações, respectivamente, 0,5  $\mu$ M e 2  $\mu$ M de YP e 5  $\mu$ M e 20  $\mu$ M de IP. Todas são referentes à concentração final da solução.

Em uma amostra de 15  $\mu$ l do cultivo, adicionou-se 10  $\mu$ l e 5  $\mu$ l das soluções estoque de YP e IP respectivamente. A seguir, preparou-se o hemacitômetro e examinou-se no microscópio BX50 Olympus (Melville, NY) com uma objetiva de 20x de magnificação, utilizando-se o filtro de luz azul para excitação e emissão.

O YP permeia a membrana das células apoptóticas e quando reage com o DNA forma um composto esverdeado. Já o IP atravessa apenas a membrana de células necróticas e reage tanto com o DNA quanto o RNA presente no citoplasma, gerando um composto de cor vermelha. As células vivas não fluorescem quando analisadas no microscópio.

Além do método de contagem manual, também realizou-se a contagem por um método computacional, fazendo a aquisição das imagens e utilizando software adequado para o tratamento e quantificação dessas imagens. As imagens adquiridas foram tratadas utilizando-se o software Matlab 7.1 (The MathWorks Software), e posteriormente quantificadas através de um algoritmo desenvolvido nessa linguagem.

#### 4.2.3 Determinação da velocidade específica máxima de crescimento

Para a determinação da velocidade específica máxima de crescimento da célula, foi utilizada a equação 4.5:

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad 4.5$$

onde:  $\mu$  - velocidade específica de crescimento,  $h^{-1}$

$X$  - concentração de células,  $cel.mL^{-1}$

$t$  - tempo, h

Na fase exponencial de crescimento da célula podemos considerar a equação 4.6:

$$\frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} = cte = \mu_{m\acute{a}x}. \quad 4.6$$

Integrando esta equação da concentração inicial de células  $X_0$  a uma concentração  $X$  num intervalo de tempo  $t$ , temos a equação 4.7.

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_{m\acute{a}x} \cdot t \quad 4.7$$

Nesta expressão, o valor de  $\mu_{m\acute{a}x}$  é o coeficiente angular do gráfico de  $\ln X$  em função do tempo.

#### 4.2.4 Determinação de células mortas por lise através do LDH

Quando a célula sofre lise, libera para o meio de cultura a enzima Lactato Desidrogenase (LDH). A medida da quantidade de LDH presente no meio de cultura possibilita uma determinação precisa do nível de morte celular.

A quantificação do LDH liberado foi feita através de kit enzimático Tox-7 (Sigma Aldrich Co.). O método é baseado na redução do NAD<sup>+</sup> pelo LDH a NADH. O NADH então é utilizado na conversão estequiométrica do corante tetrazólio formando um derivado de formazen vermelho. O composto colorido formado é medido por espectrofotometria.

Primeiramente retirou-se uma alíquota de 0,25ml de meio de cultivo e acrescentou-se 0,5ml de solução do kit previamente preparada para que se iniciasse a reação. A amostra permaneceu em temperatura ambiente e coberta por papel alumínio para proteger da luz. Após 30 minutos, adicionou-se 75µL de solução de ácido clorídrico (HCl) 1 M para terminar a reação e então mediu-se a absorbância pelo espectrofotômetro a 490nm. A concentração de células mortas foi dada pela equação 4.8.

Equação 4.8: Concentração de células mortas por lise

$$X_{LDH} = 2 - 2,4 \times 10^6 \times Abs \quad 4.8$$

$X_{LDH}$  = concentração de células mortas determinada pelo LDH

Abs = valor de absorbância medido de cada amostra



Essa relação (Eq XX) foi obtida através de uma curva padrão construída a partir da relação entre absorvância e vários valores de concentração celular de células lisadas com 1% v/v de Triton.

#### 4.2.5 Etapas no desenvolvimento do Algoritmo

O desenvolvimento do algoritmo foi realizado utilizando-se o toolbox de processamento de imagens incluso no software Matlab 7.1. As etapas de processamento seguidas pelo algoritmo estão apresentadas na Figura 4.2.

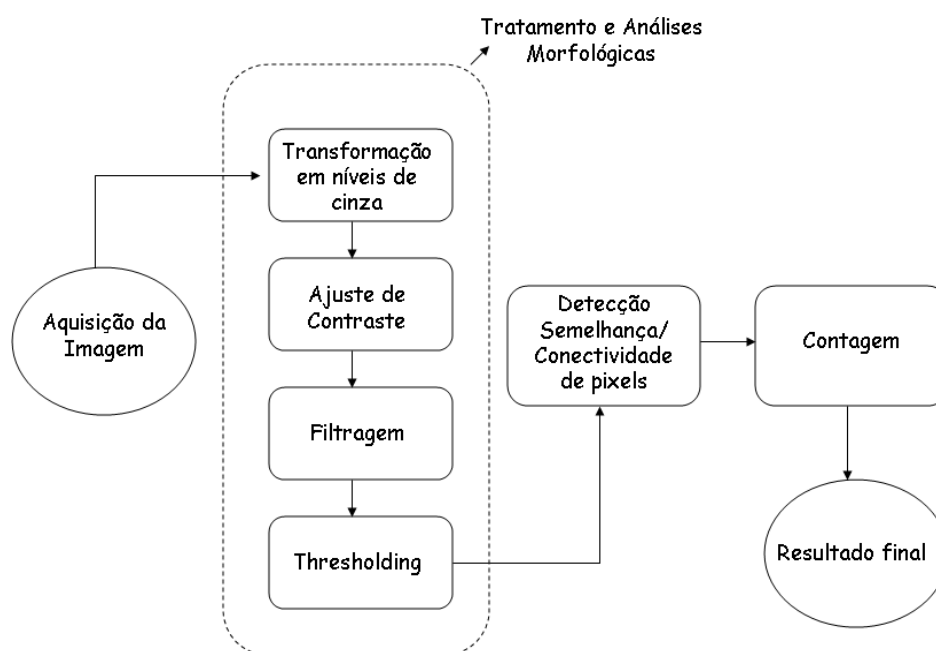


Figura 4.2: Procedimento geral seguido pelo algoritmo computacional em linguagem Matlab para contagem de células de imagens adquiridas em cultivos da célula S2 através de microscópio ótico e um sistema de aquisição de imagens.

O primeiro passo foi a escolha de um método para aquisição das imagens que serviriam de dados de entrada do algoritmo. Já na aquisição, era feito um pré-tratamento onde definia-se valores de luminosidade e contraste para a imagem. Essa aquisição foi feita através do programa Image Pro-plus 3.0 (Media Cybernetics). As etapas seguintes foram todas realizadas com o software Matlab 7.1.

As imagens adquiridas eram utilizadas como dados de entrada para o algoritmo. Após sua leitura, fazia-se então o tratamento das imagens, com a transformação em níveis de cinza e o ajuste de contraste. Feito isso, aplicava-se a filtragem e o thresholding (limiarização) para redução de ruídos e identificação de regiões de interesse. Identificada as regiões de interesse aplicava-se uma rotina para identificação de semelhança entre *pixels* e conectividade. A partir desses resultados era feita a contagem das células. No final do procedimento o algoritmo retornava como resposta o resultado do total de células e a quantidade de células apoptóticas (verdes) e necróticas (vermelhas) presentes na amostra.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Determinação de metodologia para utilização dos corantes fluorescentes YP e IP.

Como primeiro passo para a utilização dos corantes YP e IP realizou-se um teste para determinação da quantidade ótima de corante a ser utilizado, uma vez que o protocolo proposto por GAWLITTA et al (2004) foi desenvolvido para células de mamíferos e nada foi encontrado na revisão bibliográfica sobre estudos com células de inseto sendo, portanto, uma metodologia inovadora para o cultivo das células de *Drosophila melanogaster* (S2).

Para o YP foram utilizadas três concentrações diferentes para a amostra final de células: 0,5  $\mu\text{M}$  , 1  $\mu\text{M}$  e 2  $\mu\text{M}$ . Já para o IP as concentrações finais utilizadas foram 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$ . As Figuras 5.1 e 5.2 a, b e c apresentam o resultado desses testes, respectivamente.



Figura 5.1: Resultados de imagens obtidas com microscópio ótico fluorescente em diferentes concentrações do corante YP com a finalidade de estabelecer uma concentração mínima útil na identificação de células apoptóticas. Concentrações: a) 0,5  $\mu\text{M}$ , b) 1  $\mu\text{M}$  e c) 2  $\mu\text{M}$ .

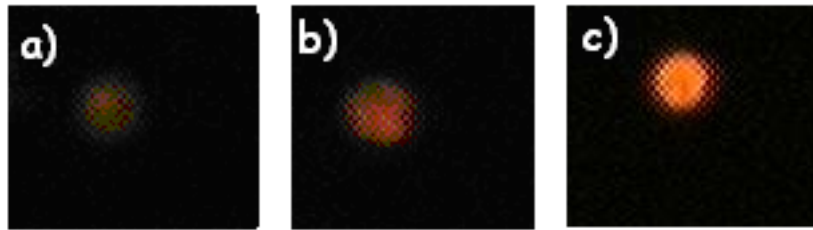


Figura 5.2: Resultados de imagens obtidas com microscópio ótico fluorescente em diferentes concentrações do corante IP com a finalidade de estabelecer uma concentração mínima útil na identificação de células necróticas. Concentrações: a) 5  $\mu\text{M}$ , b) 10  $\mu\text{M}$  e c) 20  $\mu\text{M}$

Nota-se pela análise das Figuras 5.1 a, b e c que conforme aumenta-se a concentração de corante, a fluorescência é maior. Na concentração de 2  $\mu\text{M}$  (Figura 5.1c), a fluorescência já é suficiente para ser percebida pelo olho humano, portanto não há a necessidade de se utilizar mais corante, uma vez que utilizado em grande quantidade pode ser muito tóxico para as células, além de aumentar os custos na análise das amostras.

Com relação a quantidade de IP utilizada (Figura 5.2) também nota-se que o aumento da concentração aumentou a fluorescência. Mas na concentração de 10  $\mu\text{M}$  (Figura 5.2b) já é possível a distinção das células pelo olho humano, não sendo necessário, portanto, a utilização de uma concentração maior, já que isso acarretaria uma toxicidade maior para as células e uma relação custo/benefício mais elevada.

Tendo-se verificado as melhores concentrações de corantes (YP - 2  $\mu\text{M}$  e IP - 10  $\mu\text{M}$ ), a próxima etapa consistiu na realização de experimentos para verificação da performance do corante na determinação da viabilidade celular.

## 5.2 Definição de metodologia para quantificação da viabilidade celular.

Devido à inexistência de uma metodologia consolidada para quantificar a viabilidade de células de inseto, optou-se neste trabalho por fazer uma análise comparativa de

dois métodos atualmente utilizados no âmbito de tecnologia de cultivo de célula animal: método de exclusão de corante azul de Tripan (FRESHNEY, 1994) e a combinação de dois métodos que utilizam corantes fluorescentes, um para quantificação de células necróticas (Laranja de Acridina/Brometo de Etídio – MERCILLE et al, 1994) e outro para identificação de células apoptóticas (YO-PRO-1/Iodeto de Propídio – GAWLITTA et al, 2004).

Inicialmente foi realizado um experimento de cultivo estático com células de inseto S2 numa concentração inicial de  $1 \times 10^6$  células/ml, cultivadas em 5 ml de meio livre de soro, SF-900 II, em frascos T de  $25 \text{ cm}^2$  de área, na temperatura de  $28^\circ\text{C}$ , com o objetivo de comparar a porcentagem de células viáveis identificadas pelo método de exclusão de corante e o método de corantes fluorescentes. O resultado obtido encontra-se na Figura 5.3.

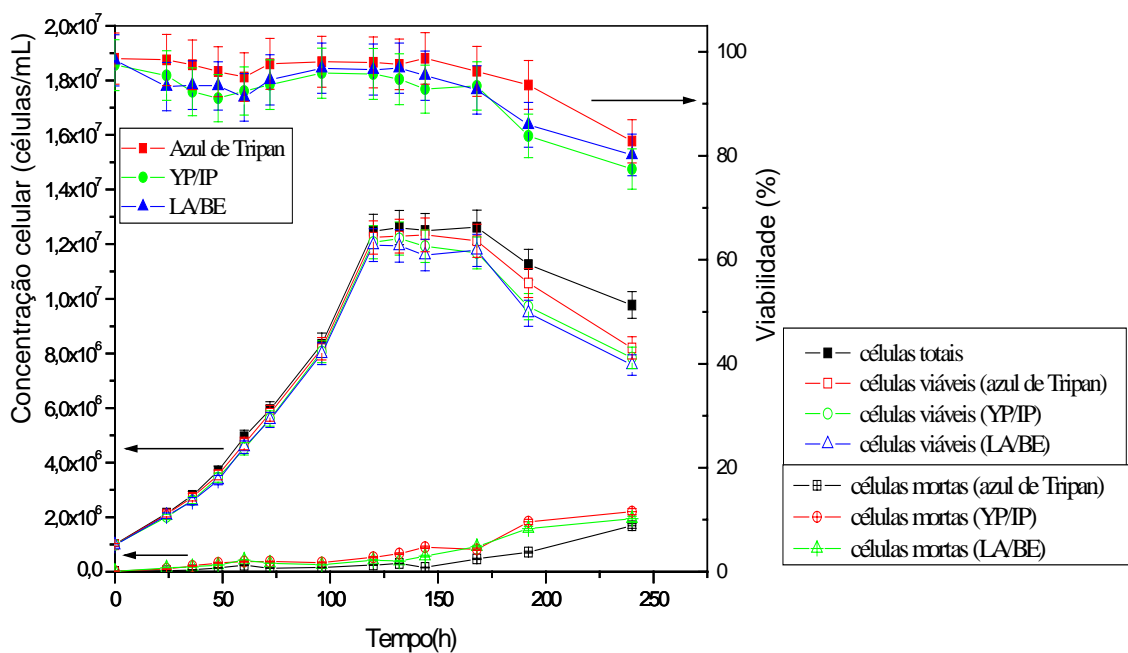


Figura 5.3: Resultados de concentração e viabilidade celular em função do tempo obtidos em cultivo em frascos T de células S2 em meio Sf900-II a  $28^\circ\text{C}$  com medidas realizadas através dos métodos de exclusão de azul de tripan e de corantes fluorescentes YP e IP para fins comparativos. As barras indicam o erro padrão.

Como pode ser observado na Figura 5.3, ambos os métodos, exclusão de corante e fluorescência, mostraram-se capazes de prever a porcentagem de células viáveis. Entretanto, o método fluorescente apresentou viabilidades menores. Essa diferença na viabilidade pode ser explicada, uma vez que os corantes fluorescentes são capazes de identificar as células apoptóticas, já o corante azul de tripan tinge apenas células não viáveis (necróticas). O coeficiente de variação das medidas ficou entre 5 % e 8%.

A Figura 5.3 apresenta também para o cultivo em frasco T, as concentrações de células viáveis e de células mortas em função do tempo obtidas pelo método de exclusão com azul de Tripan e o método fluorescente.

Com relação as células viáveis é possível perceber que durante toda a fase exponencial a viabilidade do cultivo foi alta e os dois métodos utilizados para tal obtenção apresentaram comportamento equivalente. Já no início da fase estacionária nota-se uma diferença entre os valores obtidos pelo azul de Tripan e o método de corantes fluorescentes. Isso pode ser devido à morte apoptótica causada pelos níveis baixos de oxigênio no meio quando a célula atinge essa fase como observado por SILVA (2006).

Após a fase estacionária do cultivo (aproximadamente a partir de 168h), essa diferença fica bem mais acentuada, mostrando a sensibilidade dos corantes fluorescentes com relação a viabilidade. Nessa fase, além do oxigênio, os nutrientes do meio de cultivo já estão praticamente esgotados. Nota-se que a concentração de células mortas é maior nessa fase e a tendência é de aumentar ao longo do tempo.

Com o provável término dos nutrientes a concentração de células apoptóticas aumenta e conseqüentemente a viabilidade diminui. O corante azul de tripan não é capaz de identificar tais células, por isso a diferença nessa etapa do cultivo é notoriamente maior. Com relação as duas duplas de corantes fluorescentes utilizados, nota-se que para esse cultivo

estático da célula S2 a performance foi praticamente a mesma, dando valores de viabilidade bem próximos.

A velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) foi calculada, tanto para a concentração de células totais quanto para a concentração de células viáveis. A Tabela 5.1 apresenta os valores obtidos.

Tabela 5.1: Valores de velocidade específica máxima calculados a partir das curvas de crescimento de células totais e células viáveis obtidas pelo método de exclusão de corantes e corantes fluorescente para o cultivo estático realizado em garrafa T.

<b>Tipo de célula</b>	<b><math>\mu_{\text{máx}}</math> (h<sup>-1</sup>)</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>Coefficiente de correlação</b>
<b>células totais</b>	0,0231	3,64E-04	0,999
<b>células viáveis – tripan</b>	0,0221	3,48E-04	0,999
<b>células viáveis - YP/IP</b>	0,0222	1,01E-03	0,998
<b>células viáveis - LA/BE</b>	0,0225	8,75E-05	0,999

Analisando-se a Tabela 5.1, observa-se que os valores de  $\mu_{\text{máx}}$  para os casos descritos ficaram muito próximos. Ambos os métodos (de exclusão por tripan e corantes fluorescentes) são capazes de prever a velocidade específica máxima com erros padrões baixos. Isso confirma a equivalência na fase exponencial entre os dois métodos utilizados.

A Figura 5.4 apresenta exemplos de imagens adquiridas da população de células que foi caracterizada seguindo os critérios de MERCILLE et al (1994) para o uso dos corantes fluorescentes LA e BE.

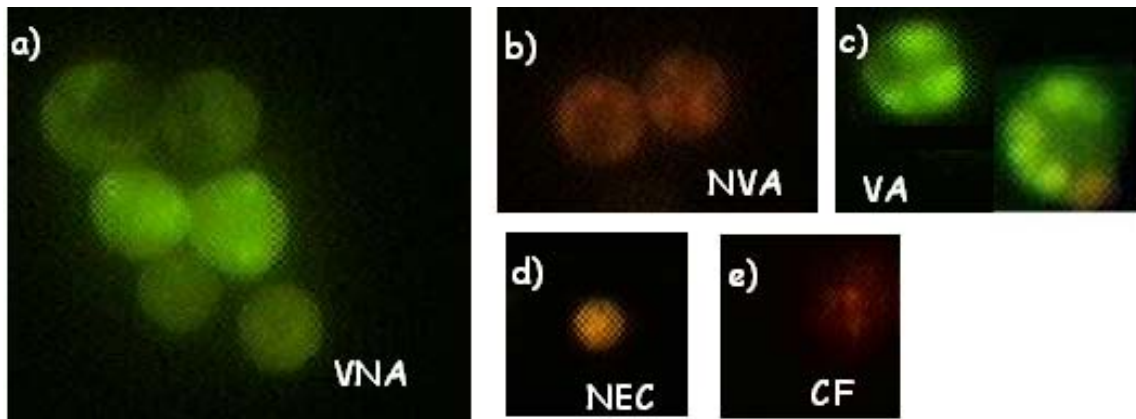


Figura 5.4: Identificação de várias populações de células em microscópio de fluorescência durante o cultivo de células S2 neste trabalho. a) células viáveis não apoptóticas (VNA), b) células não viáveis apoptóticas (NVA), c) células viáveis apoptóticas (VA), d) células necróticas (NEC), e) células livres de cromatina (CF)

A Figura 5.5 apresenta um exemplo de imagem adquirida corada com os corantes YP e IP.

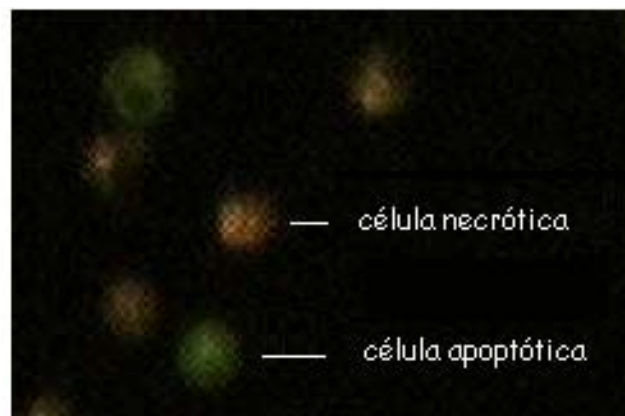


Figura 5.5: Exemplo de imagem adquirida de células coradas com os corantes YP/IP. As células verdes são apoptóticas e as vermelhas são células necróticas.

Analisando-se as Figuras 5.4 e 5.5, observa-se que a fluorescência com o uso dos corantes LA/BE é maior do que utilizando-se a dupla YP/IP. Mas mesmo com essa diferença de fluorescência, o uso de YP e IP apresenta-se mais fácil de identificação do tipo de morte celular, uma vez que só cora as células mortas, já o LA e BE coram também as células viáveis, sendo que a caracterização de apoptose é feita a partir da observação da morfologia celular e não apenas da coloração.



Com a finalidade de verificação dos danos causados pelos corantes fluorescentes às células, observou-se duas amostras colocadas em contato com LA/BE e YP/IP. Após um período de 15 minutos, a amostra em contato com LA/BE continha apenas células mortas, enquanto que a outra amostra permaneceu praticamente inalterada. Isso mostra que o uso de YP/IP é menos tóxico para as células, causando menos danos ao metabolismo celular.

Com a finalidade de verificar os efeitos de YP/IP sobre o metabolismo celular de células de inseto *Drosophila*, foi feito um experimento onde os corantes foram colocados juntamente com o meio de cultivo. Esses dados só existem na literatura para células de mamífero (GAWLITTA, 2004), o que demonstra a inovação do uso desses corantes no presente trabalho.

O experimento foi realizado nas mesmas condições do experimento anterior, onde o cultivo foi realizado em frasco T estático. O resultado está apresentado na Figura 5.6.

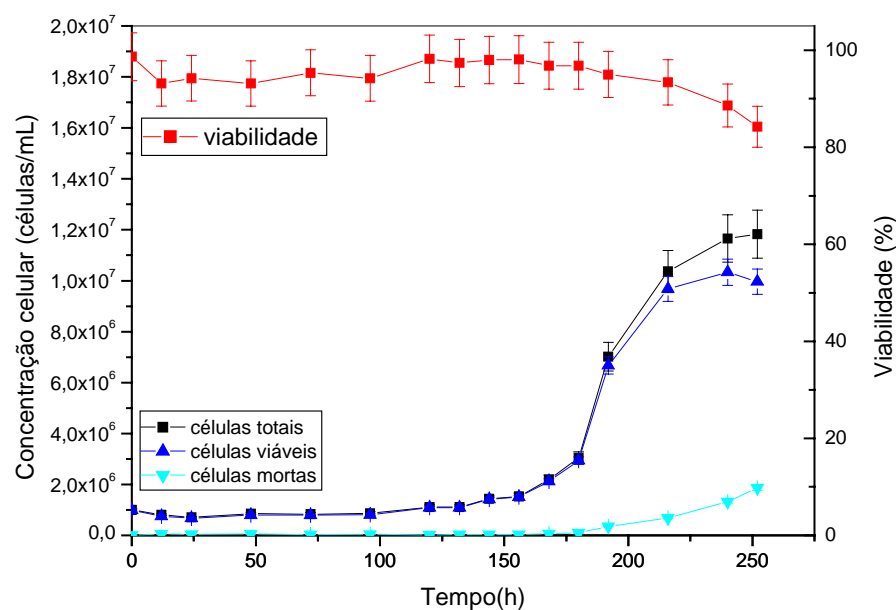


Figura 5.6: Resultados de concentração e viabilidade celular em função do tempo para o cultivo de células S2 em frasco T a 28 °C com corantes fluorescentes YP e IP adicionado ao meio de cultura Sf900-II.

As células de *Drosophila*, apesar de não serem células tipicamente aderentes, tendem a “colar” sobre a superfície disponível para crescerem e ao tirar as amostras o procedimento comum de “descolamento” destas células é através de batidas moderadas na garrafa, fazendo que o meio de cultura se desloque abruptamente e desta forma consiga-se soltar todas as células. No entanto, com o uso do corante no meio celular, as células ficaram muito mais aderidas e este procedimento não conseguia fazer por si só gerar a movimentação do meio de cultura necessária ao “descolamento”, necessitando então se fazer a aspersão do meio de cultura sobre a parede da garrafa e, desta forma, gerar movimentos no fluido que as soltassem.

Nota-se pela Figura 5.6 que o uso de corantes inibiu o crescimento celular, já que a célula necessitou de um tempo maior de adaptação ao novo meio de cultivo. O início da fase exponencial só foi observado após 175 horas de cultivo. Essa inibição pode ser explicada, uma vez que o corante YP é utilizado em solução com DMSO (Dimetil Sulfoxido) e sabe-se que tal agente funciona como inibidor de crescimento quando utilizado no meio de cultura para obtenção de maiores produtividades em cultivos celulares ( FIORE et al, 1999).

Os danos devido a toxicidade dos corantes com relação a morte celular não foram observados durante a fase lag, uma vez que a viabilidade manteve-se alta e as células cresceram após essa fase. O valor de  $\mu_{m\acute{a}x}$  calculado foi de  $0,0286 \text{ h}^{-1}$  para a curva de crescimento de células totais e de  $0,0281 \text{ h}^{-1}$  para a curva de células viáveis. Se o valor for comparado com o células totais presente na Tabela 5.1 observa-se que para esse cultivo com corante presente no meio, apesar do período inicial de inibição, a velocidade de crescimento máxima foi maior.

A Figura 5.7 apresenta a comparação do crescimento celular com o uso e não de corante no meio de cultivo. Observa-se que o tempo de duração da fase exponencial foi de aproximadamente 50 horas, enquanto que num cultivo normal esse tempo foi de 120 horas.

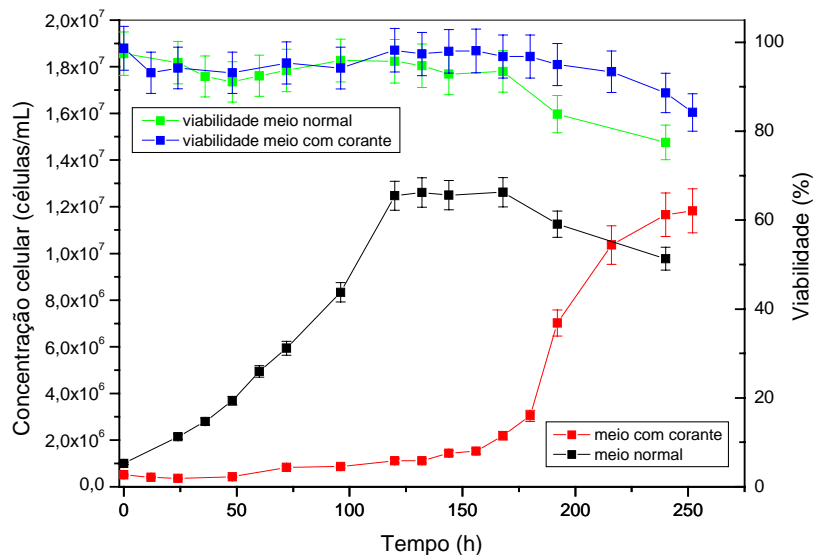


Figura 5.7: Resultados de concentração de células totais em função do tempo para cultivos de célula S2 sem e com corante YP/IP no meio de cultura Sf900-II.

Uma vez que o cultivo em frascos Schott permite uma concentração celular maior e menor aderência das células à parede, já que é feito com agitação, foi realizado um novo experimento para determinação da viabilidade pelos métodos de exclusão de azul de tripan e de corantes fluorescentes YP/IP e LA/BE. Esse experimento teve como objetivo analisar a sensibilidade do método fluorescente em cultivos com a presença de forças hidrodinâmicas geradas pela agitação. O resultado do experimento está apresentado na Figura 5.8.

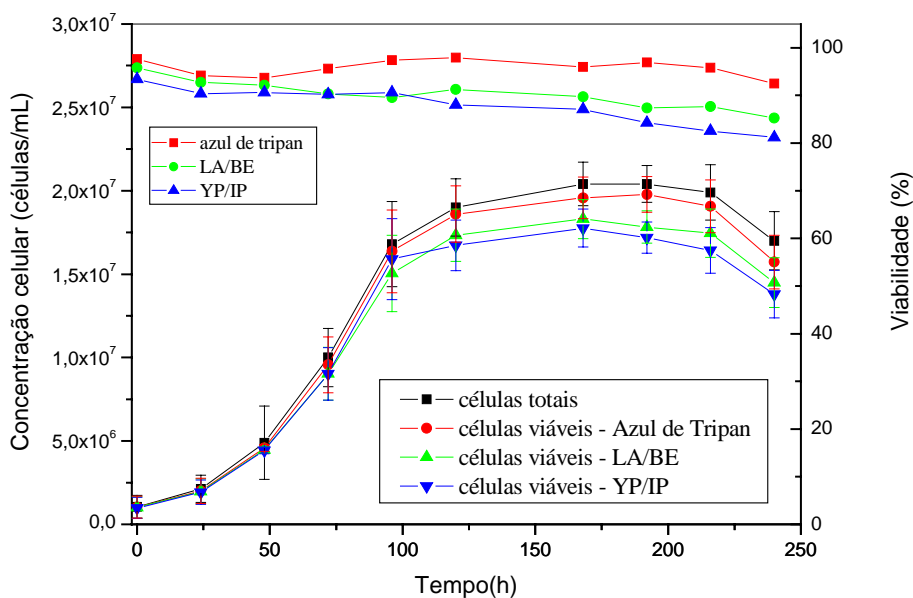


Figura 5.8: Resultados de concentração e viabilidade celular em função do tempo para o cultivo de célula S2 em frasco Schott com meio Sf900-II a 28°C em shaker a 100 rpm a fim de comparar os diferentes métodos (exclusão e fluorescente) e também a sensibilidade dos corantes usados no método de corantes fluorescentes para obtenção da viabilidade celular

Observa-se pela Figura 5.8 que, da mesma maneira que no cultivo estático, ambos os métodos, de exclusão de corante e corantes fluorescentes, foram capazes de detectar a fração de células viáveis. Mas neste caso ficou mais evidente a maior sensibilidade dos corantes fluorescentes com relação ao Azul de Tripan, uma vez que os valores de viabilidade pelo método dos corantes fluorescentes foi sempre mais baixo.

Essa diferença fica ainda mais evidente após 120 horas de cultivo quando já está tendo início a fase estacionária do cultivo. Nessa fase o nível de oxigênio dissolvido já é muito baixo, ou seja, é um fator limitante do crescimento celular e, por consequência, o número de células mortas por apoptose aumenta. O corante azul de tripan não é capaz de diferenciar tais células, por isso a viabilidade do cultivo se mantém em valores elevados. Já os corantes fluorescentes identificam claramente essa queda na viabilidade.

Como no cultivo estático, neste experimento também o uso do YP/IP mostrou que a combinação de corantes fluorescentes é mais sensível às mudanças no estado celular no início da fase estacionária. Essa sensibilidade maior pode ser devido a que esses corantes

permeiam a membrana celular da célula morta, seja por apoptose, seja por necrose, enquanto que com os corantes LA/BE, também permeiam membrana das células viáveis. Neste caso a identificação das células apoptóticas se dá pela diferenciação do núcleo, o que causa uma identificação tardia de apoptose e, portanto, uma viabilidade aparente maior.

As barras nos pontos do gráficos são referentes ao desvio padrão das medidas. Uma comparação estatística feita entre os valores mostrou que nas horas iniciais até metade da fase exponencial, os dois métodos (exclusão de corantes e corantes fluorescentes) não possuem diferença significativa.. Para tempos maiores a curva de viabilidade por azul de tripan se diferencia notoriamente das duas curvas de corantes fluorescentes. A comparação entre os valores e seus respectivos desvios, mostra que é mais significativa a diferença entre tripan e YP/PI. Os valores de viabilidade obtidos por LA/BE ficam intermediários. Os valores de  $\mu_{\text{máx}}$  foram calculados para as curvas de crescimento de células totais e viáveis e estão apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2: Valores de velocidade específica máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ) calculados a partir das curvas de crescimento de células S2 totais e células viáveis obtidas pelo método de exclusão de corantes e corantes fluorescente para o cultivo dinâmico em meio SF 900 – II a 28°C em Schott agitado em shaker a 100 rpm.

<b>Tipos de células</b>	<b><math>\mu_{\text{máx}}</math> (h<sup>-1</sup>)</b>	<b>erro padrão</b>	<b>coeficiente de correlação</b>
<b>células totais</b>	0,0322	0,00139	0,999
<b>células viáveis - tripan</b>	0,0325	0,00108	0,998
<b>células viáveis - LA/BE</b>	0,0317	0,00129	0,997
<b>células viáveis - YP/IP</b>	0,0322	0,00147	0,998

Observa-se pela Tabela 5.2 que os valores de velocidade específica máxima ficaram bem próximos, indicando que tanto o corante azul de tripan como os corantes fluorescentes são equivalentes na fase exponencial do cultivo.

Uma vez que o corante azul de tripan é capaz de tingir apenas células necróticas, realizou-se um teste, onde nas concentrações de células viáveis calculadas pelo uso de LA/BE e YP/IP foi adicionado o valor da porcentagem de células apoptóticas medidas por ambos, respectivamente, ficando para o cálculo da viabilidade apenas a porcentagem de células necróticas. Dessa maneira, esperava-se que as curvas de células viáveis calculadas pelo método de exclusão e corantes fluorescentes fossem equivalentes. A Figura 5.9 apresenta o resultado obtido.

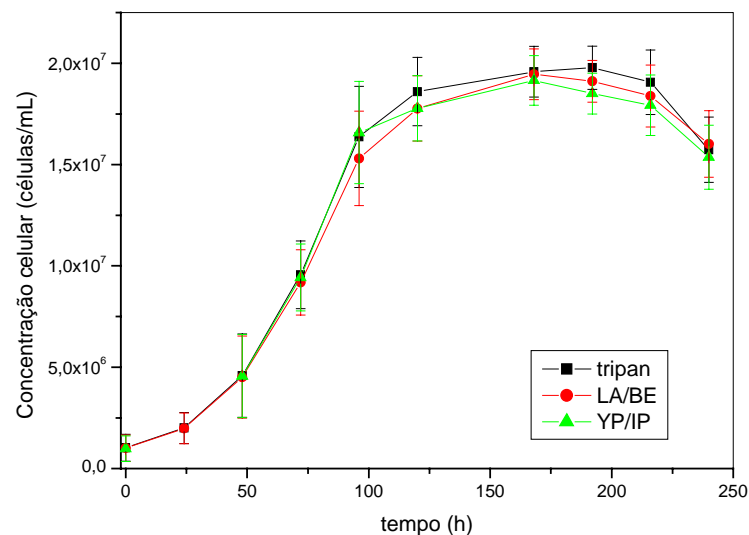


Figura 5.9: Concentração de células S2 viáveis em função do tempo obtidas pelo método de exclusão de azul de tripan e pelo método fluorescente, levando em consideração para o cálculo apenas a concentração de células necróticas para verificação da equivalência dos métodos.

Nota-se pela Figura 5.9 que se apenas as células necróticas forem levadas em consideração, os dois métodos são equivalentes (exclusão e fluorescente). Os valores não tiveram diferenças estatísticas significativas. Pode-se dizer que essa sensibilidade dos corantes fluorescentes realmente é devida a identificação de células mortas por apoptose.

A evolução da porcentagem da viabilidade celular seguindo os critérios de MERCILLE et al (1994) para o uso dos corantes LA e BE está apresentada na Figura 5.10.

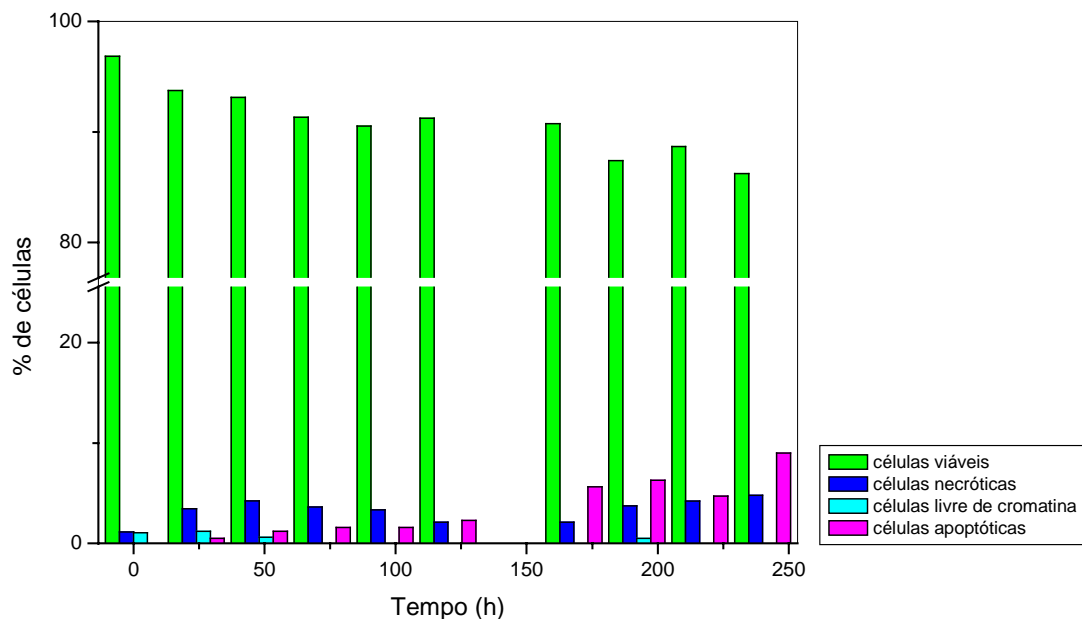


Figura 5.10: Evolução de diferentes tipos de células S2 segundo a classificação de Merceille et al. (1994) utilizando-se LA e BE como corantes fluorescentes na quantificação das mortes apoptótica e necrótica no cultivo de célula S2 em frasco Schott com meio Sf900-II a 28°C em shaker a 100 rpm.

Nota-se pela Figura 5.10 que o cultivo apresentou no início uma porcentagem de células livre de cromatina, 1,04%. Mas isso não foi observado em todo o cultivo. Essa porcentagem pode ser atribuída a presença de células necróticas provenientes do inóculo, uma vez que essa porcentagem vai diminuindo até chegar a 0%.

A porcentagem de células necróticas tem variações, mas permanece praticamente constante nos primeiros dias de cultivo se considerarmos o desvio padrão médio das medidas que ficou em torno de 3%. Esse tipo de morte pode estar ocorrendo devido a agitação do Schott, uma vez que as forças de cisalhamento podem danificar com relativa facilidade as células mais fracas.

A porcentagem de células apoptóticas vai aumentando durante o cultivo, o que já era de se esperar, uma vez que os nutrientes do meio vão se esgotando, acentuando esse tipo de morte celular.

A Figura 5.11 apresenta a evolução da porcentagem da viabilidade celular com o uso dos corantes YO-PRO-1 e Iodeto de Propídio

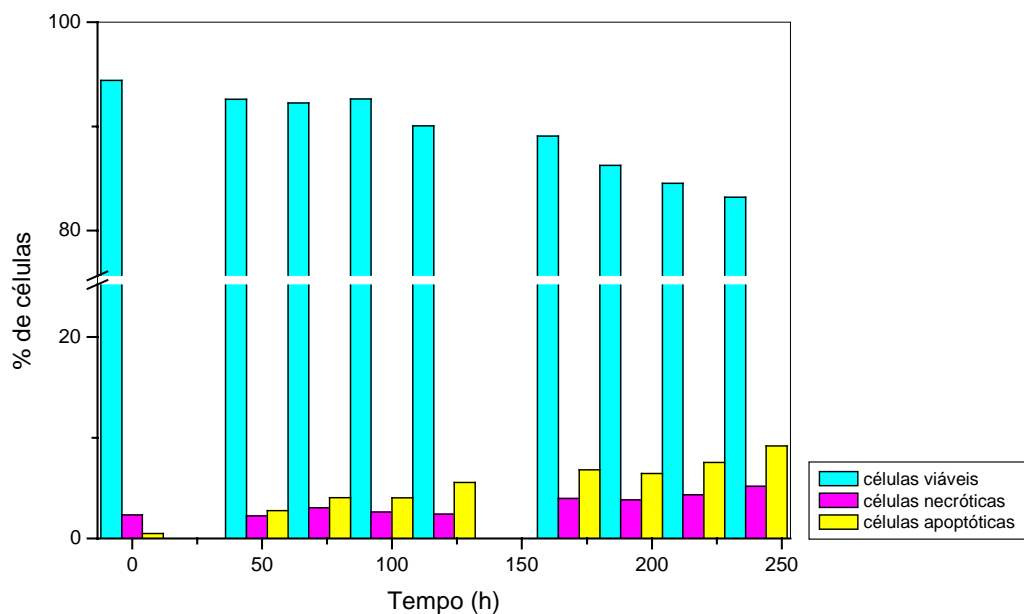


Figura 5.11: Evolução de diferentes tipos de células S2 segundo a classificação de Merceille et al. (1994) utilizando-se YP e IP como corantes fluorescentes na quantificação das mortes apoptótica e necrótica no cultivo de célula S2 em frasco Schott com meio SF900-II a 28°C em shaker a 100 rpm.

Analisando-se a Figura 5.11 nota-se que a porcentagem de células apoptóticas aumenta durante o cultivo, o que indica o consumo de nutrientes e como estes não são repostos, a célula tende a ficar apoptótica.

A quantidade de células necróticas até o final da fase exponencial (aproximadamente 120 horas) permanece praticamente constante, se se levar em consideração o desvio padrão das medidas que ficou em torno de 4%. Na fase estacionária, a porcentagem



de células necróticas aumenta um pouco, mas mesmo assim permanece também praticamente constante até o final do cultivo. Isso é um indicativo de que algumas células apoptóticas no início do cultivo estão se tornando necróticas.

A porcentagem de células apoptóticas nos cultivos analisados é sempre um pouco maior do que as células necróticas, um indicativo de que a maior parte da morte se deu por apoptose e não por necrose.

Uma análise das Figuras 5.10 e 5.11, mostra que as duas duplas de corantes utilizadas (LA/BE e YP/IP) apresentaram resultados semelhantes se compararmos a diminuição da viabilidade celular e o aumento de células apoptóticas durante o cultivo. Além disso, o uso do YP/IP permite uma identificação antecipada da apoptose, o que é útil quando se quer evitar a queda da viabilidade para obtenção de uma maior produtividade.

O uso do método de exclusão por azul de Tripán ajuda a ter uma idéia da viabilidade do cultivo, mas não permite uma medida realista da concentração de células mortas. Durante o experimento foi feita a medida de LDH (desidrogenase láctica, enzima glicolítica terminal), que é uma enzima liberada no meio de cultivo quando a célula sofre lise, ou seja, é rompida e seu interior liberado no meio de cultivo. Essa medida é capaz de quantificar a concentração de células mortas (lisadas) durante o cultivo. A Figura 5.12 apresenta a distribuição da concentração de células mortas por lise durante o cultivo junto com a concentração celular normal.

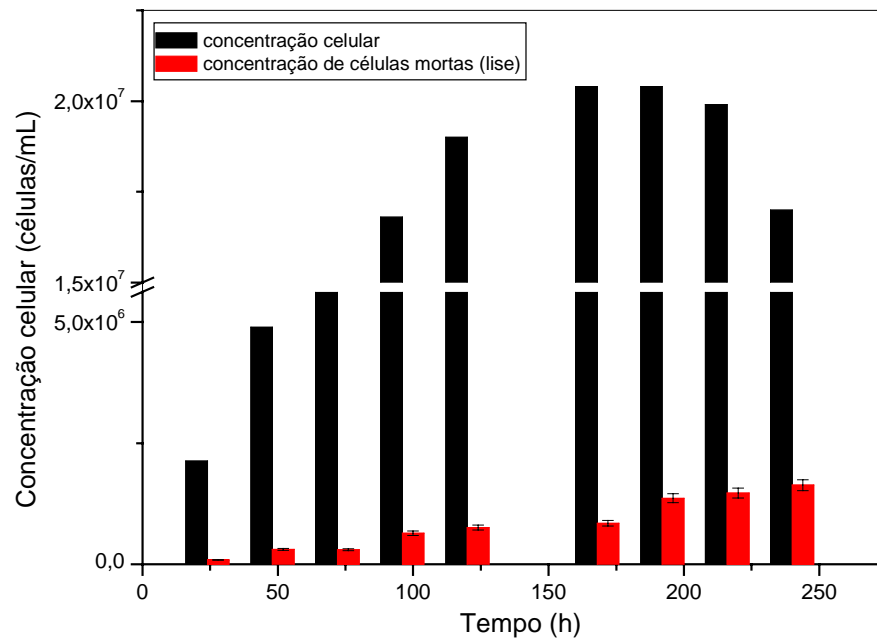


Figura 5.12: Evolução da concentração celular total e concentração de células mortas por lise estimada por LDH em função do tempo para o cultivo realizado com célula S2 em frasco Schott com meio Sf900-II a 28°C em shaker a 100 rpm.

Nota-se pela Figura 5.12 que a concentração de células mortas por lise aumenta durante o cultivo, mesmo levando em consideração o desvio padrão. Isso quer dizer que a viabilidade tende a diminuir, tendência que não é evidenciada pelo método de exclusão de corante azul de Tripán, uma vez que a viabilidade por este método permaneceu praticamente constante, diminuindo apenas na fase final do cultivo (Figura 5.8). Já pelo método fluorescente, os valores de viabilidade obtidos foram menores, o que confirma que esse método apresenta então valores mais próximos da realidade do cultivo.

Essa concentração de células mortas por lise somada as concentrações de células mortas por necrose e apoptose apresenta uma idéia mais real da distribuição da viabilidade no cultivo. A Figura 5.13 apresenta essa distribuição de concentração celular e de células mortas (lise, apoptose e necrose) obtidas pelo método de exclusão de corante e corante fluorescente em função do tempo.

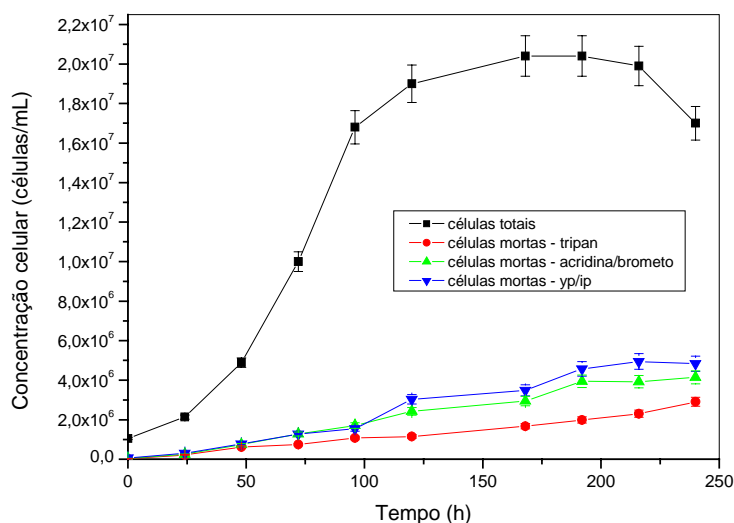


Figura 5.13: Evolução da concentração celular e de células mortas (lise, apoptose e necrose) obtidas pelos métodos de exclusão e corantes fluorescentes ao longo do tempo no cultivo de célula S2 em frasco Schott com meio Sf900-II a 28°C em shaker a 100 rpm.

Observa-se pela Figura 5.13 um aumento na concentração de células mortas durante o cultivo. Essa concentração é maior se compararmos os métodos fluorescentes com o método de exclusão por corante azul de Tripan. Os dois métodos apresentaram-se equivalentes apenas nas primeiras 50 horas de cultivo, a partir desse ponto o método dos corantes fluorescentes apresentou-se mais sensível na detecção de células mortas, uma vez que conseguia detectar as células apoptóticas.

Como já observado na Figura 5.8, essa diferença fica bem mais evidente a partir de 120 horas quando se tem o início da fase estacionária. É nesse início que possivelmente o oxigênio dissolvido está em níveis baixos, provocando a morte celular por apoptose que é identificada pelos corantes fluorescentes, mas não pelo azul de Tripan. Com o uso dos corantes YP/IP a concentração de células mortas apresenta-se mais elevada, o que pode indicar uma melhor identificação da apoptose antecipada nas células.

A Figura 5.14 apresenta as concentrações celulares total e de células viáveis sem descontar as células lisadas. As células lisadas foram as estimadas pelo método que usa LDH.

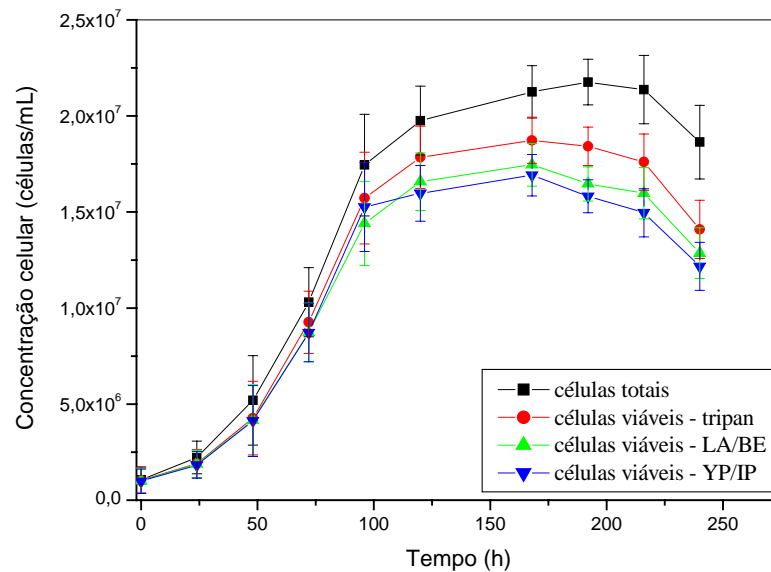


Figura 5.14: Concentração celular total do cultivo em função do tempo, juntamente com a concentração de células viáveis descontando as células lisadas (medida por LDH) para o método de exclusão de azul de Tripan e métodos fluorescentes no cultivo de célula S2 em frasco Schott com meio Sf900-II a 28°C em shaker a 100 rpm.

Quando se leva em consideração na viabilidade a morte celular por lise, observa-se uma separação maior entre a curva de células totais e células viáveis e também que os métodos fluorescentes são bem mais sensíveis que o de exclusão de corante (Figura 5.14). Essa maneira de representar a concentração de células viáveis é a mais realista, uma vez que leva em consideração todas as possíveis causas de morte no meio de cultura (lise, apoptose e necrose).

Um novo experimento foi realizado com o objetivo de adquirir imagens para posterior tratamento e quantificação com algoritmo apropriado desenvolvido. A curva de

concentração celular e viabilidade pelo método de exclusão de tripan e métodos fluorescente está apresentada na Figura 5.15.

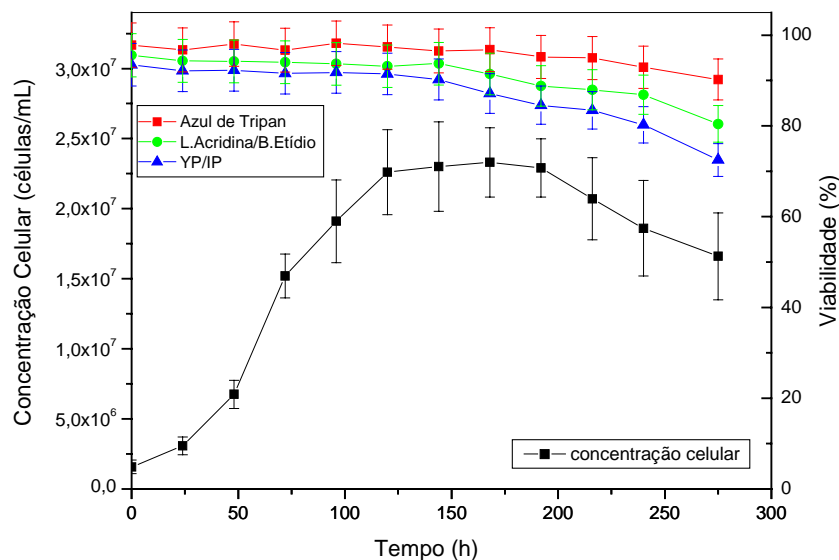


Figura 5.15: Concentração celular e viabilidade em função do tempo pelo método de exclusão de corante e métodos fluorescentes.

É possível notar pela Figura 5.15 que o cultivo obteve o mesmo comportamento do anterior (Figura 5.8). Neste caso o cultivo foi acompanhado até momentos após o término da fase estacionária, e nota-se que a diferença de valores de viabilidades pelos métodos utilizados aumenta ao longo do tempo. Os dois métodos (exclusão e corantes fluorescentes), são equivalentes nas primeiras 120 horas, mas quando o cultivo atinge a fase estacionária o uso de corantes fluorescentes permite uma maior sensibilidade na identificação de células mortas. Após aproximadamente 200 horas, a concentração celular começa a decair, resultado de mais morte celular por lise. O método de exclusão por tripan evidencia esse decaimento, mas os valores de viabilidade continuam elevados (90% após 275 horas).

Já os corantes fluorescentes são mais sensíveis a essa fase de decaimento. E entre eles, o uso do YP/IP apresentou os valores mais baixos de viabilidade. Isso pode ser explicado pelo fato da identificação antecipada da apoptose.

Imagens das amostras coradas foram retiradas durante todo o cultivo com a finalidade de se obter a concentração e viabilidade através do algoritmo desenvolvido. Esses resultados serão apresentados durante os itens que se seguem, na parte de implementação do algoritmo.

### **5.3 Obtenção das imagens para quantificação de apoptose e necrose**

A primeira etapa para a quantificação celular por análise de imagens consistiu na escolha de uma metodologia fácil, rápida e confiável de montagem e manipulação da amostra na plataforma do microscópio para a aquisição de imagens. Dois métodos foram avaliados para adquirir as imagens:

- a) através do uso de hemacitômetro (câmara de Neubauer);
- b) através do uso de lâmina e lamínula.

As Figuras 5.16 e 5.17 apresentam as imagens das células obtidas com hemacitômetro sem corante e com corante (Azul de Tripán) respectivamente.

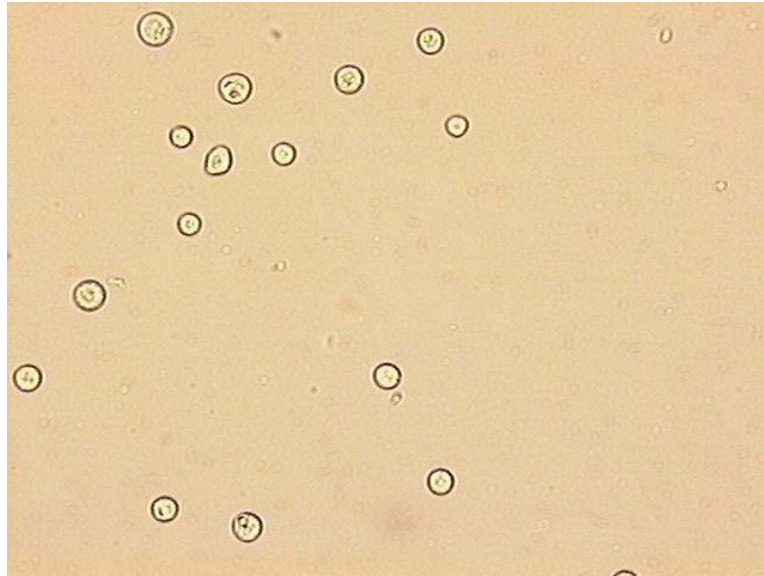


Figura 5.16: Exemplo de imagem de amostra de células de inseto S2 sem corante contida no hemacitômetro

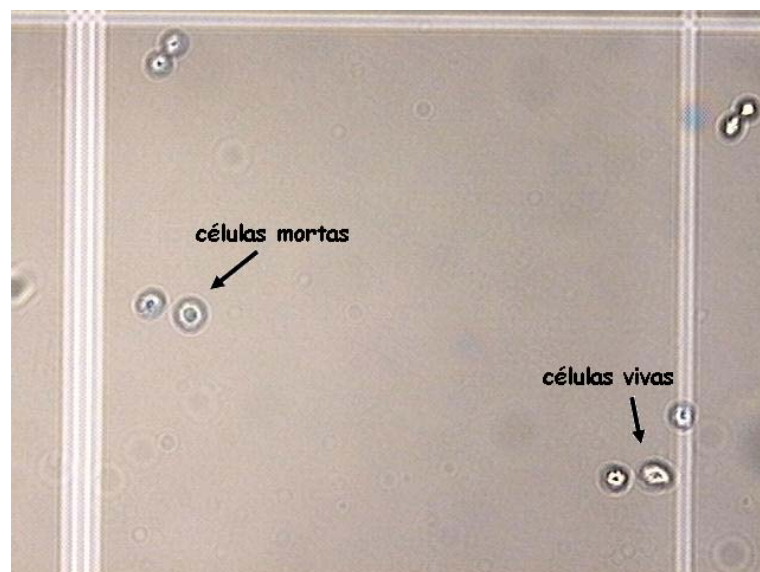


Figura 5.17: Exemplo de imagem de amostra de células S2 em solução de corante azul de tripan, contida no hemacitômetro

O corante Azul de Tripán serve para diferenciar entre células viáveis (vivas) e não viáveis (mortas). As membranas das células mortas se tornam permeáveis ao corante que entra livremente e cora as células de azul. Já nas células vivas o corante é incapaz de entrar (vide indicações na Figura 5.17).

Como características favoráveis ao uso do hemacitômetro na obtenção da imagem estão: a lamínula que se coloca por cima da amostra tem uma separação do fundo do hemacitômetro de 100  $\mu\text{m}$  que, além de permitir a definição de um volume suficientemente preciso de amostra, evita a deformação e destruição da célula devido a compressão do líquido localizado entre a lâmina e o hemacitômetro. Como características desfavoráveis pode-se citar: a possibilidade de haver sobreposição de células nessa camada de líquido e a presença dos riscos da escala sobre o hemacitômetro podem interferir na fase de tratamento da imagem.

Uma outra metodologia para adquirir as imagens foi o uso de lâmina e lamínula. A Figura 5.18 apresenta a imagem de amostra de células em solução de corante azul de tripan obtida por esse método.

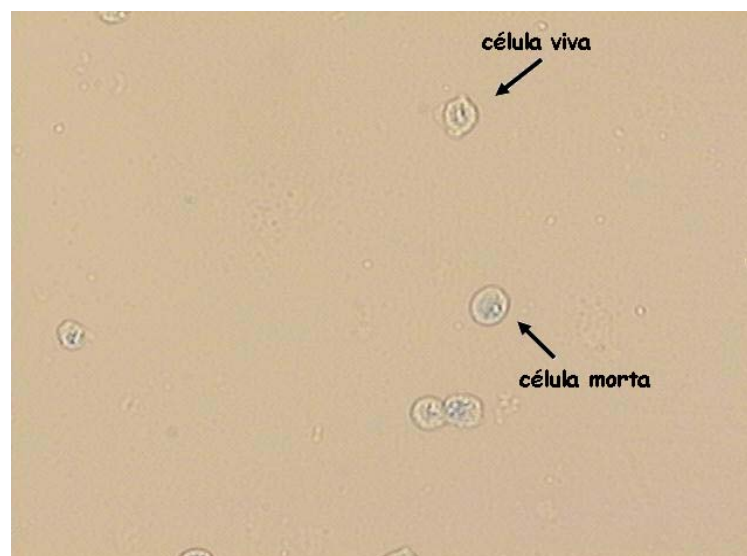


Figura 5.18: Exemplo de imagem obtida de amostra de células S2 em solução de corante azul de tripan contida entre a lâmina e a lamínula.

A diferença com o uso de hemacitômetro é que com a lâmina/lamínula a profundidade do local onde a amostra é inserida é menor. Isso ajuda no fato de ser mais difícil a obtenção de imagens com células sobrepostas, o que acarretaria erros durante sua



identificação pelo algoritmo. Outra vantagem da lâmina é na hora da aquisição da imagem, uma vez que não aparecem os quadrantes presentes no hemacitômetro (Figura 5.17). O inconveniente deste método é que, devido a pouca profundidade, as células podem ser danificadas, rompendo suas membranas e permitindo assim a entrada do corante ou lisando a célula. A utilização de cada método vai depender do tipo de análise que se deseja fazer.

As imagens inicialmente utilizadas pelo algoritmo desenvolvido, foram obtidas utilizando-se corantes fluorescentes que são capazes de distinguir entre os dois tipos de morte celular (apoptose e necrose). A Figura 5.19 apresenta uma das imagens adquiridas utilizando-se os corantes fluorescentes.

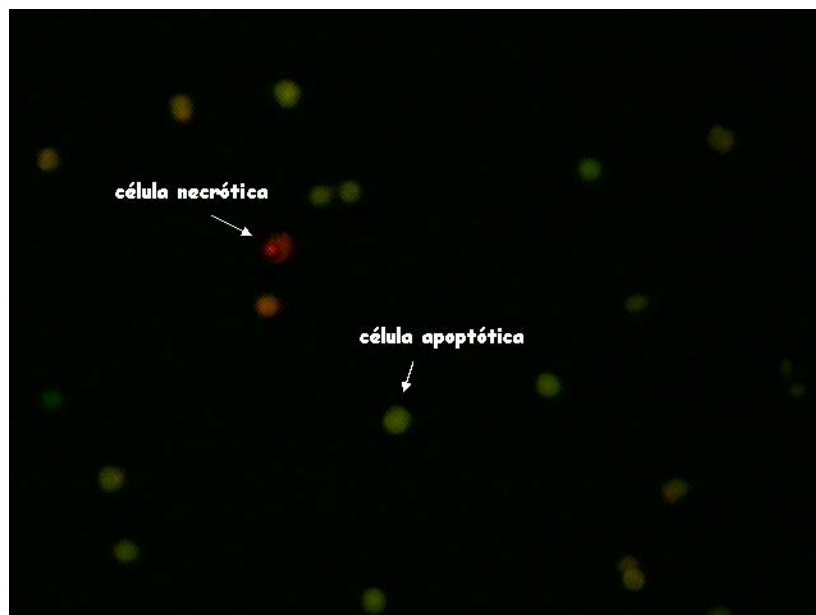


Figura 5.19: Exemplo de imagem de amostra de células S2 em solução de corantes fluorescentes (YO-PRO-1 e Iodeto de Propídio) preparadas em lâmina/lamínula.

A diferença de coloração das células na Figura 5.19, indica o tipo de morte; células necróticas tem coloração vermelha, uma vez que essa é a fluorescência do corante IP quando se intercala na cromatina, já as células apoptóticas ficam esverdeadas por causa do corante YP intercalado nas moléculas de DNA. As imagens analisadas pelo algoritmo foram todas obtidas via hemacitômetro.

## 5.4 Desenvolvimento do Algoritmo

O desenvolvimento do algoritmo foi realizado utilizando-se o *toolbox* de processamento de imagens do software Matlab 7.1.

### 5.4.1 Obtenção do total de células

O objetivo inicial dessa pesquisa era o desenvolvimento de um algoritmo analisando-se imagens de células coradas com os corantes YP/IP, considerando as células verdes como apoptóticas e as células vermelhas como necróticas. Nessa fase inicial de desenvolvimento, esses corantes não estavam disponíveis no laboratório, então o algoritmo foi desenvolvido e treinado baseado em imagens adquiridas utilizando a outra dupla de corantes LA/BE. Após a aquisição dos novos corantes, o algoritmo foi avaliado na utilização de imagens adquiridas com amostras coradas com YP e IP.

A primeira parte no desenvolvimento do algoritmo consistiu na determinação do total de células presentes na imagem adquirida. A Figura 5.20 apresenta a imagem de entrada para o programa (amostra em solução de corantes fluorescentes LA e BE).

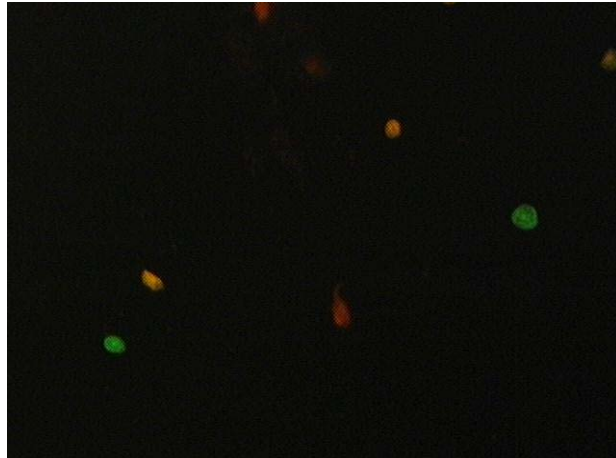


Figura 5.20: Imagem original de células S2 de entrada do algoritmo computacional . A amostra foi corada com os corantes LA e BE. A imagem foi obtida de um cultivo em Frasco Schott com meio SF900-II agitado em shaker a 100 rpm e 28°C

A maioria das funções presentes no Matlab 7.1 trabalha com imagens de intensidade, ou seja, em tons de cinza. Com base nisso, o próximo passo foi a transformação da imagem original em tons de cinza como se pode ver na Figura 5.21.

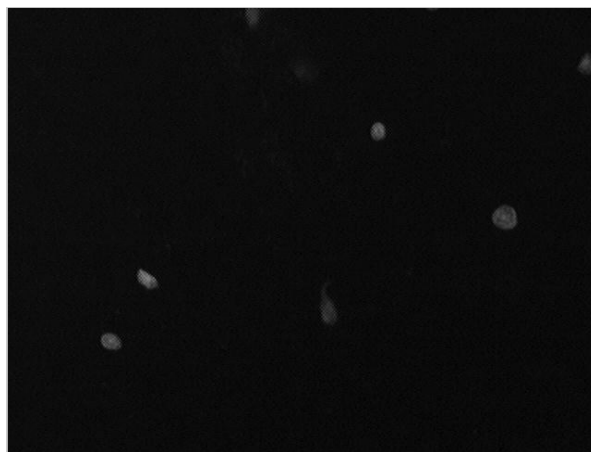


Figura 5.21: Imagem original de células S2 processada em tons de cinza para possibilitar o tratamento com o software MATLAB.

A passagem da imagem para tons de cinza pode acarretar numa imagem mais apagada sendo mais difícil diferenciar o valor de intensidade dos *pixels* e, conseqüentemente, separar algumas regiões de interesse. O passo seguinte então foi o ajuste de contraste apresentado na Figura 5.22.



Figura 5.22: Imagem de células S2 em tons de cinza após o ajuste de contraste (com o software MATLAB) da imagem apresentada na Figura 5.21.

Nota-se pela Figura 5.22 que as células ficaram mais visíveis e diferenciáveis, sendo mais fácil a distinção entre os grupos de *pixels* com valores semelhantes de intensidades. A célula destacada nessa figura, é mostrada ampliada (em zoom) na Figura 5.23, onde pode-se notar que a imagem adquirida possui ruídos, ou seja, a imagem não está lisa, sendo difícil se diferenciar o contorno da borda da célula.



Figura 5.23: Ampliação (zoom) da célula S2 destacada na Figura 5.22 para mostrar a presença de ruídos.

Para resolver esse problema de ruídos, aplicou-se um filtro na imagem, para que os mesmos fossem eliminados. Os diversos tipos de filtros testados para melhorar a imagem, apresentaram resultados semelhantes. Dentre eles escolheu-se para utilização no algoritmo o filtro da mediana, por ter um tempo de execução menor. As Figuras 5.24 e 5.25

apresentam imagens filtradas da imagem original e a célula em destaque com zoom, respectivamente.



Figura 5.24: Imagem filtrada das células S2 usando-se filtro da mediana para eliminação de ruídos da imagem da Figura 5.22.

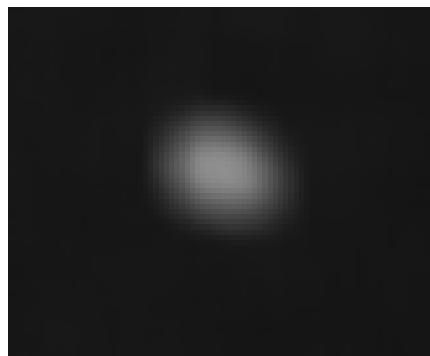


Figura 5.25: Ampliação (zoom) da célula S2 tratada com filtro da mediana e destacada na Figura 5.24

Pode-se notar pela análise da Figura 5.25 que a imagem da célula ficou mais lisa, reduzindo o erro introduzido pelos ruídos.

O próximo passo então consiste na aplicação do *thresholding*, ou seja, a segmentação da imagem em objeto e plano de fundo. Dessa maneira a imagem fica binarizada, com valores de *pixel* 1 (para o branco) e 0 (para o fundo). O valor para o *thresholding* foi obtido após uma análise do histograma da imagem da Figura 5.21, tendo-se então a faixa de níveis de cinza onde está localizada a maioria dos *pixels*. O histograma pode

ser visto na Figura 5.26. Nota-se que a maioria dos *pixels* está entre valores de 10 a 20, com isso escolhe-se o melhor valor de *thresholding* que consiga distinguir os *pixels* de interesse na hora da binarização.

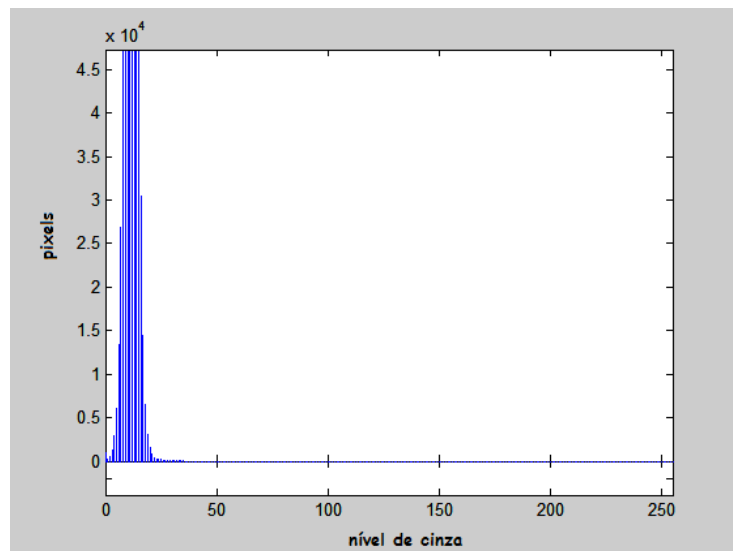


Figura 5.26: Histograma dos tons de cinza, da imagem na Figura 5.21.

A Figura 5.27 a e b apresenta a imagem com ajuste de contraste após a aplicação do *thresholding* e o *zoom* da célula em destaque, respectivamente.

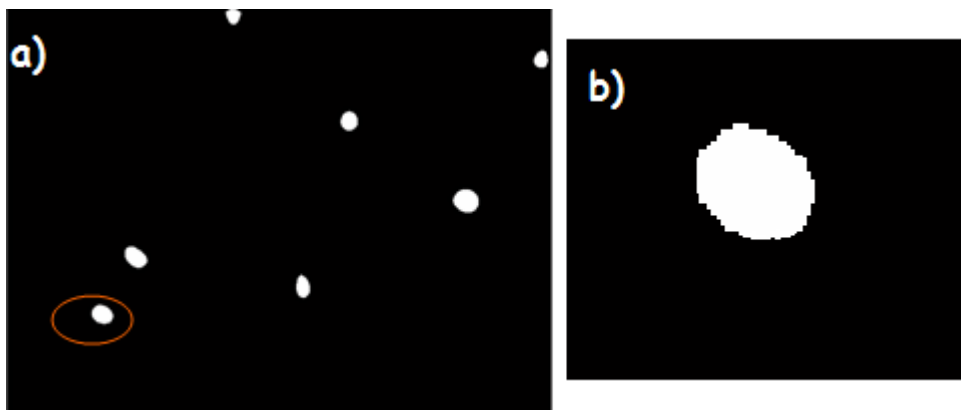


Figura 5.27: a) Imagem do ajuste de contraste após aplicação do *thresholding* na imagem das células S2 da Figura 5.24, b) zoom da célula destacada.

Se não fosse aplicado o filtro, a imagem binarizada ficaria com *pixels* soltos no plano de fundo. A Figura 5.28 a, b e c, apresenta a imagem de uma célula em tons de cinza original e sua binarização com aplicação ou não do filtro antes do thresholding, respectivamente.

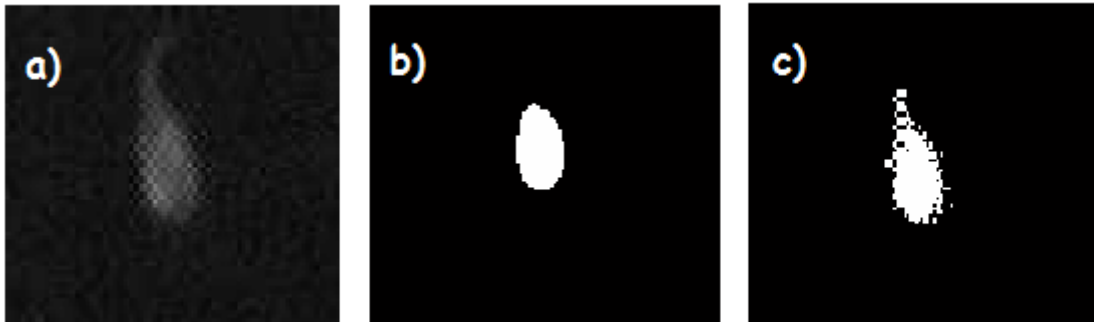


Figura 5.28: a) Imagem de uma célula em tons de cinza. b) aplicação do thresholding após filtragem da imagem original em tons de cinza, c) aplicação do thresholding sem a filtragem prévia da imagem original em tons de cinza

Esses *pixels* soltos no plano de fundo da Figura 5.28c geram erro no momento da contagem de células pois podem ser identificados como células individuais. Se mesmo filtrada, a imagem apresentar esses *pixels* soltos no plano de fundo, é nessa oportunidade que se aplicam as análises morfológicas de dilatação e erosão com a finalidade de minimizar esse problema.

Com a imagem binarizada, faz-se uma varredura pela resolução total da imagem para se encontrar regiões de *pixels* com o mesmo valor. É nessa busca que são usados os conceitos de vizinhança e conectividade de *pixels*. Uma vez determinadas essas regiões, gera-se o resultado desejado de número de células presentes na amostra. A Figura 5.29 a e b, apresenta uma imagem binária e o resultado final da contagem de células realizada pelo algoritmo, respectivamente.

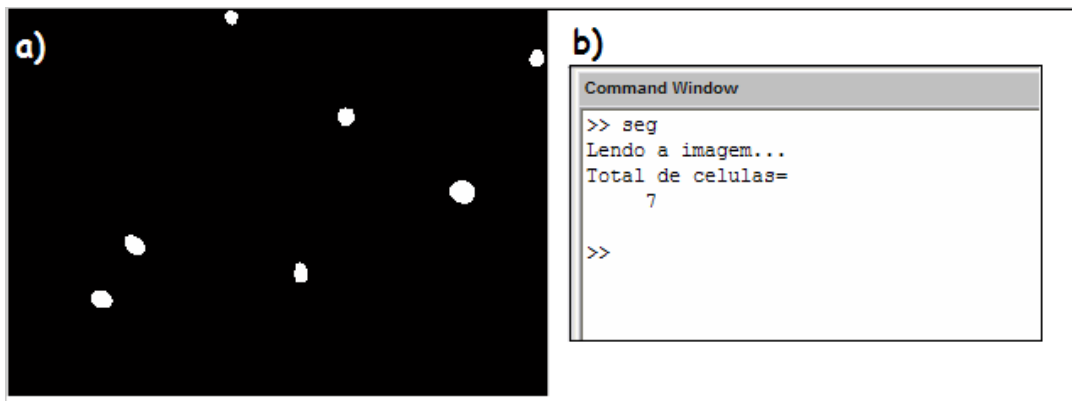


Figura 5.29: a) Imagem binária de células S2 onde será realizada a identificação de regiões, b) Janela do programa com o resultado final do algoritmo para contagem de células totais.

#### 5.4.2 Segmentação da imagem para identificação das regiões coloridas

O primeiro passo na segmentação de imagens para identificação de regiões coloridas é a divisão da imagem original em duas outras imagens (banda vermelha e banda verde), referente as intensidades das células coradas.. A Figura 5.30 a, b e c apresenta a imagem original, a imagem da banda vermelha e da banda verde, respectivamente.

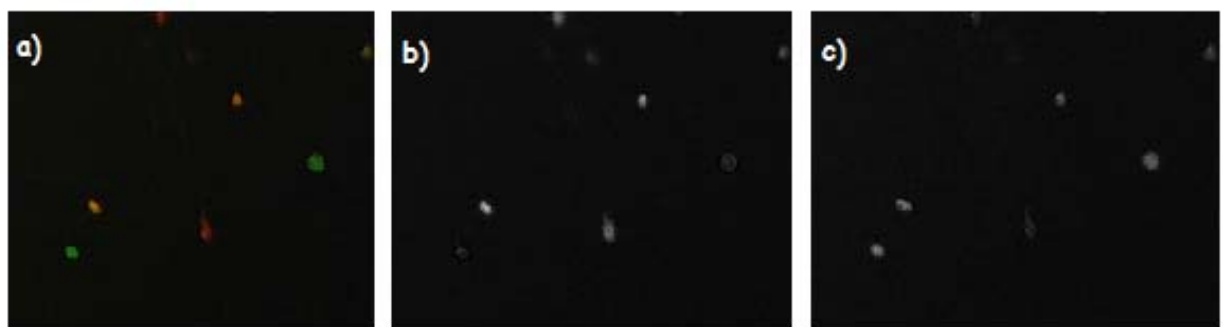


Figura 5.30: Exemplo do processamento para identificação de regiões coloridas: a) Imagem original de células S2 b) Imagem da banda vermelha, c) Imagem da banda verde

Feita essa segmentação em bandas e tendo-se a imagem binarizada obtida quando fez-se a contagem do total de células (Figura 5.29), o próximo passo foi a



identificação dessas regiões da imagem binária em cada imagem das bandas. As Figura 5.31 a, b e c apresenta uma ilustração de como atua o algoritmo ao fazer este tratamento.

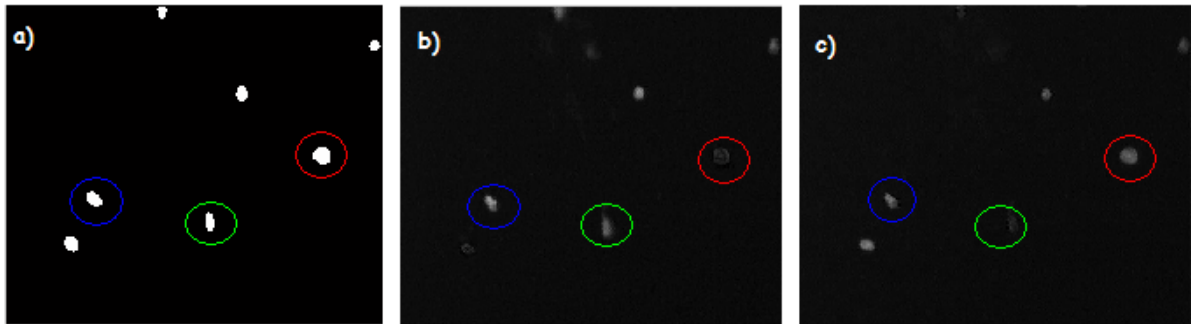


Figura 5.31: Exemplo do processamento para seleção das regiões coloridas a) Imagem binária do total de células, b) Imagem da banda vermelha a partir da imagem original, c) Imagem da banda verde a partir da imagem original.

As posições dos *pixels* referentes às células encontradas na imagem binária são encontradas nas imagens das bandas vermelha e verde juntamente com os respectivos valores de intensidade (ex: células em destaque da mesma cor em cada imagem na Figura 5.31). Fez-se uma média desses valores, obtendo-se então para a mesma região (uma célula), um valor para a banda vermelha e um valor para a banda verde.

Esses valores são comparados e decide-se então se esta célula é vermelha ou verde. Essa comparação é feita através da razão entre o valor de intensidade da banda vermelha e o valor de intensidade da banda verde.

Como essas imagens estão em tons de cinza, os valores dos *pixels* variam de 0 a 255. Sabendo-se que a banda vermelha é a que possui maiores valores de intensidade, fez-se o seguinte critério para a seleção:

- valores de razão entre 0-1: a célula é considerada verde.
- valores de razão maiores que 1: a célula é considerada vermelha.

A partir do critério escolhido, duas imagens binárias foram geradas. Uma contendo as células consideradas vermelhas e outra contendo as células consideradas verdes, como pode ser visto na Figura 5.32 a e b.

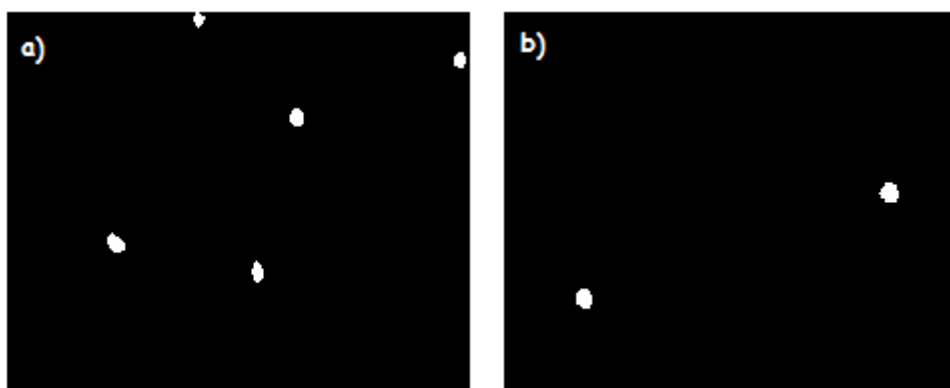


Figura 5.32: Imagens de células S2 geradas após aplicação do critério de seleção de regiões coloridas: a) células consideradas vermelhas (necróticas), b) células consideradas verdes (apoptóticas).

A Figura 5.33 a e b apresenta a imagem original colorida e a tela de saída do programa, respectivamente.



Figura 5.33: Resultado do processamento realizado com o algoritmo computacional para quantificação das células S2 totais, células S2 apoptóticas e células S2 necróticas: a) Imagem original de entrada do algoritmo, b) Imagem da tela de saída dos resultados obtidos

### 5.4.3 Problemas encontrados durante testes com as imagens adquiridas

Algumas metodologias devem ser seguidas para o uso do algoritmo, como a preparação certa da amostra líquida e o ajuste inicial de brilho e contraste no sistema de aquisição de imagens no momento da aquisição da imagem pelo computador.

Com relação a preparação, a amostra de células deve ser preparada a fim de que não se tenha aglomerados, pois isso gera erro na hora do thresholding e conseqüentemente na contagem pelo algoritmo. A Figura 5.34 apresenta uma imagem de amostra de células S2 antes e depois de se aplicar o thresholding, respectivamente.

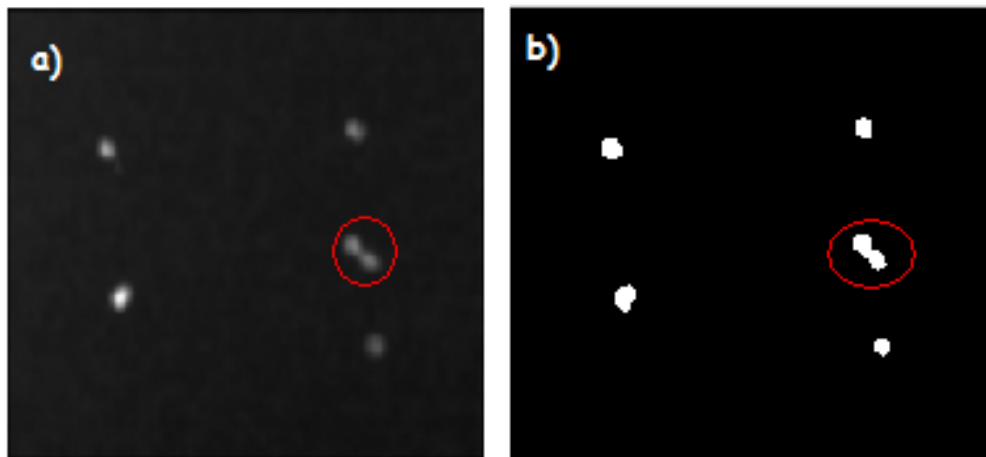


Figura 5.34: Exemplo de imagem de amostra de células S2 que geram erro no algoritmo devido a aglomeração: a) imagem em tons de cinza antes da aplicação do thresholding, b) imagem binarizada.

As células em destaque na Figura 5.34 apresentam uma situação que gera erro no algoritmo, pois as células estão muito próximas e no momento de fazer o thresholding elas apresentam *pixels* unidos. Quando o algoritmo faz a verificação da conectividade dos *pixels* e subsequentemente a contagem, as duas células são identificadas como sendo apenas uma.

O software para aquisição de imagens é o Image Pro Plus v.3.0. Nele já é possível uma correção de brilho e luminosidade antes de gravar a imagem. Os valores utilizados para aquisição foram de 60 e 63 para luminosidade e contraste, respectivamente,

sendo que o thresholding já foi padronizado para eles. Se um valor diferente for utilizado na aquisição, principalmente na luminosidade, vai gerar ruídos na imagem. A Figura 5.35 apresenta um exemplo desse caso, com uma imagem antes e depois da aplicação do thresholding respectivamente.

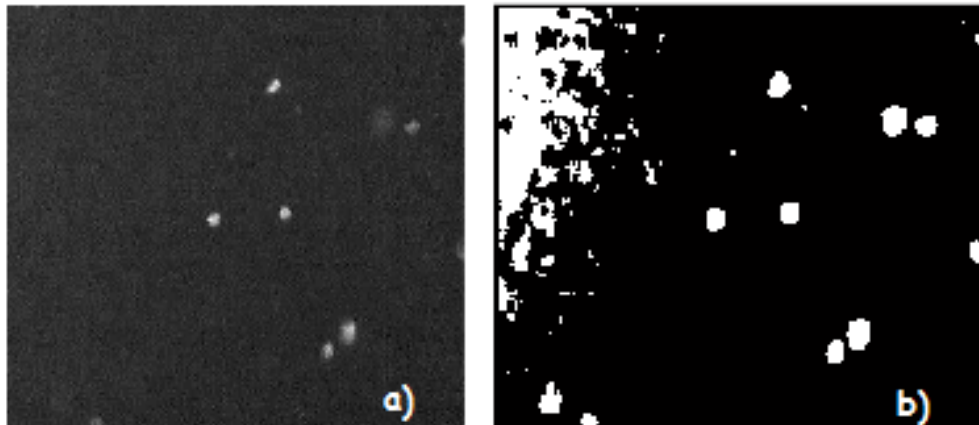


Figura 5.35: Exemplo de imagem de amostra de células S2 que geram erro no algoritmo por luminosidade inapropriada no momento da aquisição: a) imagem antes de aplicar o thresholding, b) imagem binária.

Nota-se pela Figura 5.35a que a cor do plano de fundo não é preta e sim um pouco mais clara e com alguns ruídos. No momento da aplicação do thresholding (Figura 5.35b), esses *pixels* mais claros no plano de fundo aparecem como sendo da região objeto, e são identificados como células.

Dentre todas as imagens adquiridas com as quais testou-se o algoritmo, obteve-se um erro de 30% no cálculo das células apoptóticas e necróticas. Mas esse erro está levando em consideração problemas gerados por células muito próximas (aglomeração e até mesmo divisão celular) e diferença de contraste.

Quando analisadas somente as imagens que não tiveram esses problemas, o algoritmo apresentou 2% de erro na identificação de células apoptóticas e necróticas comparado com a contagem manual, havendo uma subestimação no resultado.

#### 5.4.4 Testes do algoritmo utilizando-se os corantes YP e IP

Após a disponibilização dos corantes YP e IP e definição da metodologia computacional a ser utilizada já descrita anteriormente, imagens foram adquiridas e o algoritmo testado com os novos corantes. As imagens testadas foram adquiridas de acordo com a preparação e os padrões de aquisição já comentados. A Figura 5.36 apresenta dois exemplos.

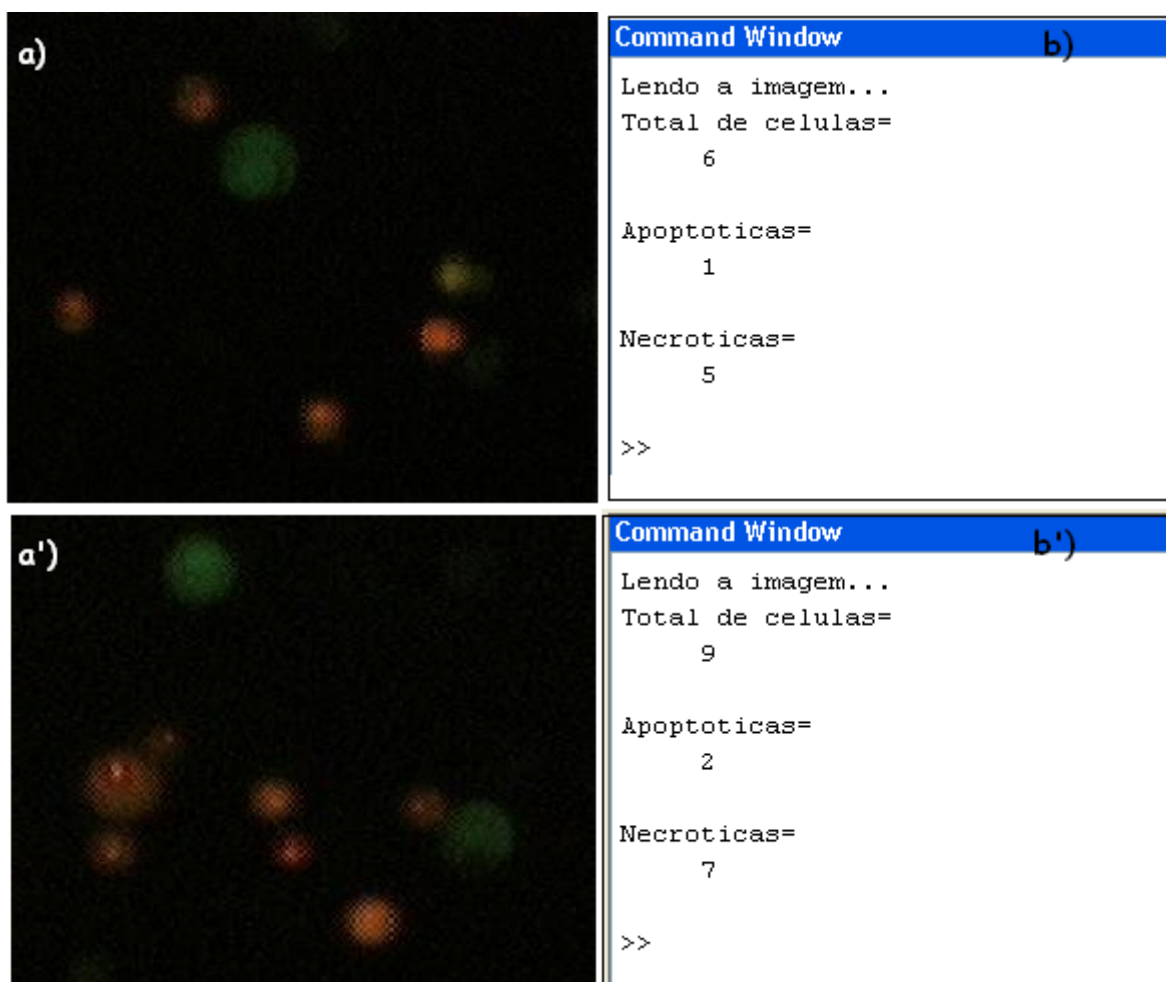


Figura 5.36: Exemplos do uso do algoritmo computacional para células S2 coradas com YP e IP, onde a e a' são imagens de entrada e b e b' são as telas de saída do algoritmo para cada imagem, respectivamente

Observados os padrões de aquisição de imagem e aglomeração, o algoritmo apresentou um erro de 3% comparado com a contagem manual. Em algumas imagens, após a binarização, alguns *pixels* foram perdidos, o que gerou erro no momento da contagem para saída do algoritmo, mas isto não foi significativo frente a quantidade de imagens analisadas. A codificação em linguagem MATLAB 7.1 do algoritmo simplificado está apresentada no Anexo A.

O interesse no uso do YP/IP como corantes para identificação do tipo de morte celular é devido ao fato de que as células vivas não são coradas, o que facilita o processo de identificação de células necróticas e apoptóticas e posterior cálculo da viabilidade.

#### **5.4.5 Identificação de células S2 para cálculo de concentração e viabilidade celular com o algoritmo**

Até esta etapa do desenvolvimento, o algoritmo foi capaz de analisar imagens fluorescentes, identificando os diferentes tipos de morte celular. O próximo passo foi a identificação do total de células a partir de uma imagem sem fluorescência, para cálculo de concentração e viabilidade celular.

Como já foi dito anteriormente, as imagens são adquiridas via hemacitômetro. O hemacitômetro é composto por 8 quadrantes. Cada grade com 4 quadrantes e cada quadrante subdividido em 16 quadrados menores. A Figura 5.37 apresenta um esquema de uma das grades do hemacitômetro com 4 quadrantes e suas subdivisões.

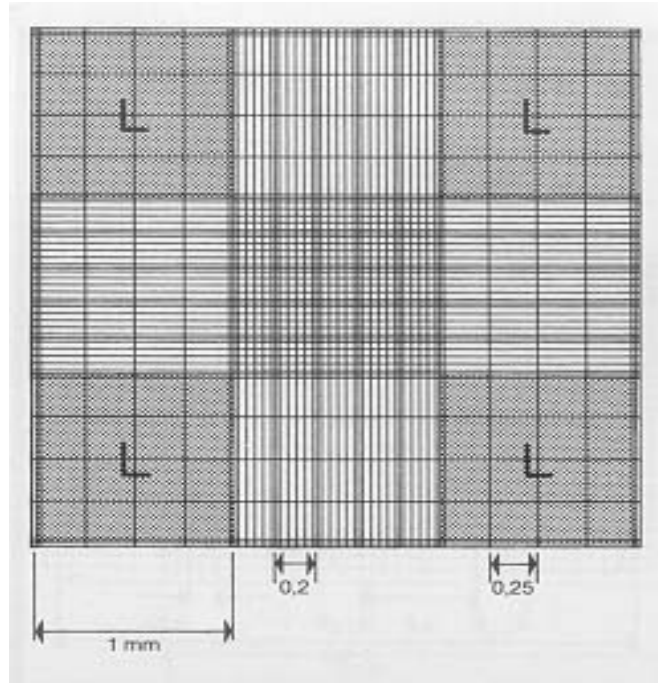


Figura 5.37: Esquema de uma das grades do hemacitômetro usado na contagem de células para obtenção de concentração e viabilidade celular. Áreas com L são referentes aos quadrantes e suas respectivas 16 subdivisões.

Cada imagem adquirida da amostra é referente à uma subdivisão. As Figuras 5.38 a e b, apresentam uma imagem sem e com fluorescência, respectivamente, para exemplificar o método de aquisição.

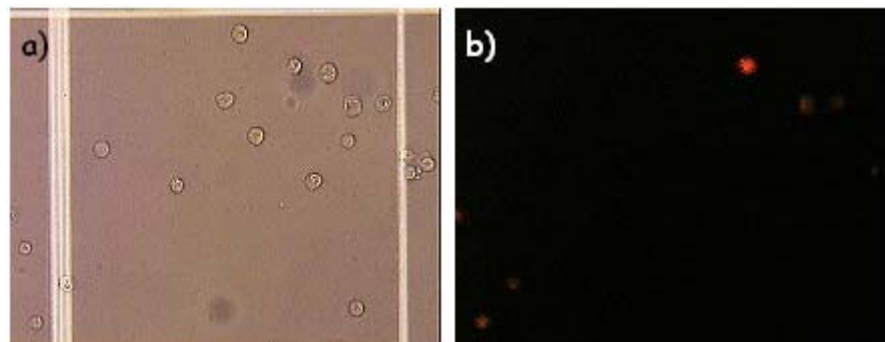


Figura 5.38: Exemplo de imagem adquirida da amostra de células S2 num hemacitômetro, a) sem fluorescência e b) com fluorescência.

Observa-se que nem todas as células presentes na imagem sem fluorescência (Figura 5.38a) aparecem na imagem com fluorescência (Figura 5.38b). Essas são as células viáveis, nas quais os corantes YP e IP não são capazes de permear as membranas.

Se os métodos de pré-tratamento forem utilizados pelo algoritmo diretamente na Figura 5.38a para identificação do total de células, essas linhas ou riscos no vidro do hemacitômetro presentes na imagem podem gerar erros na hora da binarização. A Figura 5.39 apresenta um exemplo dessa situação, uma imagem sem fluorescência, após a aplicação do thresholding (binarização).

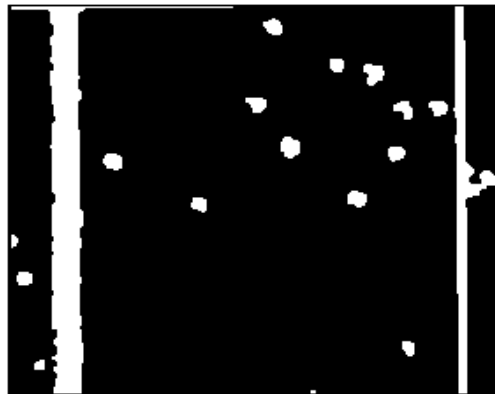


Figura 5.39: Exemplo de imagem de amostra de células S2 adquirida sem fluorescência, após binarização, sem se retirar as linhas das subdivisões do quadrante do hemacitômetro.

Para uma identificação correta apenas das células presentes dentro do limite das linhas, é necessário que tais linhas sejam identificadas e posteriormente removidas da imagem antes de se iniciar o cálculo com o algoritmo na etapa de contagem de células totais.

O primeiro passo foi fazer, após a leitura, a transformação da imagem original em uma imagem de intensidades, ou seja, tons de cinza. As Figuras 5.40 a e b, apresentam a imagem original e a imagem em tons de cinza respectivamente.



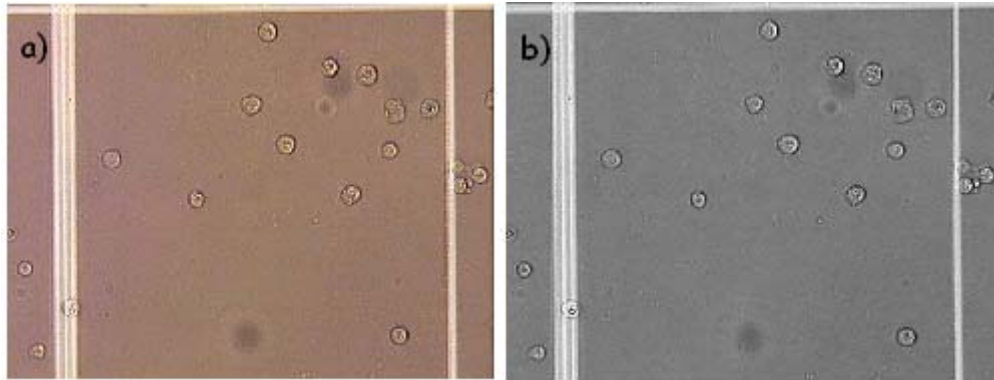


Figura 5.40: Imagem adquirida da amostra de células S2 sem o uso da luz fluorescente para identificação do total de células, a)imagem original e b)imagem em tons de cinza.

Após, aplicaram-se dois filtros (gaussiano e mediana) para remoção de ruídos e então efetuou-se a binarização, abertura e fechamento (combinação de erosão e dilatação), para uma melhor identificação da região das linhas. A Figura 5.41 apresenta a imagem final após a realização do fechamento.



Figura 5.41: Imagem binária da amostra de células S2 após realização de thresholding (com valores para a identificação da região de interesse das linhas presentes na imagem adquirida), abertura e fechamento.

Os procedimentos de abertura e fechamento são apenas para garantir que não haverá *pixels* soltos ou regiões não preenchidas na imagem. Observa-se que na Figura 5.41 apenas a região de interesse das linhas é identificada, isso é possível devido a diferença de luminosidade entre essa parte e o resto da figura que na hora do thresholding identifica as células como sendo parte do plano de fundo.

A partir da imagem após o fechamento, os índices dos *pixels* das linhas foram encontrados, e então fez-se uma busca começando pelas laterais nos quatro lados da imagem (em cima, a direita, a esquerda e em baixo) pelo primeiro local onde um ponto branco seja encontrado em cada lado(ou seja, com valores de *pixel* iguais a 1 para a imagem binária).

Os índices desses locais encontrados são armazenados e então localizados na imagem original e substituídos por valores médios entre os *pixels*. Essa substituição é feita para que não se tenha um contraste muito grande entre a região da imagem e a região substituída. A imagem 5.42 a e b, apresenta a imagem original e a imagem após a retirada das linhas e substituição dos *pixels*, respectivamente.

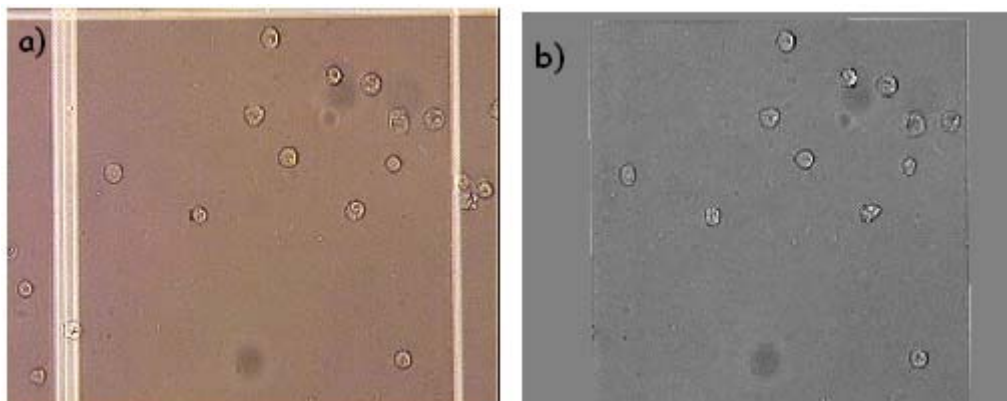


Figura 5.42: : Exemplo do tratamento para eliminar a interferência das linhas (riscos no vidro) do hemacitômetro no cálculo da concentração celular: a)imagem original; b)imagem após a retirada das linhas.

Após a remoção das linhas, teve início o procedimento para identificação de células. A imagem original foi binarizada, realizou-se fechamento e abertura e então identificou-se as regiões de interesse (determinação do total de células presentes na subdivisão). Os passos seguidos estão apresentados nas Figuras 5.43.a, b, c e d, respectivamente.

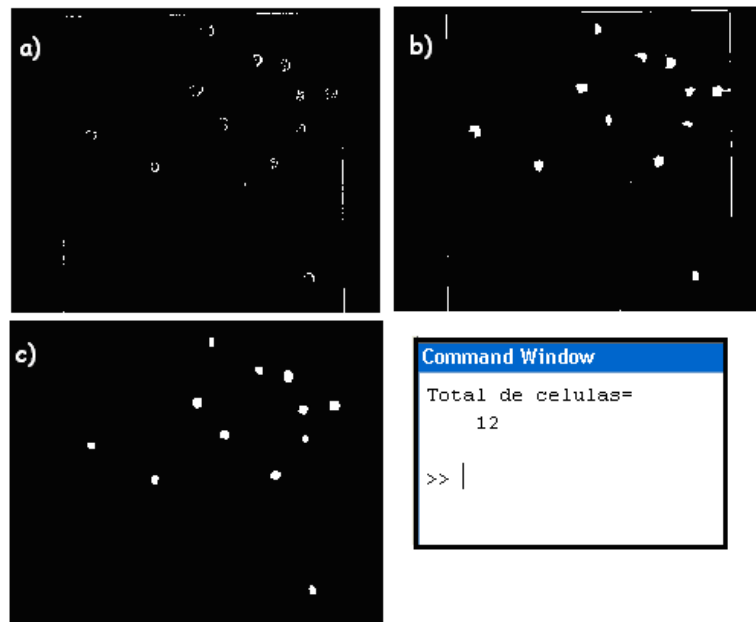


Figura 5.43: Exemplo do processamento seguido depois da eliminação das linhas (riscos) do hemacitômetro na imagem para o cálculo da concentração de células S2: a) imagem binária, b) imagem binária após realização de fechamento, c) imagem após realização de abertura e d) tela de saída do algoritmo.

Como dito anteriormente, para cada subdivisão do quadrante adquiriu-se uma imagem com e uma sem fluorescência. Mesmo a imagem com fluorescência tendo o fundo escuro, as células que por ventura estiverem fora das linhas e fluorescerem seriam contadas em duas imagens. Por isso, com os índices das linhas encontrados no tratamento anterior, também fez-se a identificação nessa imagem fluorescente e a substituição por valores de *pixels* que deixassem a região com fundo escuro. As Figuras 5.44 a e b apresentam essa etapa.

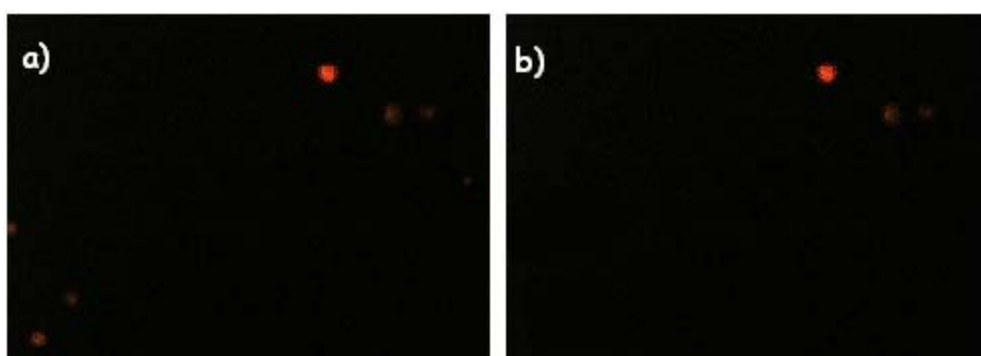


Figura 5.44: Imagem adquirida com luz fluorescente de amostra de células S2: a) imagem original e b) imagem após substituição dos *pixels* encontrados durante a etapa de remoção de linhas.

Após então, realizou-se todo o procedimento desenvolvido no item 5.4.1 para identificação das células mortas. A Figura 5.45 apresenta a imagem de entrada e a tela de saída do algoritmo para identificação de células mortas.

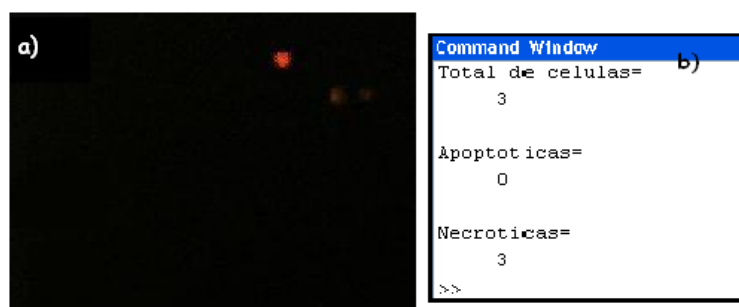


Figura 5.45: Resultado do tratamento para identificação de células S2 mortas: a) imagem de entrada (após a substituição dos *pixels* referentes as linhas) do algoritmo para identificação das células mortas; b) tela de saída

O mesmo procedimento foi seguido para cada uma das 16 subdivisões do quadrante. Os valores de células totais e células mortas foram sendo armazenados e por fim o algoritmo retorna o valor final. Para cada amostra, adquiriu-se imagens referentes à 4 quadrantes.

Dessa maneira, entrando com o valor da diluição utilizada para aquisição da amostra, foi possível o cálculo da concentração e viabilidade celular. Os valores calculados pelo algoritmo e os valores encontrados experimentalmente estão apresentados na Figura 5.46.

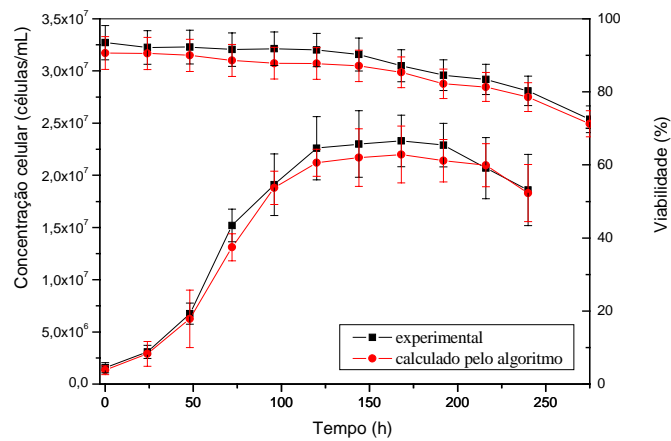


Figura 5.46: Concentração de células S2 em função do tempo obtida experimentalmente por contagem manual tradicional em hemacitômetro e obtida através do algoritmo computacional desenvolvido neste trabalho.

Observa-se pela Figura 5.46 que o algoritmo foi capaz de prever a concentração celular. Os valores obtidos ficaram bem próximos dos valores experimentais. Essa estimativa menor do que a concentração experimental é devido à aquisição de algumas imagens com aglomerados de células e outras em processo de mitose que são identificadas como sendo uma célula só. Os valores de viabilidade também ficaram bem próximos.

A Figura 5.47 apresenta uma comparação entre os valores de concentração celular experimental (obtida manualmente) e calculados pelo algoritmo.

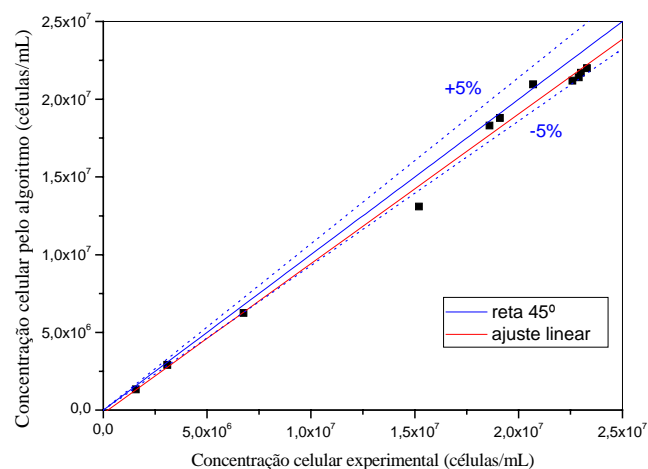


Figura 5.47: Concentração celular obtida pelo algoritmo em função da concentração celular experimental para comparação dos métodos

Observa-se pela Figura 5.47 que a maioria dos pontos está próxima a reta de ajuste linear, que teve um coeficiente de relação  $R=0,9965$ . A inclinação do ajuste linear menor que a inclinação da reta de  $45^\circ$  indica que os valores calculados pelo algoritmo foram subestimados (menores que os experimentais). Se levarmos em consideração uma variação de 5% com relação a reta  $45^\circ$  (situação ideal, onde os valores experimental e calculados pelo algoritmo seriam idênticos), todos os pontos são enquadrados, demonstrando a confiabilidade do método.

## 5.5 Interface para o usuário

Tendo o algoritmo pronto, testado e verificado, o próximo passo foi o desenvolvimento de uma interface amigável ao usuário, uma ferramenta que poderá ser muito útil para facilitar a análise de uma imagem específica de células S2 ou células semelhantes.

A Figura 5.48 apresenta a tela de abertura quando o programa é inicializado. Existem dois campos principais onde o usuário necessita entrar com os nomes das imagens de entrada. São utilizadas duas imagens, uma sem e a outra com fluorescência, para posterior cálculo da viabilidade.

O programa calcula o número de células totais, que é feito a partir da imagem de entrada sem fluorescência, e também o número de células mortas por apoptose e por necrose a partir da imagem fluorescente. Tendo esses valores armazenados, a viabilidade é calculada.

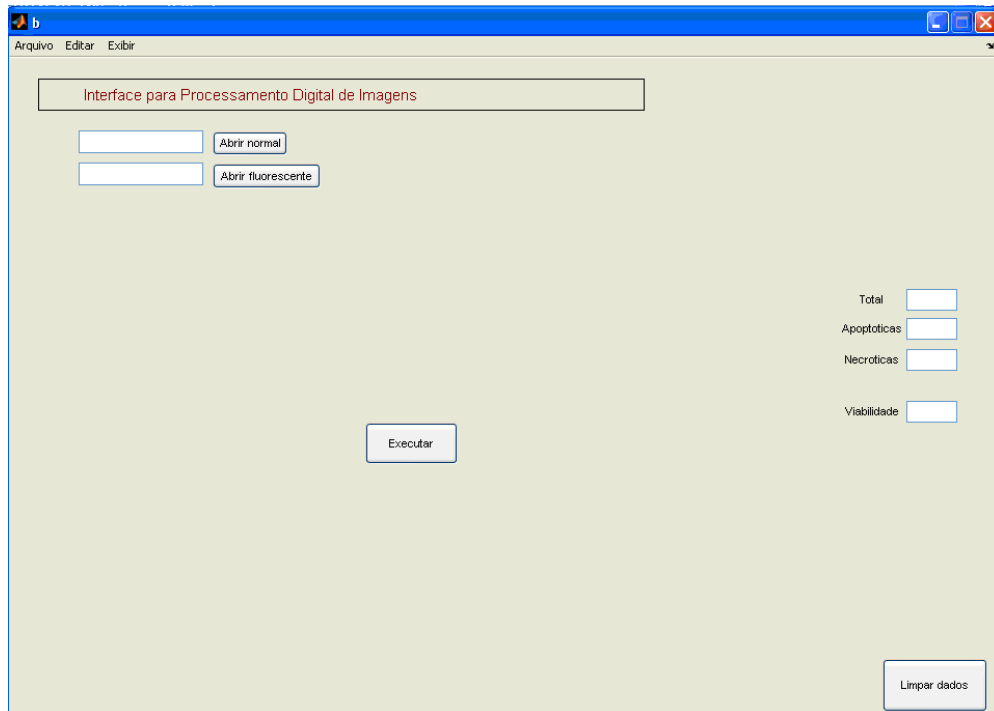


Figura 5.48: Tela de entrada da interface para o usuário, para posterior identificação de células mortas e cálculo da viabilidade.

Após digitar-se os nomes das imagens nos campos apropriados e clicar nos botões “Abrir normal” e “Abrir fluorescente”, as imagens aparecerão na tela, como mostrado na Figura 5.49. Então após clicar no botão “Executar”, o programa mostra as imagens binárias das células apoptóticas e necróticas. Também são calculados os valores do total de células presentes na amostra, o total de apoptóticas, necróticas e a viabilidade. (Figura 5.50).

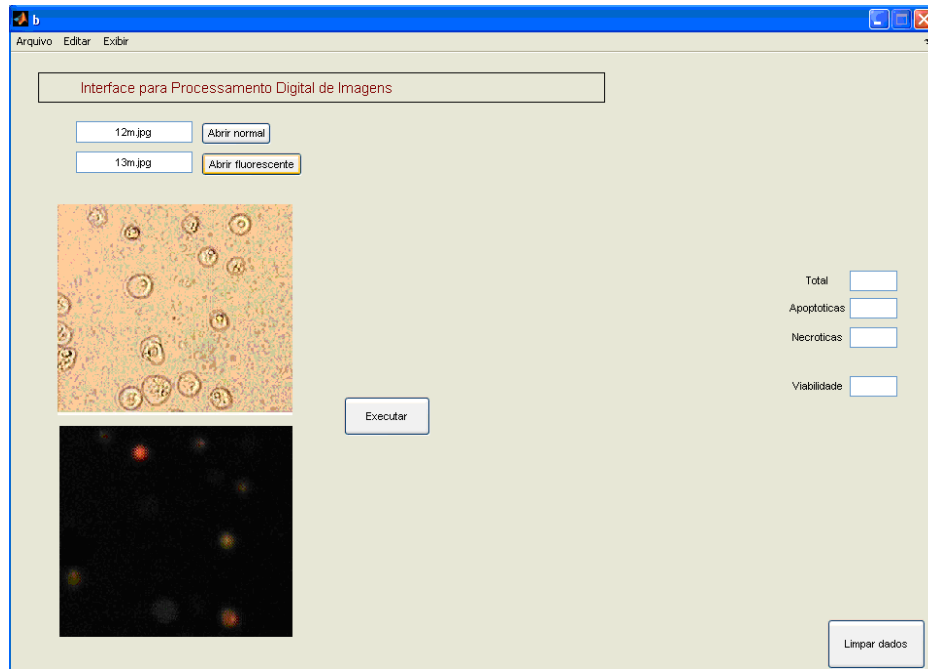


Figura 5.49: Abertura das imagens de entrada, para posterior identificação de regiões de interesse.

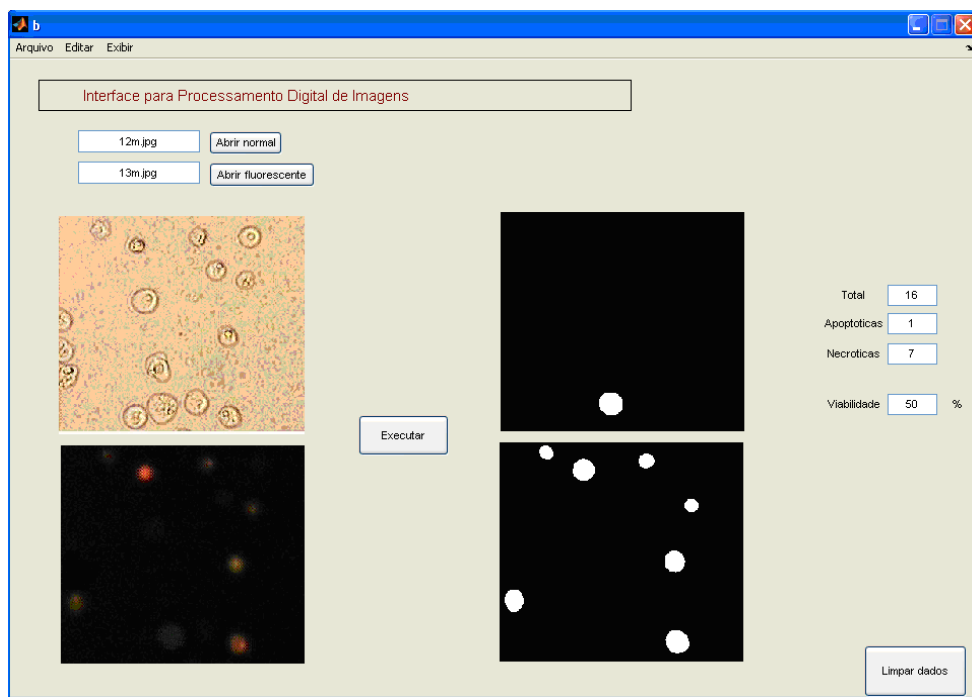


Figura 5.50: Execução do algoritmo computacional com o cálculo do número total de células S2, número de células apoptóticas e células necróticas e a viabilidade.



## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem tirar as seguintes conclusões:

- 1.A metodologia desenvolvida para o uso dos corantes YO-PRO-1 e Iodeto de Propídio para células de inseto S2, ficou bem semelhante à reportada na literatura para células de mamíferos. Os corantes possibilitaram uma distinção clara entre os dois tipos de morte celular (apoptose e necrose).
- 2.Na tentativa de definir uma metodologia para quantificar a viabilidade celular das células de insetos S2, ambos os métodos utilizados nos experimentos para acompanhar a viabilidade dessas células, o de exclusão de corante azul de Tripan e o de corantes fluorescentes (YP/IP), se mostraram rápidos, simples e confiáveis para identificação da porcentagem de células viáveis. Entretanto, o uso de corantes fluorescentes foi capaz de identificar apoptose, podendo identificar com antecedência fatores adversos ao crescimento das células, como hipóxia ou esgotamento de algum nutriente, que possam limitar a longevidade da cultura da célula de inseto.
- 3.Os corantes YP e IP mostraram-se mais sensíveis do que os corantes LA e BE na identificação do tipo de morte celular, além de serem menos tóxicos na análise das amostras, podendo permanecer por um tempo de contato maior com a célula sem causar danos. Porém, quando adicionados ao meio de cultura, causam uma inibição do crescimento celular com uma maior duração da fase lag e uma menor duração da fase exponencial.
- 4.A utilização da concentração de células mortas por lise, obtida por medidas de LDH, juntamente com a concentração de células mortas determinadas com os corantes

fluorescentes YP/IP ou LA/BE, no cálculo da viabilidade celular apresentou uma medida mais representativa da realidade do cultivo.

5. A obtenção de imagens de amostra de células S2 a partir da lâmina e lamínula, apesar de ter menos profundidade do que no hemacitômetro, se mostrou um método de fácil manuseio, com células bem definidas no momento de adquirir a imagem. Porém, à diferença do hemacitômetro, não possibilitou a determinação da concentração de células S2.
6. Seguindo-se a metodologia de aquisição de imagens isenta dos problemas de aglomeração e luminosidade, o algoritmo para identificação de células apoptóticas e necróticas apresentou um erro de 2% quando comparado ao método manual.
7. O cálculo pelo algoritmo da concentração celular ao longo do tempo ficou bem próximo do manual, diferenciando-se por erros de até 8% na contagem causados por aglomerados de células ou células em divisão. Mesmo assim, o método computacional mostrou-se simples, rápido e fácil de ser utilizado.

## **7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Para os próximos trabalhos que venham a ser desenvolvidos sobre as células de inseto S2, sugere-se:

- Avaliar cultivos com indução de apoptose para validar melhor o método de identificação pelos corantes fluorescentes e verificar o resultado comparativamente com citometria de fluxo.
- Aperfeiçoamento do algoritmo para minimização dos erros.
- Desenvolvimento de uma interface que seja capaz também de calcular a concentração celular.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABASTADO, J. P. Apoptosis: function and regulation of cell death. **Research Immunology**, v. 147, p. 443 - 456, 1996.

AGATHOS, S. N.. Insect cell bioreactors. **Cytotechnology**, v. 20, p. 173 - 189, 1996.

AKHNOUKH, R.; KRETMER, K.; SCHÜGERL, K. "On line" monitoring and control of the cultivation of the *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) insect cells and  $\beta$ -galactosidase production by *Autographa californica* virus vector. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 220-226, 1996.

AL-RUBEAI, M. et al. Cell cycle and cell size dependence of susceptibility to hydrodynamic forces. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 46, p. 88-92, 1995.

ARANTES, M. K. **Identificação de fatores metabólicos-chave da *Drosophila melanogaster* S2 visando à realização de cultivo com alta produtividade celular**. São Carlos: UFSCar / Departamento de Engenharia Química, 2004. 78p. Relatório de Iniciação Científica.

BENTING, J. et al. Protein expression in *Drosophila* Schneider cells. **Analytical Biochemistry**, v.278, p.59-68, 2000.

BIOAGENCY, **Apoptose & inflamação**. Disponível em: <[http://www.bioagency.com.br/catalogos/09\\_apoptose\\_2004.pdf](http://www.bioagency.com.br/catalogos/09_apoptose_2004.pdf)>. Acesso em 10 nov. 2006.

BITTNER, C.; WEHNERT, G.; SCHEPER, T. *In situ* microscopy for on-line determination of biomass. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 60, n. 1, p. 24-35, 1998.

BOFFA, D. J. et al. Measurement of apoptosis of intact human islets by confocal optical sectioning and stereologic analysis of YO-PRO-1-stained islets. **Transplantation** v. 79, p. 842-845, 2005.

BOROJEVIC, R. **Biotecnologia na área de saúde humana e animal, bioengenharia e biomimética**. Disponível em: <[www.anbio.org.br/pdf/2/mct\\_tendencias\\_futuras\\_saude.pdf](http://www.anbio.org.br/pdf/2/mct_tendencias_futuras_saude.pdf)>. Acesso em :12 ago. 2006.

CENTENO, T. M. **Processamento de imagens**. Disponível em: <<http://www.cpgei.cefetpr.br/~mezzadri/PDI/PDITec.html>>. Acesso em 06 out. 2005.

CHA, H. J. et al. Comparative production of human interleukin-2 fused with green fluorescent protein in several recombinant expression systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, p. 225 – 233, 2005

COLL, J.M. The glycoprotein G of rhabdoviruses. **Archive Virology**. v.140, p. 827–851, 1995.

COWGER, N. L. et al. Characterization of bimodal cell death of insect cells in a rotating-wall vessel and shaker flask. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 64, p. 14 - 16, 1999.

COSTA, W. A. et al. **Manual técnico do Instituto Pasteur: profilaxia da raiva humana**. 2. ed. São Paulo: Instituto Pastuer, 2000.

DEML, L.; WOLF, H.; WAGNER, R.. High level expression of hepatitis B virus surface antigen in stably transfected *Drosophila* Schneider-2 cells. **Journal of virological methods**, v. 79, p. 191–203, 1999.

FIORE, M.; DEGRASSI, F. Dimethyl sulfoxide restores contact inhibition-induced growth arrest and inhibits cell-dependent apoptosis in hamsters cells. **Experimental Cell Research**, v. 251, n.1, p. 102-110, 1999.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: A manual of basic technique**. 3. ed. New York: Wiley-Liss, 1994.

GAWLITTA D. et al. Evaluation of a continuous quantification method of apoptosis and necrosis in tissue cultures. **Cytotechnology**, v 46, p.139-150, 2004.

GLAZER, A. N.; RYE, H. S. Stable dye-DNA intercalation complexes as reagents for high-sensitivity fluorescence detection. **Nature** v. 359, p. 859-861, 1992.

GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. **Processamento de imagens digitais**. São Paulo: Edgard Blücher, 1992.

HAUGHLAND, R. P. **Handbook of fluorescent probes and research chemicals**. Molecular Probes.1992-1994. Disponível em: < probes.invitrogen.com/handbook/ >. Acesso em 05 set. 2006.

HORTA, M. F.; YOUNG, J. D. Apoptose: quando a célula programa a própria morte, **Ciência Hoje**, v 25 p. 38-45, 1999.

HOYLE, M. I. Recombinant gene expression in cultures *Drosophila melanogaster* cells. **Current Opinion Biotechnology**, v. 2, p. 704-707, 1991.

HWA, S. S.; HYUNG J.C.; Facile and statistical optimization of transfection conditions for secretion of foreign proteins from insect *Drosophila* S2 cells using green fluorescent protein reporter. **Biotechnology Progress**, v. 18, p. 1187-1194, 2002.

HWA, S. S.; HYE, J. L.; HYUNG, J. C. Quantitative monitoring for secreted production of human interleukin-2 in stable insect *Drosophila* S2 cells using a green fluorescent protein fusion partner. **Biotechnology Progress**, v. 19, p.152-157, 2003.

IDZIOREK, T. et al. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. **Journal of Immunological Methods** v. 185, p. 249-258, 1995.

INVITROGEN – **Drosophila Expression System**. Disponível em: < [http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/des\\_man.pdf](http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/des_man.pdf)>. Acesso em 05 set. 2006.

IKONOMOU, L.; SCHNEIDER, Y. J.; AGATHOS, S. N. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. **Microbiological and Biotechnological**, v. 62, p. 1-20, 2003.

JEROME, K. R. et al. HSV and glycoprotein J inhibit caspase activation and apoptosis induced by granzyme B or Fas. **Journal of Immunology**, v. 167, p. 3928–3935, 2001.

KEITH, M. B. et al. Screening of transformed insect cell lines for recombinant protein production. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 1046-1052, 1999.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Brasilian Journal of Cancer** ;v. 26, p. 239-57, 1972.

KLEIN, C.G. **Avaliação da arquitetura óssea trabecular por meio de processamento de imagem digital em radiografias panorâmicas**. Dez. 2005, p.87. Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica – Departamento de Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

KOLBER, M. A. et al. Measurement of cytotoxicity by target cell release and retention of the fluorescent dye *bis*-carboxyethyl-carboxyfluorescein (BCECF). **Journal of Immunological Methods** , v. 108, p. 255–264. 1988.

KONSTANTINOV, K. B. Monitoring and control of the physiological state of cell cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 52, p. 271 - 289, 1996.

Mascarenhas, N. D. **Identificação de células ativas e inativas de *Penicillium chrysogenum* por técnicas de reconhecimento de padrões**, São Carlos, UFSCar, 1996.

MENESES-ACOSTA, A.; MENDONÇA, R. Z.; MERCHANT, H.; COVARRUBIAS, L.; RAMÍREZ, O. T. Comparative Characterization of Cell Death between Sf9 Insect Cells and Hybridoma Cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72: p. 442 - 457, 2001.

McCARROLL, L.; KING, L. A.. Stable Insect Cell Cultures for Recombinant Protein Production.. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, p. 590-594, 1997.

McGUIRE, T. F.; TRUMP, D. L.; JOHNSON, C. S. Vitamin D(3)-induced apoptosis of murine squamous cell carcinoma cells: selective induction of caspase-dependent MEK cleavage and up-regulation of MEKK-1. **Journal of Biological Chemistry**, v 276, p.26365–26373, 2001.

PARK, J. C.; HWANG, Y. S.; SUH, H.. Viability evaluation of engineered tissues. **Yonsei Medical Journal**, v. 41, p. 836–844, 2000.

PFEIFER, T. A. Expression of heterologous proteins in stable insect cell culture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 9, p. 518-521, 1998.

PONS, M.N. et al.. Physiological investigations by image analysis, **Journal of Biotechnology**, v.65, p3-14, 1998.

RIESEBERG, M. et al. Flow cytometry in biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 350–360, 2001.

RIZZO, E.; TUCHIYA, H. N.; MARTINEZ, C. H.. **Técnicas básicas de cultura celular**. São Paulo: Instituto Butantan: Instituto Adolfo Lutz, 1983.

ROTH, B. L. et al. Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX Green nucleic acid stain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2421–2431, 1997.

SAKAMOTO, S.I. et al. Studies on the structures and antigenic properties of rabies virus glycoprotein analogues produced in yeast cells. **Vaccine**, v.17, p. 205-218, 1999.

SANDERSON, C. S. et al. A structured dynamic model for animal cell culture: application to baculovirus/insect cell systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3, p. 219-229, 1999.

SCHNEIDER, I.. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. **Journal Embryology**. Express Morphology, v. 27, p. 363 - 365.

SILVA, C. S.. **Avaliação diferencial de fatores fisiológicos e cinéticos em cultivos de linhagens de células selvagem e recombinante de *Drosophila melanogaster* S2**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, 2006.

SONDERGAARD, L.. *Drosophila* cells can be grown to high cell densities in a bioreactor. **Biotechnology Techniques**, v. 10, n. 3, p. 161-166, 1996.

SUZUKI, T. et al. DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry** v. 45, p.49–53, 1992.

SWIECH, K.. **Caracterização fisiológica e cinética de células de *Drosophila melanogaster* S2 visando cultivos em biorreator para produção de vacina anti-rábica recombinante**. Universidade Federal de São Carlos, Tese de Doutorado, 2007.

VALLE, M. et al. Production and purification for human menin from *Drosophila melanogaster* S2 Cells using stirred tank reactor. **Cytotechnology**, v. 35, p. 127-135, 2001.

WRONSKI, R. et al. Twocolor, fluorescence-based microplate assay for apoptosis detection. **BioTechniques**, v. 32, p.666–668, 2002.



**ANEXO A – Algoritmo simplificado para quantificação do tipo de morte celular**

```
1
2 % Inicializacao do algoritmo com a entrada da imagem original
3
4 - disp('Lendo a imagem...');
5 - im=imread('im_original.jpg');
6
7
8 % Transformacao da imagem de entrada em imagem de intensidade
9
10 - imgray=rgb2gray(im);
11
12 % Apresentacao da imagem na tela
13
14 - figure(1);
15 - set(1,'Name','Entrada');
16 - imshow(im);
17 - title('Imagem Original','color','k');
18
19 % Ajuste de contraste
20
21 - imgray_double2 = im2double(imgray);
22 - imgray_double2 = max(min(imgray_double2,1),0);
23 - imgray_double3 = imadjust(imgray_double2, [0 max(imgray_double2(:))], [0 1]);
24
25 % Aplicacao do filtro da mediana
26
27 - h = fspecial('average',11);
28 - I3 = filter2(h,imgray_double3);
29
30 % Thresholding
31
32 - bw=I3>0.2;
33
34 % Contagem de celulas totais
35
36 - [L,num] = bwlabel(bw,8);
37
38 % Divisao da imagem em bandas vermelha e verde
39 - r = im(:,:,1);
40 - g = im(:,:,2);
41
42 % Identificacao de regioes
43
44 - intMedR = zeros(1,num);
45 - intMedG = zeros(1,num);
46
47 - for i = 1:num
48
49 -     intMedR(i) = mean (r(find(L==i)));
50 -     intMedG(i) = mean (g(find(L==i)));
51
52 - end
53
```

```
54 - RAZ = zeros(1,num);
55
56 - [n,m] = size(L);
57
58 - matRotR = zeros(n,m);
59 - matRotG = zeros(n,m);
60
61 - for i=1:num
62
63 -     RAZ(i) = intMedR(i)/intMedG(i);
64
65 -     if (RAZ(i)>1)
66
67 -         matRotR(find(L==i))=1;
68
69 -     else
70
71 -         matRotG(find(L==i))=1;
72
73 -     end
74 - end
75
76 - % Contagem de celulas mortas
77
78 - [labeled,red]=bwlabel(matRotR,8);
79 - [labeled,green]=bwlabel(matRotG,8);
80
81 - % Apresentacao das imagens binarizadas de apoptose e necrose da tela
82
83 - figure(2);
84 - set(2,'Name','Apoptose');
85 - imshow(matRotG);
86 - title('Celulas apoptoticas','color','g');
87
88
89 - figure(3);
90 - set(3,'Name','Necrose');
91 - imshow(matRotR);
92 - title('Celulas necroticas','color','r');
93
94
95 - % Apresentacao da contagens realizadas |
96
97 - disp ('Total de celulas=');
98 - disp (num);
99
100 - disp ('Apoptoticas=');
101 - disp (green);
102
103 - disp ('Necroticas=');
104 - disp (red);
105
```

**ANEXO B – Algoritmo simplificado para remoção de linhas e contagem de células totais**

```
A=imread('7.jpg');

% transformação níveis de cinza
A2 = A(:,:,2);
imshow (A2);

% filtro gaussiano
H = fspecial('gaussian',5,1);
Ab = filter2(H,A2);

% média dos pixels
PixMed = mean(mean(Ab));

% filtragem mediana
Am = medfilt2(double(Ab),[7 7]);
Abw = im2bw(mat2gray(Am),0.72);

% fechamento
se = strel('disk',5);
Abw2 = imclose(Abw,se);

% abertura
se = strel('disk',3);
Abw3 = imopen(Abw2,se);

% acha índices das linhas
idx = find(Abw3 == 1);

[n,m] = size(Abw3);
step = round(n/10);

% procura primeiro ponto branco no lado esquerdo da imagem
linha = round(n/2);
iEsqu = 0;
for j=1:round(m/5)
    if Abw3(linha,j) == 1
        iEsqu = j+5;
        break;
    end
end

% procura primeiro ponto branco no lado direito da imagem
linha = round(n/2);
iDire = m;
for j=m:-1:1
    if Abw3(linha,j) == 1
        iDire = j-5;
        break;
    end
end

% procura primeiro ponto branco no lado de cima da imagem
```

```

coluna = round(m/2);
iCima = 0;
for i=1:round(n/5)
    if Abw3(i,coluna) == 1
        iCima = i+5;
        break;
    end
end

% procura primeiro ponto branco no lado de baixo da imagem
coluna = round(m/2);
iBaix = n;
for i=round(n/5):-step:1
    if Abw3(i,coluna) == 1
        iBaix = i-5;
        break;
    end
end

Abw4 = Abw3;
Abw4(1:iCima,:) = 1;
Abw4(iBaix:n,:) = 1;
Abw4(:,1:iEsqu) = 1;
Abw4(:,iDire:m) = 1;

se = strel('disk',7);
Abw5 = imopen(Abw4,se);
figure, imshow (Abw5);

% indices dos pixels a serem cortados
idx = find(Abw5==1);

% substituicao pela media das intensidades
% imagem original
A2(idx) = PixMed;

% imagem filtrada por filtro gaussiano
Ab2(idx) = PixMed;
figure, imshow(Ab2);

bw1= im2bw(A2,0.65);
figure, imshow(bw1), title('Imagem Binária', 'color', 'c');

% fechamento
se = strel('disk',7);
bw2 = imclose(bw1,se);
figure, imshow(bw2);

% abertura
se = strel('disk',5);
bw3 = imopen(bw2,se);

figure, imshow(bw3);

[L,num4] = bwlabel(bw3,4);
disp ('Total de células=');
disp (num4);

```