

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

*“CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA E FISIOLÓGICA DE UM
SISTEMA CÉLULAS Sf9/ BACULOVÍRUS RECOMBINANTE PARA A PRODUÇÃO DE
CANACISTATINA”.*

Mabel Karina Arantes

SÃO CARLOS - SP

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

***“CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA E FISIOLÓGICA DE UM
SISTEMA BACULOVÍRUS RECOMBINANTE/CÉLULAS Sf9 PARA A PRODUÇÃO DE
CANACISTATINA”.***

Mabel Karina Arantes

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio A. T. Suazo

Co-orientador: Prof. Dr. Flávio H. da Silva

SÃO CARLOS - SP

2007

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

A662cc

Arantes, Mabel Karina.

Construção e caracterização cinética e fisiológica de um sistema células Sf9/ baculovírus recombinante para a produção de Canacistatina / Mabel Karina Arantes. -- São Carlos : UFSCar, 2007.

110 f.

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

1. Biotecnologia. 2. Proteínas recombinante. 3. Cultura de células. 4. Baculovírus. I. Título.

CDD: 660.6 (20^a)

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo a Deus pela dom da vida, pela oportunidade de aprofundar meus estudos e por sua Providência durante este Mestrado.

Aos meus pais Manoel e Maria Antonia e aos meus irmãos Magda, Marluce, Matheus e Mayra pelo apoio constante e incondicional.

Aos professores, Dr. Cláudio Alberto Torres Suazo e Dr. Flávio Henrique da Silva, pela orientação e oportunidade de trabalho nas áreas de Engenharia Bioquímica e Biologia Molecular.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Ao professor Bergmann Moraes Ribeiro (UNB) cujos conhecimentos e solicitude foram importantíssimos neste trabalho.

A Mylene de Mello Silva pela grande colaboração na minha introdução ao 'mundo da Biologia Molecular'.

Ao Helton, por seu carinho e atenção que suavizaram os momentos complicados.

Ao Grupo de Oração Universitário (GOU) Jesus Vive, da UFSCar, por me tornar possível conciliar Fé e Razão na Universidade e aos meus muitos amigos do GOU.

Aos amigos do laboratório por toda colaboração e pela ótima convivência.

*Aos meus pais,
Manoel e Maria.*

SUMÁRIO

Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	v
Lista de Abreviaturas e Símbolos	vi
Resumo	vii
Abstract	viii
1. Introdução.....	1
2. Objetivos	5
3. Revisão Bibliográfica	6
3.1 Proteínas cistatinas: inibidoras de cisteínoproteases	6
3.2 Expressão de proteínas de planta pelo sistema células Sf9/baculovírus	8
3.3 Utilização de células de inseto para obtenção de produtos gênicos recombinantes	9
3.4 Células de inseto Sf9, <i>Spodoptera frugiperda</i>	11
3.5 Vírus e baculovírus.....	12
3.6 Sistema de expressão células de inseto/baculovírus.....	13
3.7 Obtenção de baculovírus recombinante pela técnica de tranposição	17
3.8 Ciclo da infecção celular e subsequente expressão da proteína	18
3.9 Cultivo de células de inseto e infecção viral em bioreatores.....	23
3.10 Caracterização fisiológica das células Sf9	25
3.10.1 Metabolismo de carboidratos	26
3.10.2 Metabolismo de aminoácidos	27
3.11 Escolha do meio de cultura mais adequado.....	30
3.12 Estratégias de infecção : multiplicidade da infecção (MOI) e densidade celular na infecção (CCI)	32
3.13 Comentários gerais sobre a Revisão Bibliográfica.....	35
4. Materiais e métodos.....	37
4.1 Materiais	37
4.1.1 Linhagem celular: preservação e ativação.....	37
4.1.2 Meios de cultura	38
4.1.3 Baculovírus recombinante.....	38
4.2 Metodologia de construção do baculovírus recombinante	38
4.3 Experimentos de cultivo em frascos schott	43
4.4 Experimentos de infecção viral em frascos schott.....	44
4.5 Métodos analíticos.....	45
4.6 Métodos de determinação dos parâmetros cinéticos ou fisiológicos.....	46

4.6.1 Velocidade específica máxima de crescimento, $\mu_{\text{máx}}$	46
4.6.2 Sensibilidade da célula ao cisalhamento	47
5. Resultados e discussão	48
5.1 Construção do baculovírus recombinante, vAcCANA	48
5.1.1 Clonagem do gene de interesse no vetor de expressão pFastBac HTB.....	48
5.1.2 Geração do bacmídeo recombinante por transposição	51
5.1.3 Geração do baculovírus recombinante por transfecção de células Sf9: dificuldades encontradas e soluções propostas.....	53
5.1.4 Características morfológicas de células infectadas por baculovírus recombinante	55
5.2 Experimentos de cultivo de células Sf9 em frascos schott.....	59
5.2.1 Crescimento de células Sf9 em meio TNM-FH	60
5.2.2 Crescimento de células Sf9 em meio SF900 II	62
5.2.3 Efeito da densidade de inóculo e velocidade de agitação.....	63
5.2.4 Efeito da aeração do cultivo	65
5.2.5 Otimização do meio de cultura: combinação entre SF900 II e TNM-FH com SFB.....	68
5.2.6 Combinação entre SF900 II e TNM-FH sem a utilização de SFB.....	72
5.2.7 Caracterização do metabolismo de carboidratos.de células Sf9 nos diferentes meios e condições de cultivo	73
5.2.8 Metabolismo de aminoácidos	80
5.2.9 Sensibilidade de células Sf9 ao cisalhamento	82
5.3 Experimentos de infecção de células Sf9 em schott para expressão de canacistatina	84
5.3.1 Ensaio preliminar de expressão em placa de poços.....	84
5.3.2 Infecção em frascos schott e purificação da canacistatina	86
5.3.3 Produção de Canacistatina em diversas condições de infecção	87
5.4 Considerações finais: produção de Canacistatina em célula de inseto X bactéria	91
6. Conclusões	93
7. Sugestões.....	96
Referências	97
Apêndice A.....	104
Apêndice B.....	105
Apêndice C.....	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 Ilustração do ciclo da infecção e produção de proteína para baculovírus do tipo MNPV, expressando poliedrina.....	21
Figura 3.2 Ilustração do ciclo da infecção e produção de proteína para baculovírus do tipo MNPV recombinante (que não expressa poliedrina).....	21
Figura 3.3 Células Sf9 infectadas com AgMNPV.....	23
Figura 3.4 Metabolismo de aminoácidos proposto para células Sf9.....	28
Figura 4.1 Representação esquemática da construção do baculovírus recombinante.....	39
Figura 4.2 Seqüência da fase aberta de leitura da Canacistatina.....	40
Figura 4.3 Mapa do vetor de expressão pFastBac HT A.....	41
Figura 4.4 Elementos envolvidos na transposição em células competentes DH10Bac.....	41
Figura 4.5 Fluxograma de um experimento de cultivo de células Sf9 típico.....	43
Figura 4.6 Fluxograma de um experimento de infecção de células Sf9 com Baculovírus....	45
Figura 5.1 Géis de Agarose: PCR da Canacistatina mantida em pET28-a e de reação de clivagem do plasmídeo pFastBac HTB (B).....	49
Figura 5.2 Gel de Agarose: PCR de colônia da transformação pFastBac + cDNA da Canacistatina.....	49
Figura 5.3 Gel de Agarose das reações de clivagem do vetor de expressão antes e após ligação.....	51
Figura 5.4 Esquema da confirmação da transposição por PCR com <i>primers</i> M13F e M13R.....	52
Figura 5.5 Gel de Agarose: PCR de bacmídeo recombinante com <i>primers</i> M13F e M13R.....	52
Figura 5.6 Proposta para identificação da proteína recombinante-protocolo Invitrogen.....	53
Figura 5.7 Gel de Agarose: RT-PCR.....	54
Figura 5.8 Gel de Agarose: PCR de DNA de ' <i>Budded Virus</i> '.....	55
Figura 5.9 Formação de poliedros em células Sf9 infectadas com AgMNPV.....	56
Figura 5.10 Células Sf9 infectadas com baculovírus recombinante, vAcCANA.....	57
Figura 5.11 Distribuição de diâmetro celular para células Sf9 infectadas e não infectadas..	58
Figura 5.12 Crescimento e viabilidade de células Sf9 em meio TNM-FH + 10% de SFB...	60
Figura 5.13 Efeito da densidade do inóculo e da velocidade de agitação para cultivos de células Sf9.....	63
Figura 5.14 Efeito da aeração do cultivo de células Sf9.....	66
Figura 5.15 Produção de lactato para cultivos de células Sf9 sob diferentes condições.....	67

Figura 5.16 Comparação entre os cultivos de células Sf9 nos meios SF900 II e Meio 50%	69
Figura 5.17 Cultivo de células Sf9 em Meio 50% sem SFB.....	72
Figura 5.18 Comparação entre os cultivos nos três meios de cultura.....	73
Figura 5.19 Consumo de glicose e maltose para células Sf9 cultivadas nos diferentes meios de cultura.....	74
Figura 5.20 Cultivo de células Sf9 em diferentes meios de cultura suplementados com 0,6 g/L de maltose	77
Figura 5.21 Cultivos de células Sf9 em diferentes meios de cultura suplementados com 2,0 g/L de maltose	78
Figura 5.22 Variação dos aminoácidos para cultivos de células Sf9 em meio SF900 II.....	81
Figura 5.23 Variação dos aminoácidos para cultivos de células Sf9 em Meio 50% sem SFB	82
Figura 5.24 Efeito do cisalhamento sobre células Sf9	83
Figura 5.25 Análise por <i>Western Blotting</i> : Tempo de coleta da canacistatina.....	85
Figura 5.26 <i>SDS-Page e Western Blotting</i> da purificação de Canacistatina em coluna de níquel	86
Figura 5.27 Infecção de células Sf9 com vAcCANA sob diferentes condições	87
Figura 5.28 Variação dos aminoácidos ao longo de infecções.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Comparação entre os sistemas de expressão por baculovírus e bacteriano	15
Tabela 3.2 Crescimento de células de inseto lepidópteros em diferentes meios de cultura ..	31
Tabela 5.1 Planejamento de análise de restrição do vetor de expressão	50
Tabela 5.2 Comparação entre valores de densidade celular máxima ($X_{máx}$), Velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{máx}$) e Tempo de geração (t_g).....	65
Tabela 5.3 Dados da literatura para cultivos de células Sf9 em SF900 II	68
Tabela 5.4 Composição dos meios de cultura utilizados neste trabalho	71
Tabela 5.5 Resumo dos consumos de glicose e maltose para cada cultivo	75
Tabela 5.6 Velocidades específicas de crescimento ($\mu_{máx}$) e Tempos de geração (t_g) para diferentes cultivos de células Sf9	79
Tabela 5.7 Resumo das variáveis e resultados dos experimentos de infecção	89
Tabela 5.8 Comparação entre o rendimento da produção de Canacistatina e de outras proteínas recombinantes	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LATECC	Laboratório de Tecnologia de Cultivo Celular
AcMNPV	<i>Autographa californica</i> Multiple Nuclear Polyhedrosis Vírus
AgMNPV	<i>Anticarsia gemmatilis</i> Multiple Nuclear Polyhedrosis Vírus
vAcCANA	Baculovírus recombinante para expressão de canacistina
Sf9 e Sf21	Células do ovário da pupa de <i>Spodoptera frugiperda</i>
T ni	<i>Trichoplusia ni</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SVEB	Sistema Vetor de Expressão Baculovírus
HPLC	High Performance Liquid Chromatograph
RPM	Rotações por minuto
CCI	Cell Concentration at the Infection (Densidade Celular na Infecção)
MOI	Multiplicity of Infection (multiplicidade de infecção)
PCR	Polimerase Chain Reaction
PFU	Plaque Forming Unit (unidades formadoras de placa; partículas infecciosas)
$\mu_{\text{máx}}$	Velocidade específica máxima de crescimento
$X_{\text{máx}}$	Densidade celular máxima
C_{maltose}	Concentração de maltose
C_{glicose}	Concentração de glicose
Aa	Aminoácido
BV	Budded Vírus (partículas virais infecciosas geradas na infecção)
pFastBac HTB	Plasmídeo de expressão, doador do gene de interesse
pFastBac-CANA	Plasmídeo de expressão contendo o cDNA que codifica para a Canacistatina
p.i.	Pós-infecção

RESUMO

O desenvolvimento da biotecnologia tem permitido a obtenção, entre tantos produtos biotecnológicos, de muitas proteínas recombinantes utilizadas amplamente como vacinas, hormônios, enzimas e outras formas de atividade terapêutica humana. Isto é possível através da multidisciplinaridade, onde por tecnologia do DNA recombinante clona-se a região codificadora do gene de interesse em um sistema de expressão adequado para super-expressão da proteína correspondente e, pela tecnologia de bioprocessos torna-se possível o aumento de escala de obtenção do produto recombinante, garantindo sua reprodutibilidade, integridade e funcionalidade. Envolvendo estas duas áreas do conhecimento, o presente trabalho tem como objetivo a expressão de uma proteína heteróloga, a Canacistatina, natural da cana-de-açúcar, através do sistema de expressão eucariótico células Sf9/baculovírus. Isto abrange a construção de um baculovírus recombinante, contendo o cDNA que codifica para a Canacistatina, e a caracterização do cultivo de células Sf9 e do processo de infecção por baculovírus, em termos cinéticos e fisiológicos. Para estes fins, foram realizados experimentos de cultivo de células Sf9 em frascos *Schott* de 100 mL, com volume de trabalho de 20 mL, a 27°C, nos quais foram analisadas as condições ótimas de velocidade agitação, densidade de inóculo, meio de cultura e também o papel dos substratos, obtendo-se que um crescimento celular otimizado pode ser conduzido a 100 rpm de agitação, com densidade de inóculo de 1×10^6 cel/ml e utilizando uma combinação 1:1 entre os meios SF900 II e TNM-FH (Meio 50%), sem a necessidade de adição de Soro Fetal Bovino. Este último aspecto representa uma grande vantagem em relação aos bioprocessos utilizando células Sf9 já conhecidos. Foi construído o baculovírus recombinante contendo o gene da Canacistatina a partir do genoma modificado de *Autographa californica* Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus e os experimentos de infecção de células Sf9 foram realizados sob três valores de MOI (1, 5 e 10 pfu/cel) nos dois meios de cultura. Os melhores resultados obtidos apontam para a infecção de células Sf9 em Meio 50% com MOI de 5,0 pfu/cel, condições nas quais a produtividade de Canacistatina alcançou 28 $\mu\text{g}/10^6\text{cel}$.

ABSTRACT

The development of the biotechnology has permitted to achieve, among other biotechnological products, many recombinant proteins which are largely used as vaccines, hormones, enzymes and other ways of human therapeutic activity. This is possible because the multidisciplinary: through the technology of the recombinant DNA the region that encode gene of interest is cloned in a system of adequate expression for super-expression of the correspondent protein and, through the technology of bioprocess is possible to increase the obtaining scale of the recombinant product assuring its reproducibility, integrity and functionality. Involving these two areas of knowledge, this works intends to express an heterolog protein, the Canacistatina, deriving from sugar cane, through an eucariotic expression system Sf9/baculovirus. This implies in the construction of a recombining baculovirus, containing the cDNA which codifies to the Canacistatina, and also the characterization of the cultivation of Sf9 cells, and of the process of infection by baculovirus, in kinetics and physiologic terms. In order to obtain these purposes it was done experiments of cultivation of Sf9 cells in Schott bottles of 100 mL, with work volume of 20 mL, in 27° C. In these experiments it was analyzed the optimum conditions of velocity agitation, inoculum's density, culture environment, and also the role of substrates. In relation to these parameters, it was observed that a better cell growth can be conducted in a 100 rpm of agitation, in an inoculum's density of 1×10^6 cell/ml, using a combination of 1:1 between the mediums SF900 II and TNM-FH (Medium 50%), without the necessity of addition of Bovine Fetal Sorum. This last aspect represents a great advantage in relation to the bioprocesses, in a way that it uses Sf9 cells already known. It was construed the recombining baculovirus containing the Canacistatina's gene through the modified genome of the baculovirus *Autographa californica* Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus and the infection experiments of Sf9 cells was made under three MOI values (1, 5 e 10 pfu/cell) in the two culture mediums. The better results indicates to infection of Sf9 cells in 50% Medium using MOI= 5 pfu/cell, conditions that the Canacistatina's productivity reached $28 \mu\text{g}/10^6 \text{ cel}$.

1. INTRODUÇÃO

Os produtos biotecnológicos beneficiam a maior parte dos indivíduos da nossa sociedade, direta ou indiretamente, devido à grande abrangência multidisciplinar da Biotecnologia. Dentre estas áreas, uma das que mais cresceu com o desenvolvimento biotecnológico foi, sem dúvida, a farmacêutica apoiada no progresso das engenharias genética e bioquímica.

Por meio da engenharia genética é possível a identificação de genes que codificam proteínas de interesse e a sua transferência para organismos que passem a produzi-las em maior escala; este é o caso, por exemplo, da produção de insulina humana através da transferência do cDNA correspondente para microorganismos como bactérias, fazendo com que estas passem a produzir insulina recombinante (termo utilizado para todo produto produzido por um organismo através da manipulação e transferência de genes). A partir da escolha de um sistema de expressão adequado para obtenção de um determinado produto recombinante, a engenharia bioquímica auxilia no desenvolvimento deste bioprocessos para ser utilizado em escala industrial em condições otimizadas de produtividade e custo.

Embora bactérias e leveduras tenham sido e ainda sejam utilizadas para a produção de várias proteínas recombinantes, há restrições no que diz respeito à produção de proteína que reproduza com fidelidade a atividade funcional da sua similar encontrada em células de mamíferos, uma vez que para apresentar a devida atividade biológica as proteínas passam geralmente por modificações pós-traducionais, que as bactérias não são capazes de promover e as leveduras fazem, porém de modo diferente do que ocorre em células humanas. Isto poderia gerar proteínas imunogênicas ou com funções diferentes das originais, tornando-as inutilizáveis. Já a utilização de células de mamíferos para a produção industrial de proteínas recombinantes não enfrenta este tipo de problema, porém constitui-se uma opção de alto custo

devido às dificuldades tecnológicas encontradas no cultivo deste tipo de célula e às restrições de biossegurança impostas pelos órgãos reguladores (VAN DER POOL e TRAMPER, 1998).

É neste contexto que células de inseto despontam como importantes hospedeiros eucarióticos para a produção de proteínas recombinantes com adequada atividade terapêutica, associando a capacidade de realização das modificações pós-traducionais com o menor custo de manutenção de bioprocessos em relação às células de mamíferos, já que são capazes de crescer em suspensão, possibilitando a utilização de biorreatores de fácil operação, entre outras vantagens (PFEIFER, 1998). O sistema de expressão da proteína pode envolver somente a célula, através de uma modificação genética estável onde o gene de interesse é inserido no genoma da célula e todas as células geradas desta conterão a informação genética heteróloga. Pode ainda utilizar um vetor sem provocar alteração genética estável na célula, como é o caso da infecção viral em que o gene para expressão da proteína está inserido no vírus recombinante de modo que células infectadas com este vírus passam a produzir a proteína de interesse.

Para este último sistema de expressão utilizando a infecção viral da célula de inseto para expressão da proteína recombinante, todo o procedimento biotecnológico envolvido está baseado no fenômeno natural da alta susceptibilidade de algumas linhagens de células de inseto à infecção por um tipo especial de vírus, os baculovírus (família *Baculoviridae*). Algumas destas linhagens são as células Sf9 e Sf21, isoladas do tecido do ovário da pupa de *Spodoptera frugiperda* (lagarta que ataca alface, alfafa, algodão, amendoim, arroz, batata, cana-de-açúcar, feijão, milho, pimentão, soja, sorgo e trigo). Também células de Tni, *Trichoplusia ni* (lagarta que ataca algodão, brócolis, couve, couve-flor, crisântemo, espinafre, melão, repolho e soja e tomate) apresentam a mesma susceptibilidade (MONTOR e SOGAYAR, 2003).

Baculovírus têm em sua constituição grande quantidade de determinadas proteínas que são expressas sob fortes promotores, destacando-se as proteínas estruturais p10 e poliedrina. A partir deste fato surgiu a idéia da substituição do gene que codifica tais proteínas e que não são essenciais, por genes que codifiquem proteínas recombinantes (O'REILLY, MILLER e LUCKOW, 1994). Deste modo, é amplamente utilizado o sistema de expressão baculovírus/célula de inseto, que consiste em construir um baculovírus recombinante contendo o cDNA para a proteína de interesse sob o promotor da poliedrina e infectar células de alta susceptibilidade a este tipo de infecção, podendo separar no momento adequado a proteína recombinante do *pellet* celular, se ela não for secretada, ou do sobrenadante, se for secretada. A inconveniência deste sistema, entretanto, é a natureza lítica pois as células infectadas morrem por lise liberando enzimas proteolíticas que aceleram a degradação do produto.

Assim, o sistema célula Sf9/baculovírus será utilizado no presente trabalho para a produção da proteína recombinante Canacistatina através da construção do baculovírus recombinante correspondente e infecção das células Sf9, com a finalidade de desenvolvimento de um bioprocessos para obtenção dessa proteína em grande escala. A proteína Canacistatina é natural da cana-de-açúcar e sua produção recombinante já foi avaliada num sistema bacteriano, utilizando células de *E. coli* BL21 (DE3) (SOARES-COSTA *et al.*, 2002), sendo que neste mesmo trabalho foi verificada sua atividade de inibição de cisteínoproteases. Este tipo de protease, além de exercer atividades normais do metabolismo celular, está relacionado a uma série de desordens metabólicas provocadas em vários sistemas celulares que abrangem desde plantas até humanos (Oliva *et al.*, 2004) como consequência de degradação protéica.

A proteína Canacistatina produzida no presente trabalho pelo sistema eucariótico células Sf9/baculovírus é, por um lado, modelo para o estudo deste sistema de expressão

incluindo os aspectos cinéticos e fisiológicos do bioprocesso, além de possibilitar a avaliação das possíveis alterações (como modificações pós-traducionais) em relação à proteína produzida em bactéria.

Na realização desta pesquisa multidisciplinar a primeira etapa, que consistiu na construção do sistema recombinante célula Sf9/baculovírus, foi feita no Laboratório de Biologia Molecular do Prof. Flávio Henrique da Silva do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos. A segunda etapa, que envolveu estudos cinéticos e fisiológicos para definição de um processo de cultivo celular para produção da Canacistatina, foi desenvolvida no Laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares (LATECC) do Professor Cláudio Torres Suazo do Departamento de Engenharia Química, também da Universidade Federal de São Carlos.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

1) Construção do baculovírus recombinante para expressão de Canacistatina a partir do genoma modificado do baculovírus ‘*Autographa californica* Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus’ (AcMNPV), comercial.

2) Determinação das características fisiológicas e cinéticas de células de *Spodoptera frugiperda* Sf9 antes e após a infecção, e a partir disto definir as condições de cultivo e de infecção que deverão ser seguidas para um bioprocessamento otimizado, em escala de laboratório.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta revisão bibliográfica visa abordar os assuntos relacionados ao objetivo deste trabalho, possibilitando um melhor entendimento do estado da arte e dos aspectos mais importantes sobre a proteína recombinante de interesse, a tecnologia de cultivo de células de inseto e a produção de proteínas recombinantes pelo sistema de expressão células Sf9/baculovírus.

3.1. Proteínas Cistatinas: inibidoras de cisteíno proteases.

A Canacistatina é uma proteína natural da cana-de-açúcar que apresenta atividade de inibição de cisteíno proteases (SOARES-COSTA *et al.*, 2002). Ela se encontra entre tantos inibidores de proteases produzidos por plantas, como mecanismo de defesa contra proteases liberadas por insetos herbívoros e também por fungos patogênicos, sendo que esta capacidade tem atraído a atenção dos pesquisadores com interesse em aplicações tecnológicas.

Enzimas proteolíticas ou proteases (ou proteinases/ peptidases) estão envolvidas em processos digestivos, liberação de peptídeos fisiologicamente ativos, ativação complementar, processos inflamatórios e outros processos. São agrupadas em seis categorias de acordo com o aminoácido essencial ao seu sítio ativo, pH ótimo, seqüências similares de aminoácidos, similaridade de inibidores e outros fatores:

- Proteases de serina: resíduos de serina ou histidina no sítio ativo;
- Proteases de cisteína: resíduos de cisteína no sítio ativo;
- Proteases de ácido aspártico : resíduos de ácido aspártico no sítio ativo;
- Metaloproteases: íon metálico no sítio ativo ;
- Proteases de treonina: resíduos de treonina no sítio ativo e
- Proteases de ácido glutâmico: resíduos de ácido glutâmico no sitio ativo.

Exemplos destas proteases são encontrados em plantas, insetos, microorganismos e são muito similares àquelas encontradas em mamíferos. Devido à atuação destas enzimas na degradação protéica observa-se que além de suas participações normais nos processos metabólicos, muitas atividades indesejáveis podem ser a elas atribuídas envolvendo degradação de proteínas, ação de antígenos, processos hormonais, inflamações, invasões tumorais entre outros (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Verifica-se então a necessidade de inibidores específicos de proteases, que são proteínas encontradas naturalmente em alguns organismos e que uma vez identificadas podem ser estudadas com a finalidade de sua produção por tecnologia do DNA recombinante. Este é o caso da Canacistatina, proteína inibidora de cisteínoproteases, expressa naturalmente na cana-de-açúcar. O cDNA desta cistatina foi caracterizado e purificado e a proteína foi expressa em *Escherichia coli* por Soares-Costa *et al.* (2002), que avaliaram também sua atividade antifúngica sobre fungos filamentosos *Trichoderma reesei*. A Canacistatina apresentou também atividade sobre cisteínoproteases de fontes vegetais (papaína, cruzaína e baupaína) e humanas (catepsinas humanas L, K, V e B) (OLIVA *et al.*, 2004).

É conhecida também a alta atividade de cisteínoproteases durante a infecção por baculovírus, envolvidas tanto com a expressão da proteína como com sua degradação posterior. Neste caso Gotoh, Mochizuki e Kikuchi (2001) testaram a expressão de proteína recombinante por células Sf9/baculovírus adicionando cistatinas ao meio e observaram os efeitos antagônicos de diminuição da expressão enquanto se oferece, por outro lado, proteção contra proteólise. Além disso, em plantas conhece-se o efeito de cisteínoproteases na ativação de apoptoses e a expressão de uma cistatina em planta mostrou efeito direto no bloqueio deste processo (SOLOMON *et al.*, 1999). Isto sugere o estudo do efeito antiapoptótico da Canacistatina, por exemplo, bem como sua atividade de inibição de proteases quando se expressa proteína muito susceptível à proteólise.

3.2 Expressão de proteínas de plantas pelo sistema células Sf9/baculovírus

É conhecida a utilização de células de inseto/baculovírus para expressão de proteínas de plantas para várias finalidades, desde superexpressão e caracterização até solução de problemas de atividade/funcionalidade protéica. Shah *et al.*, 2001, estudaram a expressão de uma proteína quinase de cenoura pelo sistema Sf9/baculovírus, como primeiro teste de expressão, observando fidelidade na expressão e funcionalidade da proteína.

Olezak *et al.*, 2002, expressaram proteína de planta em célula de inseto por infecção com baculovírus como modo alternativo à expressão em *E.coli*, cuja proteína recombinante não apresentou funcionalidade; também a expressão em levedura havia resultado atividade protéica muito baixa. A proteína expressa em célula de inseto foi secretada para o meio e apresentou atividade e propriedades enzimáticas similares à natural, expressa na planta.

De modo similar, Massott, Fleig e Palme (1995), utilizaram Sf9/baculovírus para expressão da proteína At-ERabp1, uma proteína que liga auxina, natural da planta *Arabidopsis thaliana*, cuja seqüência possui dois sítios de glicosilação. Observou-se a ocorrência de glicosilação na proteína expressa por este sistema onde a diferença de massa molecular correspondeu à adição de duas manoses, nos sítios previstos de glicosilação.

No caso da Canacistatina, foi utilizado até o momento o sistema de expressão bacteriano (*E. coli* BL21 (DE3)). Neste caso a proteína obtida apresentou atividade inibidora sobre cisteínoproteases de fontes vegetais e humanas (OLIVA *et al.*, 2004). Na pesquisa aplicada à saúde humana, este resultado é muito importante já que a proteína inibe a ação de catepsinas lisossomais, que, além do seu papel fisiológico normal, integram os processos biológicos que originam problemas como osteoporose, câncer, distrofia muscular ou doenças do coração. Essa descoberta pode ter uma importante aplicação na medicina, nascendo daí a possibilidade de empregar essa molécula no desenvolvimento de novos medicamentos (www.revistapesquisa.fapesp.br/ciencia).

A expressão da Canacistatina através de um sistema eucariótico (células Sf9/baculovírus) permitirá elucidar as possíveis alterações na expressão e funcionalidade desta proteína, se for o caso.

3.3 Utilização de células de inseto para obtenção de produtos gênicos recombinantes

A principal razão para a recente intensificação do interesse na cultura de células de inseto é que estas células têm surgido como importantes hospedeiros eucarióticos para a expressão de produtos gênicos recombinantes, com diversas vantagens sobre os sistemas já utilizados com células eucarióticas, como células de mamíferos, que geralmente necessitam de incubação com CO₂ e da adição de Soro Fetal Bovino (SFB) ao meio de cultura, itens que a cultura de células de inseto dispensa. Além disso elimina-se o risco de contaminação humana já que o uso de células de mamíferos envolve, em geral, linhagens estabelecidas em cultura e susceptibilidade à infecção por vírus tumorais, capazes de infectar não apenas este tipo de célula, mas também humanos (PFEIFER, 1998).

Deve-se acrescentar a estas vantagens a relativa facilidade que células de inseto apresentam de crescerem em suspensão, o que facilita a construção de bioreatores para seu cultivo e também as operações de aumento de escala. Além disso, estas células de inseto são capazes de realizar grande parte das reações pós-traducionais que ocorrem em outras células eucarióticas, permitindo a atividade funcional. Entre os vários tipos de modificação pós-traducionais possíveis, a glicosilação (adição de açúcares) é uma das mais importantes e melhor executadas por células de inseto; a glicosilação está associada à taxa de *'clearance'* das proteínas (eliminação da circulação sanguínea por filtração, por exemplo) e a certas propriedades como antigenicidade, imunogenicidade, atividade biológica específica, solubilidade, resistência à inativação térmica, resistência ao ataque de proteases e outras (O'REILLY, MILLER e LUCKOW, 1994).

Para que a expressão de produtos gênicos recombinantes seja otimizada, o primeiro passo é a escolha do sistema de expressão adequado. Neste sentido existem sistemas baseados na transformação estável, onde o gene clonado pode ser colocado sob controle de um promotor de transcrição apropriado, adicionado às células de inseto, e a subpopulação de células que contém o novo gene pode ser selecionada, expressando então o produto de maneira contínua, já que o gene de interesse passa a integrar o genoma celular (JARVIS *et al.*, 1990). Este é o caso da transfecção de células de *Drosophila* para expressão de proteínas receptoras GABA-A (JOYCE *et al.*, 1993) e de células de *Spodoptera frugiperda*, Sf9, para expressão da proteína β -galactosidase (AKHNOUKH, KRETZMER e SCHUGERL, 1996), entre tantas outras linhagens celulares e proteínas recombinantes.

Além deste sistema existe o SVEB, Sistema Vetor de Expressão Baculovírus, em que se utiliza a linhagem celular selvagem e baculovírus recombinante, ou seja, o gene de interesse está inserido no DNA viral e ao realizar a infecção viral das células de inseto, hospedeiras neste caso, estas passarão a replicar o vírus bem como expressar a proteína codificada pelo DNA recombinante, sem que ocorra integração do gene de interesse ao DNA celular. Para este tipo de sistema utiliza-se largamente a linhagem celular Sf9, derivada de *Spodoptera frugiperda*, por sua alta susceptibilidade à infecção por baculovírus. Para esta linhagem a infecção viral é o melhor sistema de expressão em termos quantitativos: Jarvis *et al.* (1990), apresentaram que para a expressão da β -galactosidase o rendimento foi cerca de 1000 vezes mais baixo em células transfectadas do que naquelas infectadas com baculovírus recombinante. Em alguns casos, entretanto, justifica-se o uso da transfecção pelo fato de não ocorrer comprometimento das células por infecção viral, que ocasionam a lise e morte celular, liberando proteases para o meio.

3.4 Células de inseto Sf9 de *Spodoptera frugiperda*

Células Sf9 são derivadas do ovário da pupa de *Spodoptera frugiperda*, a ‘lagarta do cartucho do milho’. A alta susceptibilidade destas células à infecção por baculovírus, assim como sua habilidade para crescer rapidamente a temperaturas próximas a 26°C e sua alta capacidade de secreção de proteína, fazem destas células um sistema favorável para a produção laboratorial e industrial de proteínas recombinantes utilizando baculovírus como vetor de expressão.

A morfologia esférica das células de inseto Sf9 faz com que sejam mais resistentes à agitação mecânica, o, que é um fator muito favorável para cultivos em suspensão. Além disso, sua habilidade de rápido crescimento faz com que os tempos de incubação sejam curtos, baixos os gastos com substrato para manutenção e altos os rendimentos celulares. Segundo Doyle & Griffiths (1998) estas características fizeram da célula Sf9 a escolha preferida para a produção em grande escala de produtos como β -lactoglobulina, receptor β -adrenérgico e bioinseticidas.

Células Sf9 foram utilizadas para expressar nucleoproteínas e glicoproteínas do vírus *lymphocytic choriomeningitis*, LMCV, por Matura *et al.* (1986), hemaglutinina do vírus influenza por Ceilingh *et al.*(1987) e Kuroda *et al.* (1988), antígeno de superfície da hepatite B por Cohran *et al.* (1987) e receptor CD4 dos linfócitos T4 por Webb *et al.* (1989) (*apud* O'REILLY, MILLER e LUCKOW, 1994). Mais recentemente, a proteína GFPuv (GOTOH *et al.*, 2001), a proteína humana rHAM⁺ (TAYLOR *et al.*, 2006), a proteína VP2 (LECINA *et al.*, 2006). Também proteínas de plantas foram expressas como a proteína de *Arabidopsis thaliana* (MASSOTE, FLEIG e PALME, 1995), uma fosfatase de planta (OLEZAK e OLEZAK, 2005), uma quinase originária de cenoura (SHAH *et al.*, 2001), entre outras.

3.5 Vírus e baculovírus

Os vírus não têm a organização complexa das células e são estruturalmente muito simples: DNA ou RNA envolvido por uma capa protéica. Incapazes de crescer em meios artificiais, eles são parasitas intracelulares obrigatórios que dominam a maquinaria genética da célula hospedeira a fim de que ela passe a sintetizar moléculas e gerar novas partículas virais. Tal dependência varia com a complexidade do vírus em termos de número de genes. Por exemplo, bacteriófagos possuem menos de 10 genes e dependem quase totalmente da célula hospedeira; outros vírus com genes em número de 30-100 são mais independentes (o DNA de um baculovírus tem entre 80 e 200 Kilobases, Kb) (O'REILLY, MILLER e LUCKOW, 1994).

Analisando a estrutura de um vírus encontra-se o vírion ou partícula viral que é constituído por material genético envolto em capsídeo protéico e ainda em uma membrana bilipídica (envelope), para o caso de vírus envelopados. O capsídeo é sempre formado de um número de moléculas protéicas individuais que se arranjam precisa e repetitivamente ao redor do ácido nucléico sendo que poucos vírus têm um único tipo de proteína em seu capsídeo; a maioria deles tem diversas subunidades protéicas distintas quimicamente e cujas associações específicas constituem os capsômeros, ou seja, o capsídeo é composto de capsômeros.

A expressão baculovírus diz respeito ao formato baculiforme (formato de bastão) do envelope que constitui os '*Budded Virus*'. Outro tipo de classificação separa os baculovírus como granulosos (GV: *granulosis virus*) ou poliédricos (NPV: *nuclear polyhedric virus*). O primeiro refere-se a um único nucleocapsídeo envelopado disposto em uma matriz protéica granular; o segundo contém um ou mais nucleocapsídeos (neste caso MNPV_ *multiple nuclear polyhedric virus*) em uma matriz protéica de formato poliédrico, cuja principal constituinte é a proteína poliedrina.

Além do ácido nucléico, a composição protéica do vírus é muito importante pois muitos vírions possuem dentro do capsídeo uma ou mais enzimas que são liberadas após o desnudamento do vírus dentro da célula hospedeira; estas enzimas atuam na replicação do ácido nucléico.

Dois baculovírus comumente utilizados para trabalhos de expressão de proteínas por infecção de células de lepidópteros são o AcMNPV, '*Autographa californica* Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus' e o BmNPV, '*Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus'. AcMNPV, o baculovírus mais freqüentemente utilizado tem dois produtos gênicos de fase tardia, as proteínas poliedrina e p10, cujos genes não são necessários para a produção de partículas infecciosas na cultura celular. Os promotores destas proteínas são fortes e podem ser utilizados para a síntese de grande quantidade de proteína recombinante, uma vez que o DNA viral pode acomodar gene heterólogo sem qualquer prejuízo (MONTOR e SOGAYAR, 2003).

3.6 Sistema de expressão células de inseto/baculovírus

O desenvolvimento do sistema de expressão de proteínas recombinantes em células de inseto/baculovírus, mais precisamente células Sf9, partiu da observação de um fenômeno natural: o ciclo de replicação do baculovírus. Observou-se que larvas de insetos lepidópteros infectadas com este vírus- como lagartas de *Spodoptera frugiperda* por exemplo- morriam após alguns dias e mostravam-se repletas de partículas virais e proteína viral, poliedrina, cuja função é a proteção do vírus que fica acomodado dentro do poliedro.

O promotor para síntese da poliedrina é excepcionalmente forte mas o ciclo infeccioso viral não depende da presença da proteína. Conseqüentemente, é razoável que a substituição deste gene pelo de uma proteína heteróloga seguido da infecção de células com este baculovírus geneticamente modificado poderiam resultar na produção de grandes

quantidades da proteína de interesse. Além disso, devido à similaridade nas modificações pós-traducionais entre os sistemas de insetos e mamíferos, tal proteína apresentaria a autenticidade na forma e funcionalidade da proteína pretendida (MONTOR e SOGAYAR, 2003).

Os baculovírus (família *Baculoviridae*) pertencem a um grupo diverso de vírus com DNA dupla fita que infectam insetos, especialmente lepidópteros, como seus hospedeiros naturais. A infecção é altamente específica e não se conhece sua propagação em outro hospedeiro. O baculovírus extensivamente utilizado como vetor de expressão é o ‘*Autographa californica* Multiple Nuclear Polyhedrosis Vírus’ (AcMNPV) que infecta *Autographa californica* e mais de 30 espécies de insetos, sendo que é comum encontrar o uso deste baculovírus para infectar células de *Spodoptera frugiperda*, Sf9. Nestas células o promotor para síntese da poliedrina é especialmente ativo, produzindo altas quantidades de poliedrina ou proteína recombinante.

O sistema de expressão com vetor baculovírus (BEVS – *Baculovirus Expression Vector System*, aqui denominado SVEB) é um dos mais poderosos e versáteis sistemas de expressão eucarióticos existentes e tem sido usado para expressar genes heterólogos de diferentes fontes, incluindo vírus, bactérias, fungos e plantas, em células de inseto (CRUZ *et al.*, 1998). Diversos fatores têm tornado o SVEB vantajoso, comparativamente, para muitas aplicações, como pode ser visto na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Comparação entre o SVEB e o sistema bacteriano para expressão de proteínas.*

FATORES	SVEB	SISTEMA BACTERIANO
Simplicidade para uso	X	X
Tamanho da proteína	Não limitado	< 100 KD
Expressão de múltiplos genes	X	
Transporte nuclear	X	
Atividade funcional da proteína	X	Algumas vezes
Fosforilação	X	Algumas vezes
Glicosilação	X	
Acilação	X	
Seleção de <i>Intron</i>	X	
Sinal de clivagem peptídica	X	

*Adaptado de Baculovirus Expression Vector System Manual, 1994.

]Além destes fatores pode-se citar:

- a) Atividade funcional da proteína recombinante: O SVEB é capaz de levar à expressão de proteínas recombinantes contendo os dobramentos apropriados (forma), ligações de dissulfeto e oligomerização além de o sistema ser capaz de realizar modificações pós-traducionais; tais características conferem semelhanças à proteína natural tanto estrutural como funcionalmente, a menos que a atividade da proteína esteja ligada a modificações específicas.
- b) Modificações pós-traducionais: Várias modificações pós-traducionais têm sido observadas no uso de SVEB tais como glicosilação, fosforilação, acilação, carboximetilação, amidação, clivagem peptídica e proteolítica (O'REILLY,

MILLER e LUCKOW, 1994). Tais modificações são frequentemente idênticas àquelas observadas em proteínas expressas em seu meio celular natural. Entretanto, a alta velocidade de expressão de um gene pelo SVEB pode oprimir a modificação resultando em baixos níveis de glicosilação e fosforilação.

c) Altos níveis de expressão: comparados a outros sistemas de expressão eucarióticos, o fator que mais distingue o SVEB é o potencial para alcançar altos níveis de expressão de um gene clonado. O mais alto nível de expressão observado é de 50% do valor total protéico de uma célula, o que corresponde a aproximadamente 1 grama de proteína recombinante para 10^9 células, similarmente aos rendimentos de poliedrina. Mais comum, entretanto, é a obtenção de 10-100 mg de proteína recombinante por 10^9 células (O'REILLY, MILLER e LUCKOW, 1994).

d) Simplicidade das técnicas envolvidas no SVEB, tanto na obtenção do baculovírus recombinante quanto na infecção viral das células.

e) Expressão simultânea de múltiplos genes: SVEB oferecem a capacidade de expressão de dois ou mais genes simultaneamente em uma única célula de inseto infectada, o que está ligado à larga capacidade de inserção de genes clonados nos nucleocapsídeos do baculovírus e ao fato de ele possuir pelo menos dois promotores fortes, das proteínas poliedrina e p10. Assim, proteínas complexas que dependem da formação de dímero ou multidímero podem ser obtidas.

f) Facilidade de purificação das proteínas recombinantes uma vez que é possível cultivar as células de inseto em meio de cultura livre de soro.

g) Baixo risco de contaminação dos manipuladores e do ambiente devido à especificidade de hospedeiros (insetos).

Estes fatores associados a todas as demais características do sistema células de inseto/baculovírus o tem tornado amplamente utilizado para obtenção de proteínas recombinantes funcionais com altos rendimentos.

3.7 Obtenção do baculovírus recombinante pela técnica de transposição

A transposição consiste na mudança de local de um fragmento de DNA dentro de um genoma, realizado por enzimas transposases. Para que esta mudança ocorra é necessário que a seqüência a ser transposta esteja ladeada por sítios doadores de transposição e que no local de destino do fragmento haja sítios receptores de transposição. Esta competência é encontrada na bactéria *DH10Bac* (Figura 4.4), que além do seu próprio genoma contém o genoma do baculovírus (denominado bacmídeo) e um plasmídeo auxiliar que codifica para transposases. No bacmídeo há sítios receptores de transposição situados de modo que o gene transposto fique sob controle do promotor da poliedrina.

As etapas para obtenção do baculovírus recombinante podem ser resumidas como segue:

- a) Clonagem do gene de interesse no vetor de expressão, entre os sítios doadores de transposição e sob controle do promotor da poliedrina;
- b) Obtenção do bacmídeo recombinante: transformação da bactéria *DH10 Bac* com o vetor de expressão contendo o cDNA do gene de interesse;
- c) Seleção de colônias bacterianas recombinantes: com a multiplicação das bactérias nas quais ocorreu transposição o bacmídeo recombinante é reproduzido. O plaqueamento é realizado em meio contendo a combinação de antibióticos adequada (de acordo com os genes de resistência a antibiótico contidos nos genoma da bactéria, bacmídeo e plasmídeo auxiliar) e também na presença de substrato X-Gal e

de indutor para expressão de β -galactosidase, IPTG. Assim, as colônias brancas indicam a interrupção do gene lacZ e são isoladas para a confirmação da recombinação.

- d) Extração dos bacmídeos recombinantes;
- e) Transfecção das células de inseto com o bacmídeo recombinante: o genoma do bacmídeo é inserido nas células utilizando-se reagentes que formam lipossomas, ou seja, vesículas lipídicas que transportam em seu interior o DNA a ser inserido. No núcleo da célula, este novo DNA é reconhecido e começa a utilização da maquinaria celular para síntese das moléculas virais, mas sem a integração do DNA heterólogo ao DNA celular, ou seja, a expressão ocorre de maneira similar a uma expressão transitente;
- f) Produção do baculovírus recombinante pelas células de inseto transfectadas: nesta primeira produção são obtidas partículas virais e proteína recombinante, porém em baixa concentração;
- g) Amplificação do estoque viral: utiliza-se uma parcela do inóculo viral obtido anteriormente para infectar novas células e obter cultura com maior concentração viral possível (alto título). A amplificação pode ser repetida duas vezes pois a passagem por várias ampliações pode produzir mutações.

Após a amplificação o estoque viral é titulado e pode ser utilizado nos experimentos de expressão a MOI (*Multiplicity of infection*) conhecidos.

3.8 Ciclo da infecção celular e subsequente expressão da proteína

Uma vez que vírus não possuem atividade metabólica própria, sua propagação se dá pela replicação na célula hospedeira, na qual os processos metabólicos são redirecionados e passam a estar em função do vírus, produzindo seus componentes protéicos e ácido nucléico.

O ciclo de infecção celular provoca uma seqüência de eventos tanto no que diz respeito à célula hospedeira como à replicação viral em si e pode ser descrito sob estes dois aspectos (pensando no baculovírus ‘selvagem’ que produz poliedrina):

A) Ciclo da infecção – como acontece a infecção e a replicação viral.

1. Etapa de fixação ou adsorção do vírus: Esta fase é pré-requisito essencial no processo de infecção viral e requer a presença de receptores específicos presentes na superfície da célula susceptível à infecção. Se a célula perde o receptor para um vírus específico não é mais infectada por ele. Para vírions nus (sem envelope) as proteínas da superfície do capsídeo são provavelmente responsáveis pela ligação a um receptor específico da célula ; para vírions envelopados como os baculovírus, as glicoproteínas da superfície da membrana do envelope são responsáveis pelo reconhecimento de um receptor presente na superfície celular, ocorrendo a posterior fixação. Além disso pode ocorrer também a adsorção por endocitose onde ocorre a liberação do DNA viral no núcleo da célula hospedeira pelo desnudamento do nucleocapsídeo.

2. Fase precoce da infecção – de 0 a 6 horas de infecção, inicia-se a utilização de RNA polimerase e DNA polimerase da célula para expressão de genes necessários para ativação da maquinaria celular (genes de reconhecimento de promotor, regulação do ciclo celular, expressão de RNA polimerase viral, etc). Esta é, portanto a fase de expressão de genes iniciais, necessários para a etapa seguinte.

3. Fase tardia – de 6 a 24 horas de infecção, inicia-se a síntese e replicação do DNA viral e o envelopamento deste material para que ocorra a liberação das partículas virais através da membrana celular, os chamados ‘*Budded Virus*’, ou ‘vírus que brotam’. Estas partículas não são ainda envoltas na matriz poliédrica protéica, ou

seja, são partículas infecciosas ativas isoladas, aptas a serem absorvidas e infectarem outras células (denominadas ECV – *extracellular virus*).

4. Fase muito tardia – Após 24 horas. Além de expansiva replicação viral, ocorre nesta fase a expressão da poliedrina (para o caso de vírus selvagem) ou da proteína recombinante sob controle da poliedrina. Quando na presença da poliedrina, é a partir deste momento que as partículas virais (nucleocapsídeos) são envoltas na matriz poliédrica (para o caso do NPV) e os novos baculovírus, completos, são liberados pela lise celular que começa a ocorrer a partir de 96 horas pós-infecção.

B) Alterações observadas nas células como consequência da infecção viral.

1. Até 6 horas pós-infecção (p.i.) são utilizadas RNA polimerase e DNA polimerase da célula;
2. Em 12 horas p.i. observa-se a diminuição da presença de RNA mensageiro da célula;
3. Entre 18 e 24 horas p.i. diminuem muito os níveis de RNA mensageiro, actina e histona da célula e observa-se o declínio na síntese de proteínas celulares;
4. Em 24 horas cessa a síntese protéica da célula;
5. Entre 24 e 36 horas a síntese protéica passa a ser viral – específica.

O ciclo da infecção por baculovírus pode também ser ilustrado nas Figuras 3.1 e 3.2.

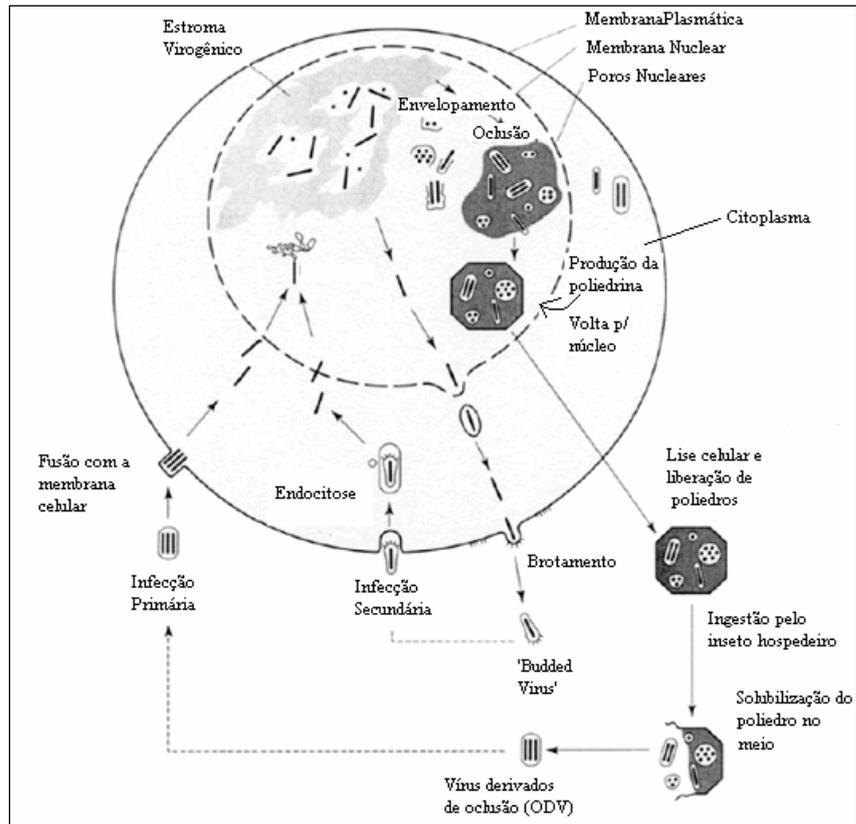


Figura 3.1: Ilustração do ciclo da infecção e produção de proteína para baculovírus do tipo MNPV, expressando poliedrina, no inseto (*In Vivo*).

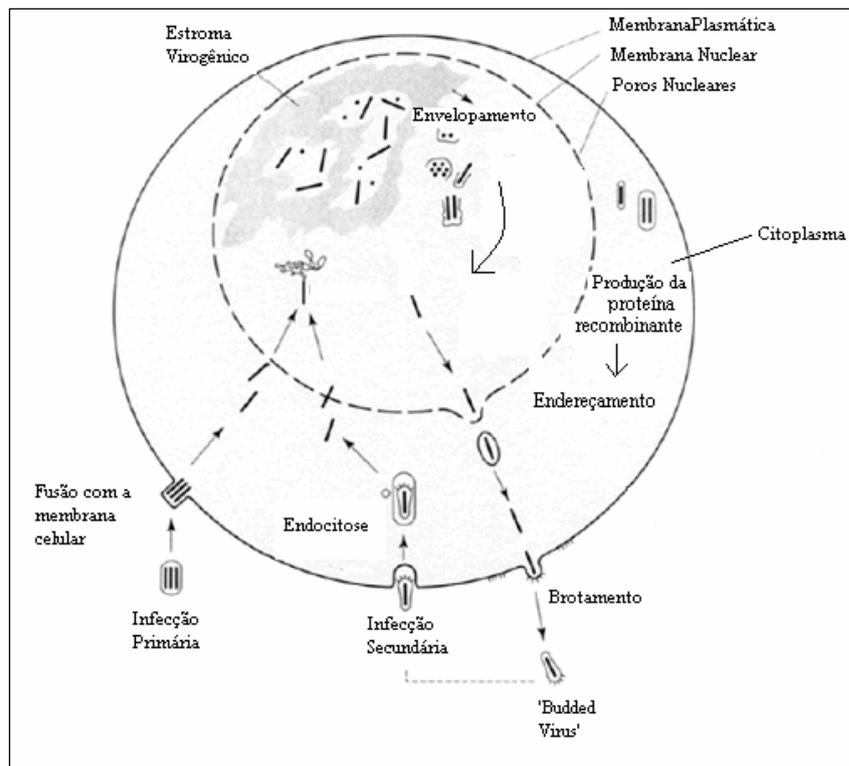


Figura 3.2: Ilustração do ciclo da infecção e produção de proteína para baculovírus do tipo MNPV recombinante, ou seja, que não expressa poliedrina.

Uma diferença importante quando se utiliza baculovírus recombinante, sem o gene para expressão da poliedrina, é que não se formam poliedros já que no lugar do gene da poliedrina, proteína constituinte dos poliedros, é inserido o gene da proteína de interesse. Este fato produz uma alteração significativa quanto à aparência das células infectadas: na presença de poliedros células infectadas são facilmente identificadas após 24 horas de infecção e é possível visualizar os poliedros no núcleo sob aumento de 200 vezes (Figura 3.3). Já para infecção com baculovírus recombinante a alteração morfológica é somente a hipertrofia do núcleo e o aspecto granular, menos perceptível especialmente nas horas iniciais de infecção tornando-se mais evidente no final.

Além da questão dos poliedros, outra alteração diz respeito à localização da proteína. No caso da poliedrina, após a síntese no citoplasma ocorre o redirecionamento para o núcleo onde se formam os poliedros. Para proteínas recombinantes, após a síntese a proteína pode ser normalmente endereçada, de acordo com seu peptídeo sinal.

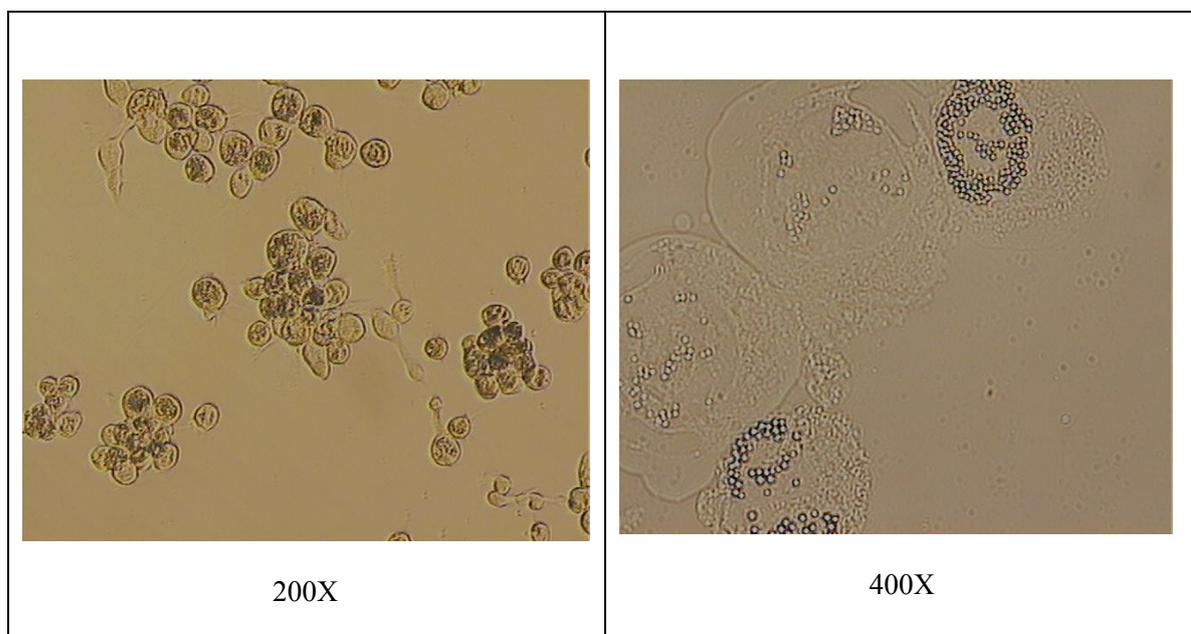


Figura 3.3: Células Sf9 infectadas com *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV). Identificação de poliedros nos núcleos celulares a 96 horas pós-infecção. Fotografias obtidas no Laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares (LATECC) do Departamento de Engenharia Química da UFSCar.

3.9 Cultivo de células de inseto e infecção viral em bioreatores

Células de inseto podem ser cultivadas em bioreatores agitados em diversos modos de operação. Esta capacidade se deve a seu formato esférico, tornando possível crescimento em suspensão, o que torna o bioprocessamento mais apropriado em termos de confiabilidade e possibilidade de aumentos de escala (PFEIFER, 1998).

Para o projeto de aumento de escala de bioreatores um dos principais pontos a ser levado em consideração é a necessidade de satisfazer a demanda por oxigênio sob imposições físico-químicas, mecânicas e geométricas dos equipamentos utilizados para mistura homogênea, ao mesmo tempo evitando que forças hidrodinâmicas afetem a integridade das células devido ao cisalhamento. Para o caso da infecção por baculovírus, onde ocorre lise celular, o bioreator adotado deve considerar também este fator, ou seja, a maior sensibilidade das células após a infecção. Estudos recomendam preferencialmente para este caso bioreatores em batelada ou semibatelada, onde sejam completamente controlados parâmetros como pO_2 , temperatura, pH (AGATHOS, 1996 ; MARANGA *et al.*, 2002). Além disto, no desenvolvimento de um processo com bioreator é imperativo combinar as condições de velocidade de agitação à oxigenação a fim de encontrar as condições hidrodinâmicas críticas (CRUZ *et al.*, 1998).

Variáveis muito importantes também no sistema de expressão célula de inseto/baculovírus são a multiplicidade da infecção, MOI (*multiplicity of infection*), que significa a concentração de partículas virais infecciosas por unidade de célula, além da densidade celular na infecção, CCI (*cell concentration at infection*) que expressa em que tempo do cultivo deve ser realizada a infecção e do momento da separação do produto, TOH (*Time Of Harvest*).

Associadas a estes aspectos do cultivo celular estão as características fisiológicas da célula antes e após a infecção por baculovírus, em termos das necessidades nutricionais para

crescimento e manutenção celular bem como para geração de produtos. Deste modo a análise da composição do meio de cultivo em função do tempo permite prever os nutrientes relacionados a cada comportamento e seus papéis na exaustão ou excesso bem como o papel dos possíveis metabólitos do cultivo, tanto para o cultivo não infectado como após a infecção.

Deste modo, o estudo em escala de laboratório como o uso de frascos *Schott* agitados em mesa incubadora rotativa ou então o uso de biorreatores de pequena escala podem oferecer uma caracterização prévia da influência destes procedimentos sobre o crescimento celular e geração de produto, de modo a direcionar os procedimentos de escolha de um biorreator. Contudo, quando se trata do desenvolvimento de um processo a diferentes escalas busca-se idealmente que a cinética do crescimento e da infecção sejam reprodutíveis entre as diferentes escalas e os parâmetros citados anteriormente exercem papel essencial neste objetivo.

De acordo com Maranga *et al.* (2002), a infecção à baixa concentração de partículas infecciosas (baixo MOI) e a determinação da taxa específica de consumo de oxigênio oferecem maior garantia de reprodutibilidade. Num estudo posterior (2004) o mesmo autor em trabalho de aumento de escala para infecção de células Sf21 analisou os seguintes parâmetros, para bioreatores de 2 e 25 litros e resultados mais satisfatórios:

- Volume total da dorna(L);
- Volume de líquido(L);
- Altura total da dorna (cm);
- Altura do líquido (cm);
- Diâmetro interno (cm);
- Diâmetro (cm) e número de impelidores;
- Pressão parcial de oxigênio (%);
- Velocidade de agitação (rpm);
- Fluxo de ar (vvm);

- Número de Reynolds;
- CCI (cel/mL);
- MOI (pfu/cel);
- Tensão de cisalhamento (N/m^2).

Basicamente, todos estes fatores acima apontados estão envolvidos e inter-relacionados no estudo da oxigenação do cultivo e na caracterização fisiológica das células não infectadas e após a infecção por baculovírus, mas para o caso de cultivos em frascos *Schott* agitados em mesa incubadora rotativa devem ser considerados os mais convenientes.

3.10 Caracterização fisiológica das células Sf9

Dentre as linhagens de células de inseto existentes há características metabólicas particulares de cada linhagem ou pelo menos de grupos de linhagens. O delineamento destas características é uma tarefa complicada devido à complexidade das reações metabólicas, mas especulações podem ser feitas a partir das observações experimentais. Nesta revisão bibliográfica são abordadas as características metabólicas com relação a carboidratos e aminoácidos.

A caracterização dos substratos necessários ao crescimento celular, suas concentrações mínimas no meio de cultura, seus efeitos quando na ausência ou excesso entre outros fatores podem levar à definição de um meio de cultura mais adequado para crescimento celular otimizado e possibilitar a manipulação de diferentes meios de cultura neste sentido.

Contudo, a fisiologia de uma dada linhagem celular é própria e as diferentes composições de cada meio de cultura fazem com que as estratégias definidas para um determinado meio não sejam totalmente aplicáveis a um outro. Por exemplo, a necessidade de suplementação com um determinado aminoácido num certo momento do cultivo pode variar

de uma composição para outra. Assim, as observações preliminares quanto às características da célula podem e devem ser utilizadas atentando-se contudo às condições de cultivo.

3.10.1 Metabolismo de carboidratos

Estudos para o sistema de expressão células Sf9/baculovírus utilizando meio de cultura TNM-FH têm procurado delinear demandas nutricionais e produção de metabólitos antes e após a infecção viral. Mendonça, Palomares e Ramirez (1999), realizaram a manipulação seletiva de nutrientes para células Sf9 em meio TNM-FH observando que glicose é o carboidrato consumido preferencialmente como fonte de carbono e que na sua exaustão inicia-se o consumo de fontes secundárias como frutose; já a sacarose não foi consumida em nenhum momento. Em termos de metabólitos observou-se a produção de lactato enquanto glicose e frutose estavam disponíveis, mas este metabólito passou a ser consumido a baixas concentrações dos carboidratos; também a produção de amônia e dos aminoácidos alanina e glutamina foi observada.

Após a infecção, observações quanto a consumo de oxigênio (SCOTT, BLANCHARD e FERGUSON, 1992) e manipulação do meio de cultura (WANG, SIMON e BENTLEY, 1993) mostraram que a produção de proteína recombinante pôde ser maior elevando-se os níveis de oxigênio dissolvido e que a suplementação do meio com glicose e glutamina no momento da infecção levou ao mesmo efeito.

Contudo, estas conclusões são dependentes das concentrações destes e de outros nutrientes em cada meio de cultura de modo que esta investigação deve ser conduzida para o meio adotado nos experimentos de cultivo. Estudos realizados em meio de cultura SF900 II, rico em glicose (~10 g/L), mostraram que este carboidrato é pouco utilizado por células de inseto S2 (ARANTES, 2004). Do mesmo modo, para cultivo de células Sf9 neste meio de cultura, Radford, Greenfield e Reid (1997) observaram a baixa utilização de glicose, que no

final da fase exponencial de crescimento ainda estava presente em alta concentração: 30-50 % da concentração inicial. Além disso observou-se que sacarose não foi utilizada.

Este comportamento com relação à glicose também foi notado por Ikonomou, Bastin e Schneider (2001), em cultivos de células Sf9 em meio similar ao SF900 II, YPR, que contém também cerca de 10 g/L de glicose. Nestes cultivos verificou-se que quando as células saem da fase exponencial de crescimento ainda há cerca de 40% da concentração inicial de glicose.

Pouco se encontra na literatura específica a respeito de outros carboidratos utilizados e até mesmo possíveis limitantes do crescimento celular. Neste sentido o trabalho de Radford, Greenfield e Reid (1997) apresenta o diferencial de analisar o papel da maltose no crescimento celular, onde notou-se que este carboidrato é uma fonte alternativa de glicose e é consumido rapidamente a densidades superiores a 1×10^6 cel/mL. É relatado que no final da fase exponencial de crescimento maltose estava a níveis muito baixos e foi exaurida durante a fase estacionária. Outra observação importante foi que poucas modificações ocorreram em termos de consumo ou exaustão de carboidratos após a infecção, já que em geral se faz a ressuspensão das células em meio fresco, justamente para se prevenir a insuficiência de substratos na infecção e produção de proteína.

3.10.2 Metabolismo de aminoácidos

Dentre os aminoácidos mais utilizados para células de inseto, encontra-se na literatura maior enfoque para a glutamina. Benslimane *et al.*, (2005), realizaram estudos através da marcação radioativa de carbono e aponta a utilização da glutamina como fonte de carbono para o ciclo do ácido tricarboxílico.

Algumas previsões sugerem que culturas de células de inseto em excesso de glicose e glutamina produzem alanina como subproduto metabólico, mas variações são decorrentes de

cada tipo de célula. Por exemplo, para células *T.ni* ocorre acúmulo de lactato, alanina e íons amônio em excesso de glicose e glutamina, mas células Sf9 se diferenciam neste sentido pois mesmo em excesso destes substratos não apresentam acúmulo de lactato e amônio. Entretanto íons amônio podem se acumular em meio com baixa concentração de glicose. Já a alanina é um metabólito comum em presença ou escassez de glicose (RHIEL, MITCHELL-LOEGEAN e MURHAMMER, 1997).

Com bastante especificidade, Drews, Paalme e Vilu, (2000), propuseram uma rota metabólica para glutamina e glicose através de marcação de carbono e nitrogênio. Esta proposta é resumida na Figura 3.4.

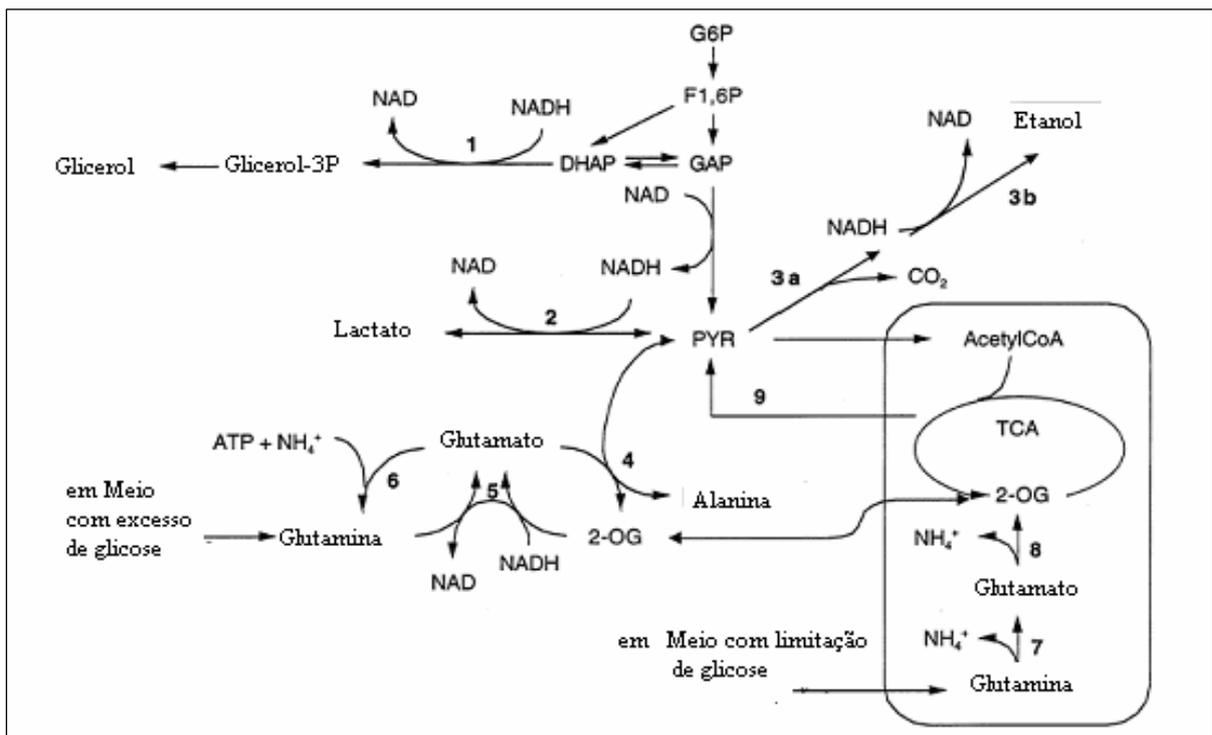


Figura 3.4: Metabolismo de aminoácidos proposto para células Sf9 (Drews *et al.*,2000). Abreviações : GP6-glicose-6-fosfato ; F1,6P-frutose-bifosfato ; GAP- gliceraldeido fosfato ; HAP –dihidroxicetona fosfato ; PYR- piruvato ; 2-OG-2-oxigluarato ; Enzimas : 1-DHAP desidrogenase ; 2-lactato desidrogenase ; 3.a-piruvato decarboxilase ; 3.b-etanol desidrogenase ; 4-glutamato-piruvato transaminase ; 5-glutamato sintaze ; 6-glutamina sintetaze ; 7-glutaminase ; 8-glutamina desidrogenase ; 9- fluxo do TCA de volta pra glicólise.

Pela rota metabólica proposta através da marcação de nitrogênio, os pesquisadores identificaram que o doador de nitrogênio para a formação de alanina é o grupo amina da glutamina e o grupo amida do glutamato também cumpre este papel. As investigações apontaram também para a ação de amidotransferases das células Sf9 e não das vias de glutaminase e glutamato desidrogenase, além da observação de o metabolismo de glutamina não ser sensível à concentração de glutamato extracelular. Por outro lado, para a formação de íons amônio estariam envolvidas glutaminase e glutamato desidrogenase.

Com relação ao metabolismo de glicose observou-se que este composto ao entrar no TCA (ciclo do ácido tricarboxílico) é convertido em moléculas de 3 carbonos, lactato e alanina. Além disso, mesmo em meio que possui glutamina este aminoácido é sintetizado a partir de glicose.

Podem ser encontrados outros trabalhos na literatura que fazem a análise quantitativa da glutamina no sentido de identificar a concentração mínima necessária nas formulações de meio de cultura. Ikonomou, Bastin e Schneider (2001), citam a exaustão de glutamina em cultivo em bioreator, em meio YPR, partindo de uma concentração inicial de 2,0 g/L, mas não consideram este substrato limitante, nestas concentrações.

Além da glutamina, trabalhos apontam para a utilização essencial de cisteína por células Sf9. Radford, Greenfield e Riel (1997), realizaram cultivos de células Sf9 em meio SF900 II, em bioreator e obtiveram que o único aminoácido completamente consumido foi a cisteína, podendo-se atribuir a isto o fim do crescimento exponencial. Coincidente à sua exaustão foi observado o fim do consumo de outros aminoácidos, ou seja, tudo indica que a exaustão de cisteína compromete o metabolismo celular. Além disso, observou-se o comportamento deste aminoácido como limitante na produção de proteína recombinante uma vez que sua exaustão aconteceu 60 horas pós-infecção e foi relacionado à diminuição do rendimento de proteína recombinante.

3.11 Escolha do meio de cultura mais adequado

Uma das dificuldades encontradas no cultivo de células de inseto refere-se à complexidade do meio de cultura utilizado para crescimento celular e geração de produtos; muito tem sido realizado para a otimização dos componentes visando-se baixo custo e alta produtividade. Esta complexidade é justificada pelo fato de que células de inseto requerem mais que simples nutrientes para crescimento e proliferação, seja para manutenção de um fenótipo produtivo seja para geração de produtos.

Com base na suplementação do meio de cultura com SFB (soro fetal bovino) para o cultivo de células de mamíferos, encontram-se pesquisas com células Sf9 utilizando-se meios de cultura com tal suplemento (MENESES-COSTA *et al.*, 2001; PALOMARES, PEDROZA e RAMIREZ, 2001). Entretanto, este uso apresenta problemas como a variabilidade própria de cada lote de produção de soro (devido, por exemplo, a diferenças entre os animais e fatores do ambiente), possibilidade de contaminação (vírus, bactéria, micoplasma, fungo, endotoxina) e dificuldade na separação dos produtos devido à composição indefinida do SFB. A minimização destes efeitos implica em alto custo permanecendo o fator variabilidade, onde diferentes lotes de soro podem exercer diferentes estímulos ao crescimento celular.

Para células de inseto em geral observa-se boa adaptação e alto crescimento em meios livres de soro, tanto para cultivo em monocamada como em suspensão. Especificamente para células Sf9 desenvolveram-se meios livres de soro como SF900 SFM, SF900-II SFM e ExCELL 400. Entretanto, os trabalhos de cultivo de células Sf9 encontrados na literatura especializada, nos anos recentes, indicam principalmente o uso dos meios TNM-FH e SF900 II, a saber:

- TNM-FH – meio elaborado a partir de meio Grace (Life Technologies) suplementado com 3,33 g/L de lactoalbumina e 3,33 g/L de extrato de levedura. É geralmente suplementado também com 10% (v/v) de SFB. Trata-se de um meio economicamente viável

devido ao seu baixo custo; entretanto, o uso de SFB apresenta as desvantagens já tratadas anteriormente.

- Meio SF900 II (Gibco, Life Technologies) – utilizado sem a necessidade de suplementação com SFB, fator favorável pelos motivos já apresentados. Embora consideravelmente mais caro que outros meios, como o TNM-FH, é vantajoso devido à ausência de SFB e à maior concentração de nutrientes chaves para o metabolismo celular.

Embora se encontre na literatura específica trabalhos utilizando meio de cultura TNM-FH para o cultivo de células de inseto, inclusive para células Sf9, o fato da adaptação das células Sf9 a meios sem soro e os problemas inerentes a tal utilização têm estimulado o desenvolvimento e utilização de meios SFM (*Sorum Free Medium*). Assim, Barnett B.B, 1998, compara a utilização de TNM-FH suplementado com SFB com meios livres de soro em termos de densidade celular e expressão de proteína recombinante para um sistema de expressão Sf9/baculovírus, conforme a Tabela 3.2.

Tabela 3.2:. Crescimento celular e produção de proteína para duas linhagens de células de inseto lepdópteros, em diferentes meios de cultura.

Meio	TNM-FH + 10% SFB	HYQ-SFX Insect	SF900-II	Express Five	Ex-Cell 405
Célula					
Sf-9	4,5 x10⁶ cel/mL	1,1 x10⁷ cel/mL	7,5x10⁶ cel/mL	6,0 x10⁶ cel/mL	5,3 x10⁶ cel/mL
High-Five	6,1 x10⁶ cel/mL	1,2 x10⁷ cel/mL	5,7x10⁶ cel/mL	1,2 x10⁷ cel/mL	1,3 x10⁷ cel/mL
β-galatosidase em Sf-9	230,000 un/mL	1900,00 un/mL	*	*	*
β-galatosidase em High Five	202,500 un/mL	598,000 un/mL	*	230,000 un/mL	388,000 un/mL

(*): não utilizado para sistema célula de inseto /baculovírus

Observa-se que os menores valores tanto de proteína recombinante produzida como de densidade celular máxima dizem respeito ao uso do meio TNM-FH. A mesma desvantagem foi observada em relação à concentração de partículas virais geradas após a infecção pelo ciclo viral.

3.12 Estratégias de infecção : multiplicidade da infecção (MOI - *Multiplicity of Infection*) e densidade celular na infecção (CCI-*Cell Concentration at the Infection*)

O título de um estoque de vírus é a concentração de partículas virais infecciosas, o que não é equivalente à concentração total do vírus na solução estoque pois nem todas as partículas virais são infecciosas. Estas partículas não infecciosas podem ter seu fracasso atribuído a ligações defeituosas na proteína viral, dificuldade de adesão à membrana plasmática ou endossomos ou ainda pela presença de genomas defeituosos. O título de uma solução estoque de vírus pode ser determinado por ensaio de plaqueamento ou pelo método da diluição final (Invitrogen, catálogo 10359):

A) Plaqueamento: um cultivo celular em monocamada confluyente é infectado com solução estoque viral. Após período de adsorção de 1 hora o inóculo infectado é plaqueado sobre uma camada de metil celulose ou agarose e considera-se cada placa derivada de uma única partícula infecciosa; isto é repetido para diferentes diluições. Faz-se então a contagem das placas para cada diluição adotada e determinam-se quantas unidades formadoras de placa ou PFU (*plaques forming unit*) estão presentes em cada mL de solução estoque.

B) Método da diluição final: infectam-se múltiplos cultivos de células em monocamada confluentes com soluções estoque de vírus a diferentes diluições e estima-se a diluição necessária para infectar metade da cultura. A concentração obtida da análise da

diluição final é conhecida como dose infecciosa necessária para 50 % de cultura de tecido (TICD₅₀) e pode ser convertido a PFU pela relação estatística (Eq. 3.1):

$$PFU = 0,69 \times TICD_{50} \quad (\text{Eq. 3.1})$$

A partir destes dados tem-se a multiplicidade da infecção, MOI, que corresponde à concentração de partículas virais infecciosas (PFU - unidades formadoras de placas) por célula no momento da infecção, ou seja, PFU/cel.

Uma preocupação ao se tratar da concentração viral é a realização de uma infecção sincrônica, ou seja, um crescimento celular de 5 % ou menos nas 06 horas seguintes à infecção, previamente à síntese dos genes virais. Isto é possibilitado pelo uso de valores razoáveis de MOI que previnam o crescimento celular excessivo de células não infectadas que competiriam por substratos essenciais à produção do gene viral e da proteína recombinante. Em outras palavras, não é interessante após a infecção a multiplicação de células não infectadas e a multiplicidade de infecção utilizada deve permitir esta condição. Por outro lado, antes da lise e morte celular todas as fontes de nutrientes devem estar consumidas, ou seja, deve-se também encontrar o momento ideal para a infecção.

Em geral, infecção com alto MOI é uma estratégia para infecção sincrônica, de modo a garantir que para cada célula haja pelo menos uma partícula viral infecciosa; a probabilidade deste modelo é descrita pelo modelo Poisson. Já a utilização de baixo MOI, que não é uma boa estratégia para a produção de proteína em termos de rendimento, é conveniente para a expansão e amplificação de culturas estoque preservando a integridade genética.

O processo de infecção tem início no contato direto células-baculovírus o que é consequência das colisões entre eles. Os vírus então se ligam à superfície celular através dos receptores de endocitose e são transportados ao núcleo. A maximização da primeira etapa da infecção pode ser feita utilizando-se altos valores de MOI o que acarreta a maior probabilidade de colisões, mas levando-se em conta que a infecção com produção muito

rápida de proteína pode alterar a integridade do vírus recombinante e conseqüentemente produzir partículas virais e proteínas com modificações em relação à origem (O'REILLY, MILLER e LUCKOW, 1994).

Além do valor de MOI utilizado, toda compreensão dos fatores que influenciam a interação célula-vírus pode ser muito útil no desenvolvimento de um procedimento otimizado de infecção. Assim, Petricevich *et al.*, 2001, trabalhando com a proteína VP4 do rotavírus SA11, realizou a infecção sob MOI de 5,0 PFU/célula analisando também outros fatores como a utilização de um tempo de adsorção antes da inoculação em bioreator e a influência de soro fetal bovino na adsorção. Neste caso observou-se que a introdução de um período para a adsorção do vírus antes da incubação teve efeito positivo na viabilidade celular após infecção e na quantidade de proteína produzida.

Outro importante fator de influência na infecção celular foi o uso de soro fetal bovino, presente no meio de cultura adotado (TNM-FH) e adicionado a diferentes concentrações no momento da infecção. O SFB é reconhecido como importante aditivo devido aos hormônios necessários à manutenção, proliferação e diferenciação celular e à proteção celular devido à presença de enzimas, inibidores enzimáticos e outras moléculas com capacidade tamponante. Entretanto, neste estudo, sua presença no momento da infecção resultou em efeito negativo para a cinética de adesão do vírus à superfície celular; este resultado é um bom argumento em meio à discussão sobre utilização de meios livres de soro e confirma esta necessidade.

O controle sobre a sincronicidade da infecção pode direcionar outras estratégias de cultivo. Zeiser *et al.* (2000), testando infecções a MOI de 0,001, 10 e 1000 e analisando a realização ou não de uma infecção sincrônica, relata a possibilidade de suplemento de nutrientes no caso de infecção não sincrônica a fim de prevenir a exaustão dos mesmos pelo consumo de células não infectadas, em crescimento.

Igualmente importante é a variável densidade celular no momento da infecção, CCI, associado ao estágio em que se encontra o cultivo: início, meio ou fim da fase exponencial de crescimento. Quanto maior valor da CCI maior deverá ser a concentração da solução estoque viral (PFU/mL) ou o volume a ser utilizado no procedimento de infecção. O rendimento do produto está associado ao número de células infectadas com o baculovírus recombinante e, portanto é conveniente a maior densidade de células viáveis possível. Contudo, deve ser considerado que após a infecção deve haver ainda suficiente concentração de substratos essenciais à atividade metabólica e de síntese das partículas virais e da(s) proteína(s) de interesse. Uma possibilidade de solução com respeito aos nutrientes é a suplementação com meio de cultura no momento da infecção ou através de batelada alimentada (CHAN *et al.*, 2002).

A utilização de concentrações celulares muito altas pode ser prejudicial por outros fatores, dentre eles o acúmulo de metabólitos que exerçam caráter tóxico ou a dificuldade de oxigenação de todas as células devido à formação de aglomerados celulares. Deste modo os experimentos de cultivo devem ser acompanhados da análise dos nutrientes e metabólitos em cada momento e da eficiência da respiração celular nestas condições a fim de se definir a adequada densidade celular na infecção, CCI, também denominado momento da infecção.

3.13 Comentários gerais sobre a Revisão Bibliográfica.

A partir dos dados coletados na literatura específica sobre cultivos de células de inseto e utilização de baculovírus para produção de proteínas recombinantes, pode-se notar que por um lado os esforços convergem para a otimização deste bioprocessamento em termos de custo de produtividade, de modo que o desenvolvimento dos objetivos do presente trabalho pode ser uma importante contribuição. Por outro lado, é válida a expressão de Canacostatina, uma

proteína de planta, pelo sistema célula de inseto/baculovírus uma vez que se encontra na literatura proteínas de planta e outras que tiveram sua atividade/funcionalidade melhorada pela expressão neste sistema eucariótico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Linhagem celular: preservação e ativação

As células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) foram cedidas pelo Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça, do Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantã.

Para a criação do banco de células realizou-se a amplificação do cultivo nº1 (em garrafa de 25 cm²) em frascos *Schott*, meio SF900 II, agitados a 100 rpm. As células foram preservadas por congelamento em meio SF900 II com 7,5% de DMSO (dimetilsulfóxido) e 50% de SFB, quando o cultivo atingiu a metade da fase exponencial de crescimento. O procedimento de congelamento inclui a preservação por 1 hora a -20°C, por 24 horas a -80°C e a seguir a estocagem em nitrogênio líquido, a -270°C. A partir do primeiro estoque criopreservado foram gerados outros pela ativação das células e repetição deste procedimento de congelamento.

As células foram congeladas na densidade de 1×10^7 células/mL. A ativação em *Schott* com 12 mL de SF900II ($C_{\text{cel}} = 8 \times 10^5$ cel/mL) envolveu descongelamento rápido e centrifugação a 800 rpm por três minutos, para remoção do DMSO e do SFB. Quando necessário, realizou-se a centrifugação entre 24 e 48 horas de cultivo para remoção de *debris* de células mortas, provenientes do *stress* do descongelamento. Entretanto, na grande maioria das vezes as células apresentavam crescimento normal entre 48 e 72 horas de cultivo.

4.1.2 Meios de cultura

Os procedimentos de congelamento e descongelamento foram sempre realizados em meio SF900 II (Gibco, EUA). Este meio também foi utilizado em diversos experimentos de cultivo.

Para os experimentos de otimização de meios de cultura foi preparado meio TNM-FH a partir do meio de Grace (Life Technologies Inc.) suplementado com 3,33 g/L de hidrolisado de lactoalbumina (Life Technologies Inc.) e 3,33 g/L de extrato de levedura (Life Technologies Inc.). A partir deste meio de cultura realizaram-se diluições do meio SF900 II nas proporções 1:1, resultando no meio aqui denominado Meio 50%, com e sem adição de 5% de Soro Fetal bovino (Cultilab), de acordo com os experimentos planejados.

4.1.3 Baculovírus recombinante

Para os experimentos de infecção foi utilizado o baculovírus recombinante vAcCANA, construído em trabalho conjunto com Mylene Melo, do Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Genética e Evolução da UFSCar. As etapas da construção são mostradas a seguir e podem também ser encontradas com detalhes no seu trabalho (MELO, 2007).

4.2 Metodologia de construção do baculovírus recombinante

O baculovírus para expressão de Canacistatina, vAcCANA, foi gerado pela técnica de transposição sítio-específico, de acordo com o manual “Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expression System”, Invitrogen. A seqüência de construção é esquematizada na Figura 4.1.

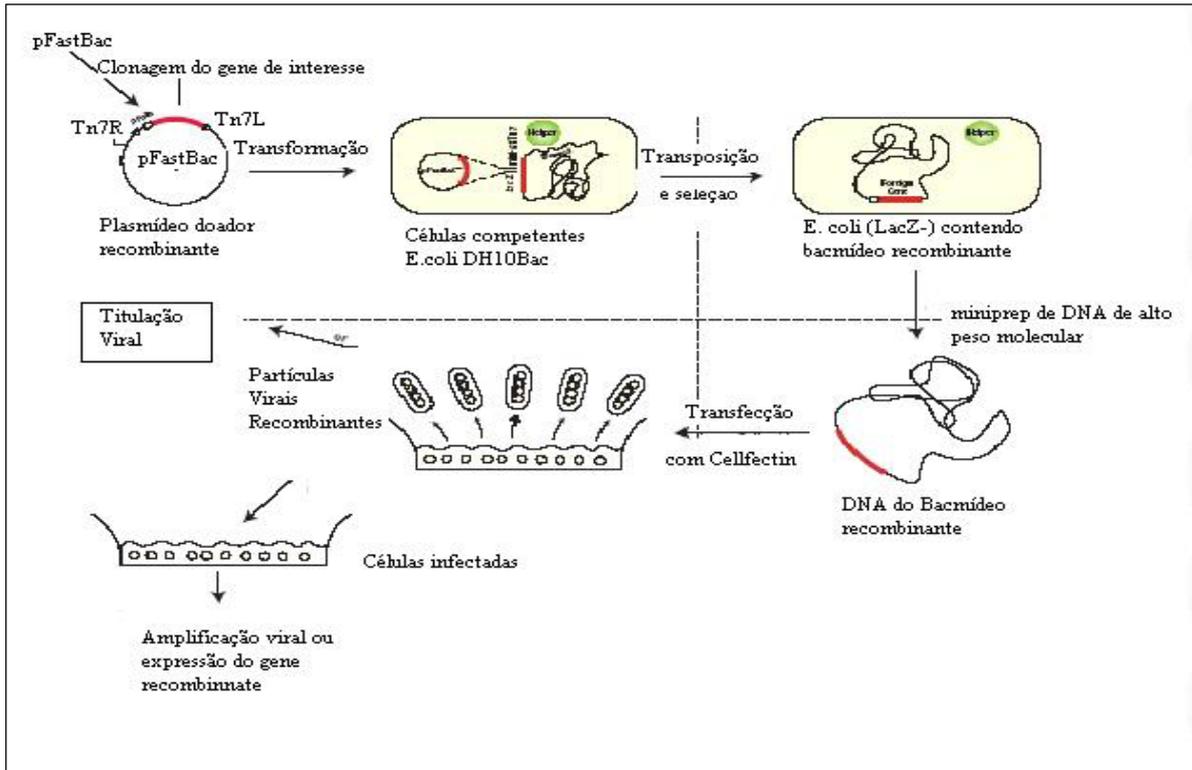


Figura 4.1: Representação esquemática da construção do baculovírus recombinante proposta pelo Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Invitrogen).

Esta seqüência de construção pode ser detalhada separadamente da seguinte forma:

-cDNA e *primers*: O cDNA que codifica a Canacistatina (GenBank N° AY119689) (Figura 4.2), contido no clone pET28acanecys (SOARES-COSTA *et al.*, 2002) foi amplificado por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a partir do plasmídeo pET28a. Foram desenhadas as seguintes seqüências de oligonucleotídeos (*primers*): Forward 5' CCATG GCC GAG GCA CAC AAC GGG 3' e Reverse 5' AAG CTT GGC GTC CCC GAC CGG CT 3' , nas quais estão inseridos sítios de clivagem para NcoI e Hind III, que estão presentes no vetor de expressão. As regiões de hibridização dos *primers* ao cDNA e os sítios de clivagem podem ser observados na Figura 4.2.

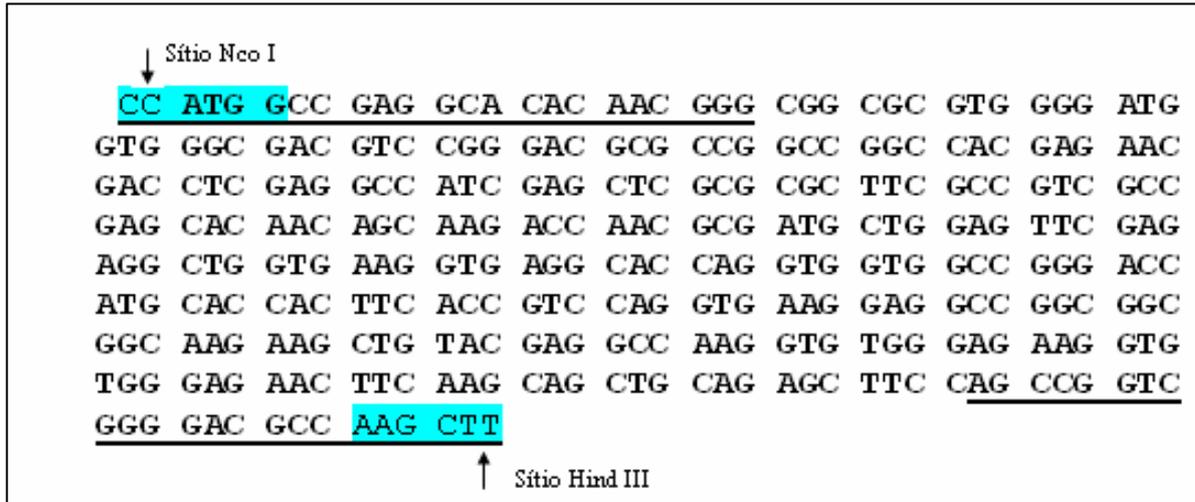


Figura 4.2: Seqüência da fase aberta de leitura da Canacistatina, com regiões de hibridização dos *primers* e sítios de restrição das enzimas Nco I e Hind III. Negrito: fase aberta de leitura; Sublinhado: regiões de hibridização dos primers; Box colorido: sítios de restrição.

- Clonagem no vetor de expressão: O cDNA amplificado nestas condições foi subclonado no vetor de expressão, pFastBac HTB, doador de sítios de transposição, e selecionado pela resistência a ampicilina. Para amplificação do vetor foram transformadas células competentes *E. coli* DH5 α , com seleção de transformadas por resistência a ampicilina. Realizou-se então PCR de colônia e análise de restrição para confirmar a presença e orientação do inserto, além do seqüenciamento do vetor recombinante em seqüenciador 377 *DNA Sequencer*, ABI Prism. A Figura 4.3 refere-se ao mapa do pFastBac HT A, sendo que a diferença entre A e B é o número de pares de bases (HTB: 4857 pb).

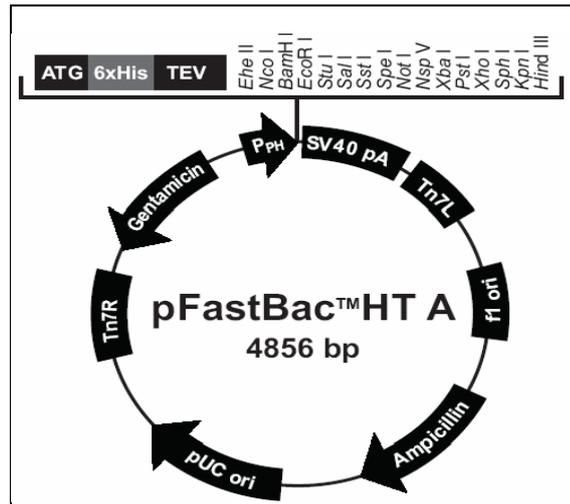


Figura 4.3: Mapa do vetor de expressão, pFastBac HT A, praticamente idêntico ao pFastBac HTB.

- Transformação de células DH10Bac: Com o plasmídeo recombinante isolado por Mini-prep (Sambrook and Russell, 2001) transformou-se por choque térmico células competentes DH10-Bac. Estas células contêm além do seu próprio genoma o bacmídeo, genoma modificado do baculovírus AcMNPV (*Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis vírus) e um plasmídeo *helper* que codifica para a enzima transposase. Foi realizada seleção pela coloração com substrato *Bluo-gal*, pois o bacmídeo contém o gene do peptídeo LacZ α , cuja expressão é impedida quando ocorre a transposição, ou seja, para bacmídeos recombinantes as colônias são brancas. Além disso, utilizou-se a combinação de antibióticos kanamicina, tetraciclina e gentamicina, de acordo com os marcadores presentes (Figura 4.4). A análise de bacmídeo recombinante positivo foi feita por PCR, com *primers* M13.

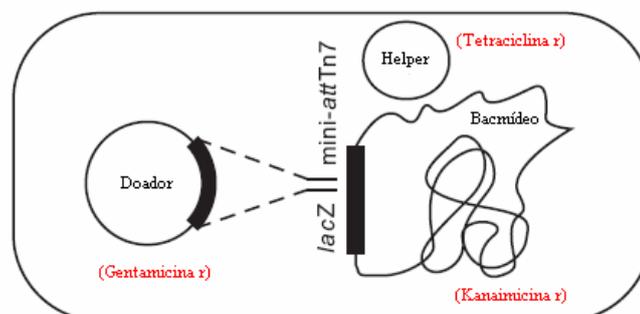


Figura 4.4: Elementos envolvidos na transposição, em células competentes DH10Bac. A região de transposição pode ser visualizada nos apêndices A e B.

- Transfecção de células Sf9: Isolou-se o bacmídeo recombinante positivo por Mid-prep (Kit Qiagen) e procedeu-se a transfecção das células utilizando o reagente Cellfectin[®] (Invitrogen). Este reagente é uma formulação de lipídeos catiónicos que formam lipossomas com o DNA tornando possível a permeabilidade através da membrana plasmática da célula, também de carácter lipídico.

- Isolamento do primeiro estoque viral, P1: Após 7 dias de incubação coletou-se o sobrenadante de cada placa, consistindo em meio de cultura e partículas virais recombinantes, ou seja, o baculovírus vAcCANA propriamente dito.

- Amplificação do estoque viral P1: Com algumas alterações em relação ao que indica o protocolo utilizado até aqui (Invitrogen), realizou-se a amplificação do estoque P1 infectando 10^6 células em 4 mL de meio SF900 II, com 1 mL de estoque P1. Com este volume, considerando-se que P1 tem cerca de 10^7 pfu/mL assegura-se que é possível infectar cada célula com pelo menos uma partícula viral. Esta infecção foi mantida por sete dias de incubação a 27°C e a seguir isolada por centrifugação, consistindo em estoque viral P2, de alto título viral.

- Extração de RNA total de células infectadas com estoque viral P2 e síntese de cDNA por RT-PCR (reação com transcriptase reversa e PCR com *primers* da Canacistatina a partir do cDNA produzido). A extração foi realizada com *Trizol Reagent* (Invitrogen).

- Extração de DNA de '*Budded Virus*' e PCR utilizando *primers* da Canacistatina: utilizou-se a metodologia aplicada a baculovírus não recombinante (O'REILLY, MILLER e LUCKOW, 1994).

- Determinação da concentração viral: determinou-se o título viral do estoque P2 pelo ensaio de diluição final, *End-Point Dilution* (O'REILLY, MILLER e LUCKOW, 1994).

4.3 Experimentos de cultivo em frascos Schott

Com base nos efeitos favoráveis pré-definidos na literatura específica a respeito da utilização de meio condicionado no inóculo, foi adotado no presente trabalho a utilização de, em média, 20% de meio condicionado como estratégia de otimização dos cultivos. Com isto, não foi empregada a centrifugação das células do pré-inóculo pois foi realizada a diluição direta em cerca de 80% de meio fresco.

No que diz respeito ao modo de preparação do inóculo, adotou-se as condições de densidade celular em torno 4×10^6 cel/mL, o que significa a metade da fase exponencial de crescimento, aproximadamente, e viabilidade acima de 97%. Quando se prepara um pré-inóculo com densidade inicial de 10^6 cel/mL, a metade da fase exponencial se dá em torno de 48 horas.

Na Figura 4.5 pode-se acompanhar o procedimento típico seguido num experimento de cultivo de células Sf9.

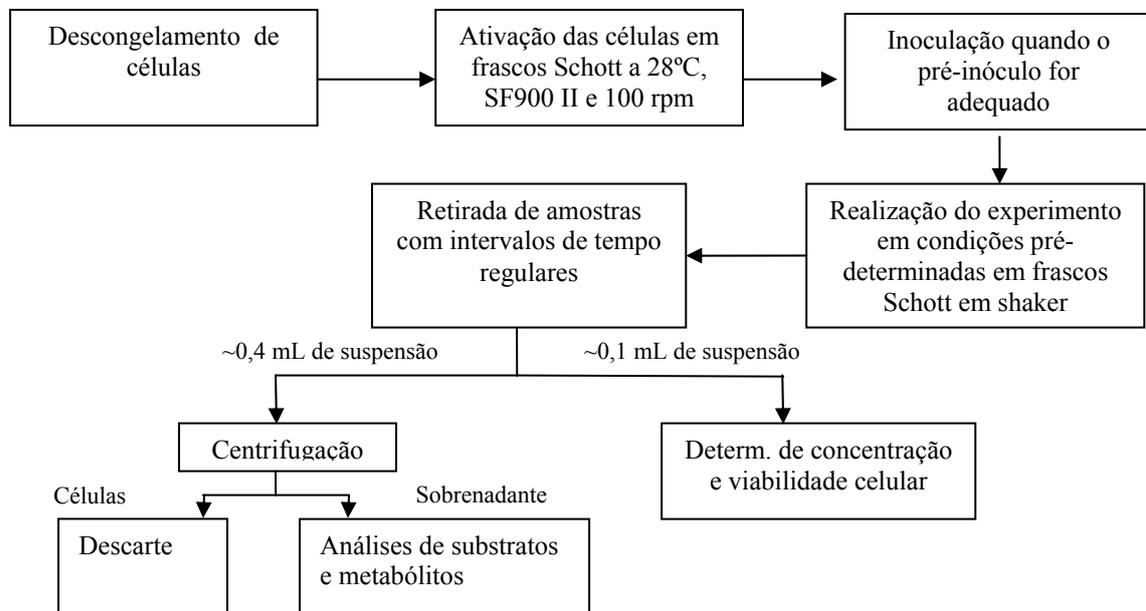


Figura 4.5: Fluxograma de um experimento de cultivo de células Sf9 típico, em frasco Schott agitado, para levantamento de dados cinéticos.

(*) o pré-inóculo é considerado adequado quando as células se encontram na metade da fase exponencial de crescimento e com viabilidade acima de 97%.

4.4 Experimentos de infecção viral em frascos *Schott*

Para os experimentos de infecção viral das células Sf9 foram observadas as condições indicadas no protocolo (Invitrogen) e Manual (O'Reilly) de expressão de proteínas por SVEB: infectar células que estejam na fase exponencial de crescimento; infectar uma densidade celular específica e coletar no momento pré-determinado de maior rendimento sem interferência de proteases. Assim, uma vez conhecidas as características de crescimento das células antes da infecção e também o tempo de coleta da proteína (através de ensaio de expressão), foram adotadas as condições:

- Preparação de inoculo a 1×10^6 cel/mL para utilização das células na metade da fase exponencial, quando a densidade celular seja no máximo 4×10^6 cel/mL, cerca de 48 horas de cultivo (frasco *Schott* de 125 mL com volume de trabalho de 20 mL).

- Infecção de células na densidade de $1,5 - 3,0 \times 10^6$ cel/mL, ressuspensão em 20 mL de meio novo em frascos *Schott* de 125 mL ou então, 30 mL de meio em frascos *Schott* de 250 mL.

- Coleta do *pellet* de células 96 horas p.i.: A proteína Canacostatina é intracelular e citoplasmática e portanto foi recuperada do *pellet* de células vivas e mortas para posterior purificação e quantificação da proteína.

- Purificação da proteína: Foi utilizado o protocolo de purificação *QIAExpressionist*, *QIAGEN*, que consiste da lise das células seguida da eluição do sobrenadante em coluna de níquel. A cauda de histidina da proteína possui afinidade pelo níquel, ficando retida. Em seguida faz-se 5 eluições de gradientes de imidazol: 2x tampão 20 mM de imidazol para retirar contaminantes e 3x tampão 250 mM de imidazol para liberação da proteína por competição com a histidina em afinidade pelo níquel.

- Identificação da proteína por SDS-PAGE 15% e por *Western Blotting*, utilizando anticorpo policlonal anti-Canacistatina (SOARES-COSTA, 2002).

Esta metodologia pode ser esquematizada conforme a Figura 4.6.

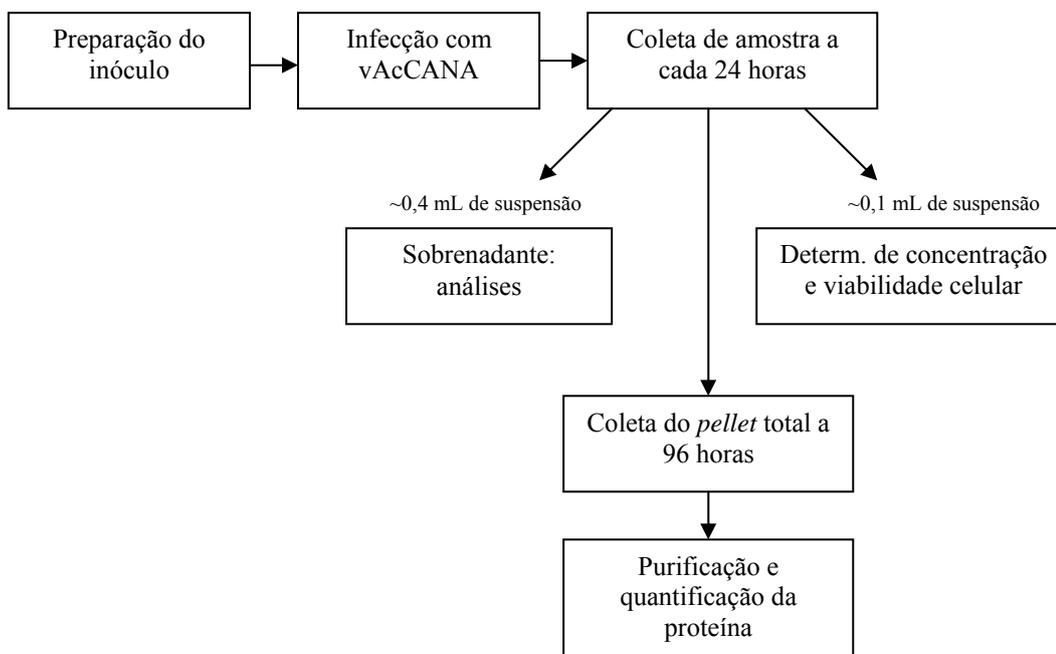


Figura 4.6: Fluxograma de um experimento de infecção de células Sf9 com Baculovírus recombinante vAcCANA, em frasco *Schott* e mesa incubadora rotativa, para levantamento da cinética de infecção e para obtenção da Canacistatina.

4.5 Métodos Analíticos

Para os experimentos de cultivo de células Sf9 foram utilizados, principalmente, os seguintes métodos analíticos:

- Análise de densidade celular e viabilidade: Foi utilizado o método de exclusão do corante azul de tripan com hemacitômetro (Doyle & Griffiths, 1998).

- Diâmetro celular de células infectadas e não infectadas: O diâmetro celular médio foi determinado pela análise de pelo menos 400 células, com o software Image Pro Plus 3.0.

- Sensibilidade à tensão de cisalhamento: Foram tomadas amostras de cultivos em frascos *Schott* em meio SF900 II, na metade da fase exponencial de crescimento ($2-4 \times 10^6$ cel./mL⁻¹) e diluídas em meio fresco na densidade de 1×10^6 cel/mL. Então, amostras de 16 mL desta diluição foram submetidas à tensão de cisalhamento constante de 90, 180, 250 e 300 s⁻¹, com controle de temperatura de 28°C. Utilizou-se reômetro Brookfield Rheocal modelo DV-III+. A exposição a cada tensão de cisalhamento durou 90 minutos com análise a cada 15 minutos da densidade e viabilidade celular, por método de exclusão por azul de triplan.

- Análise de substratos e metabólitos: A concentração de carboidratos foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, HPLC, utilizando coluna Aminex HPX-87H com detecção a 210 nm (UV). A concentração de aminoácidos foi determinada por HPLC utilizando coluna de fase reversa Pico-tag (Waters).

- Determinação da concentração da proteína: Para a quantificação da proteína purificada foi utilizado o método de Bradford, 1976, que se baseia na interação entre o corante “Comassie Brilliant Blue” e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. A leitura de absorbância é realizada a 595 nm.

4.6 Métodos de determinação dos parâmetros cinéticos ou fisiológicos

4.6.1 Velocidade específica máxima de crescimento, $\mu_{m\acute{a}x}$.

A partir dos gráficos elaborados com as concentrações celulares para cada tempo, foi possível determinar a velocidade específica máxima de crescimento celular, $\mu_{m\acute{a}x}$, considerando-se a seguinte equação:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (\text{Eq. 4.1})$$

onde: μ é a velocidade específica de crescimento celular; X é a densidade de células e t é tempo de cultivo. Na região de crescimento celular exponencial:

$$\frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = cte = \mu_{m\acute{a}x} \quad (\text{Eq. 4.2})$$

A integração da equação 4.2 leva a equação 4.3:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_{m\acute{a}x} \times (t - t_0) \quad (\text{Eq. 4.3})$$

onde o índice 0 significa o início da fase exponencial e o valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ é o coeficiente angular do gráfico $\ln X$ versus t .

Foram considerados os pontos da região de crescimento exponencial, escolhidos através da linearização (software OriginPro 7.0) e descartando-se valores discrepantes.

A velocidade específica de crescimento e o tempo de geração (t_g) ou tempo de duplicação de uma população de células estão intimamente relacionados entre si e o valor de um pode ser calculado a partir do conhecimento do valor do outro, com base na equação 4.4:

$$\frac{\ln 2}{\mu_{m\acute{a}x}} = t_g \quad (\text{Eq.4.4})$$

4.6.2 Sensibilidade da célula ao cisalhamento

Consideraram-se como de medida da sensibilidade da célula à tensão de cisalhamento os parâmetros viabilidade teórica e viabilidade real, após cada intervalo de tempo de exposição ao cisalhamento:

- A viabilidade teórica é dada pelo método de exclusão com azul de tripan:

$$V_t = \frac{n^\circ \text{ de células viáveis (não coradas)}}{n^\circ \text{ total de células}} \quad (\text{Eq. 4.4})$$

- A viabilidade real é dada pela contagem do número total de células:

$$V_{real} = \frac{n^\circ \text{ de células após exp osição ao cisalhamento}}{n^\circ \text{ de células no tempo inicial}} \quad (\text{Eq. 4.5})$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Construção do baculovírus recombinante, vAcCANA.

São apresentados a seguir os resultados dos principais métodos de biologia molecular para a confirmação, em cada etapa, da construção do baculovírus recombinante vAcCANA. Apresentam-se ainda as dificuldades encontradas com relação ao protocolo utilizado e as soluções desenvolvidas para a otimização da obtenção do baculovírus recombinante.

5.1.1. Clonagem do gene de interesse no vetor de expressão *pFastBac HTB*

Após realizar-se mini-prep para isolamento do plasmídeo pET28-aCanecys, mantido em *E. coli*, foi feito PCR com os *primers* contendo sítios de restrição para as enzimas *Nco* I e *Hind* III, resultando em DNA de aproximadamente 300 pb, como esperado (Figura 5.1 A). A seguir, realizaram-se em paralelo as reações de clivagem do produto de PCR (cDNA da Canacistatina + sítios de restrição) e do vetor pFastBac HTB com as enzimas *Nco* I e *Hind* III (Figura 5.1 B).

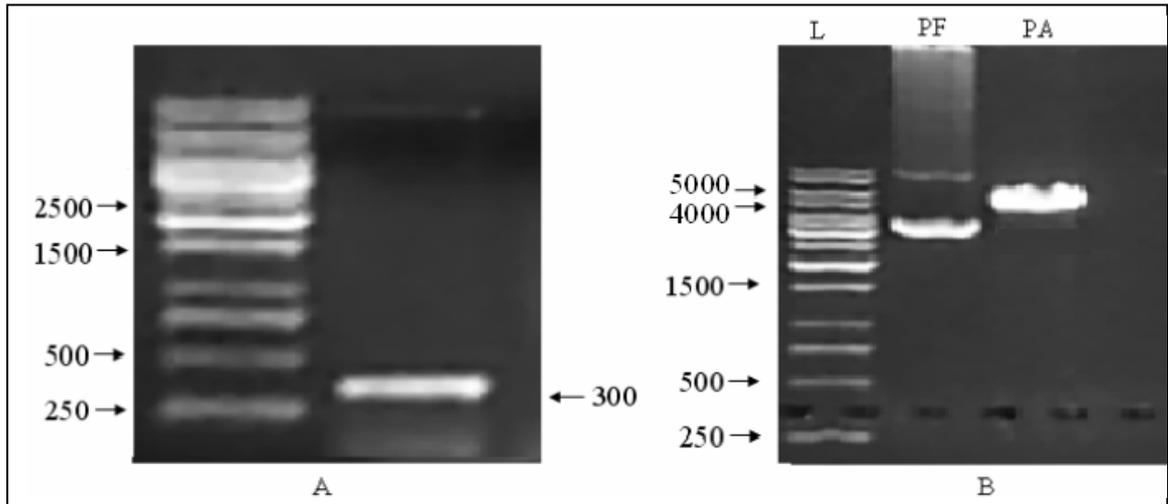


Figura 5.1: Amplificação por PCR da Canacistatina mantida em pET28-a (A) e de reação de clivagem do plasmídeo pFastBac HTB com *Nco* I e *Hind* III (B). (L= ladder, PF= plasmídeo Fechado (não digerido), PA= plasmídeo aberto (digerido com enzimas)). Gel de Agarose 1%, corado com Brometo de Etídio.

Realizou-se a seguir a reação de ligação entre o vetor pFastBac e o cDNA da Canacistatina. O produto desta reação, denominado pFastBac-Cana, foi utilizado para transformar bactérias competentes de *E. coli*, DH5 α , por choque térmico. Após a transformação as bactérias foram plaqueadas em meio contendo ampicilina (pFastBac confere resistência à ampicilina). Foram escolhidas 10 colônias bem isoladas para confirmar por PCR a presença do inserto (Figura 5.2).

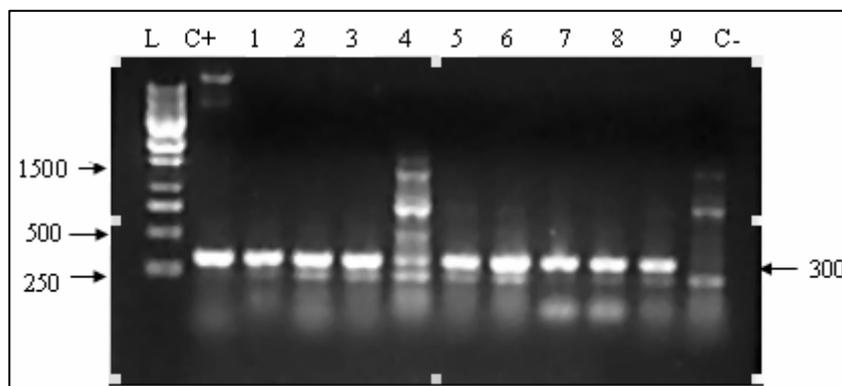


Figura 5.2: Resultado de PCRs de colônia de transformantes pFastBac-Canacistatina. L: ladder, C+ e C-: controles positivo e negativo, 1-9: amplificação com cada colônia. Gel de Agarose 1%, corado com Brometo de Etídio.

A partir das colônias identificadas como positivas realizou-se também a confirmação por clivagem com diferentes enzimas através do tamanho dos fragmentos formados. Para isto esperava-se obter a distribuição de tamanhos apresentada na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Planejamento da confirmação do vetor pFastBac-Cana (recombinante) através da análise de restrição:

Enzimas utilizadas	Bandas formadas para plasmídeo com inserto	Bandas formadas para plasmídeo sem inserto
1) <i>Eco RV</i>	627 1263 3190	404 1263 3190
2) <i>Nco I</i> e <i>Hind III</i>	300 ~ 4800	~4800 (*)

(*): pFastBac HTB sem inserto somente é aberto por estas enzimas e forma uma única banda.

Como pode ser notado, a análise de restrição utilizando somente a enzima *Eco RV* não seria suficiente já que é pequena a diferença de tamanho de bandas para plasmídeo recombinante e não recombinante, motivo pelo qual utilizou-se também a combinação *Nco I*+*Hind III*. Os resultados obtidos por eletroforese se encontram na Figura 5.3.

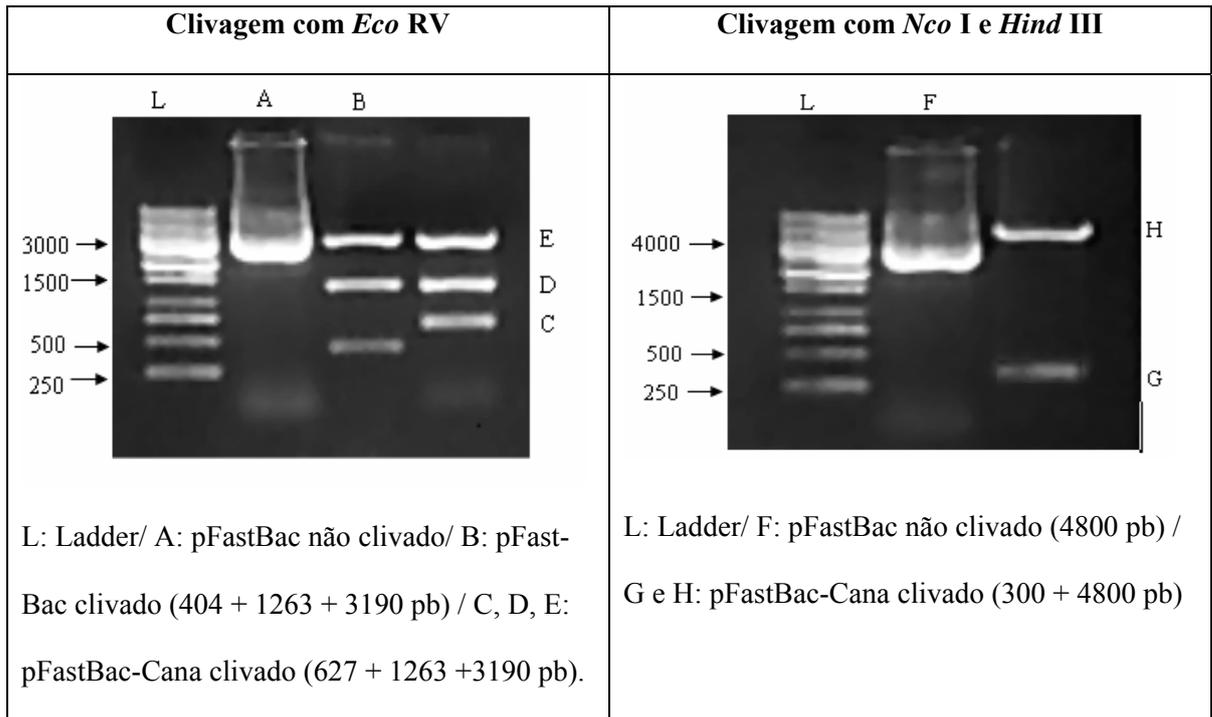


Figura 5.3: Eletroforese das reações de clivagem do plasmídeo não recombinante (pFastBac HTB) e recombinante (pFastBac HTB-Cana) para confirmação da presença do inserto após reação de ligação. Gel de Agarose 1%, corado com Brometo de Etídio.

5.1.2. Geração do bacmídeo recombinante por transposição

A transformação do bacmídeo foi realizada por choque térmico das células competentes *E. coli* DH10-Bac. Para os casos positivos, ou seja, em que ocorreu transposição, a inserção do gene de interesse no sítio *mini-attTn7* impede a expressão de β -Galactosidase, de modo que as colônias recombinantes são necessariamente brancas. Isto ocorre devido ao plaqueamento em meio contendo IPTG, indutor para expressão da β -galactosidase, e Bluo-gal, substrato cromogênico que na presença da enzima produz coloração azul.

Realizou-se então esta seleção inicial de prováveis recombinantes de acordo com a coloração. Como o DNA do bacmídeo recombinante possui acima de 135 Kb, seria difícil realizar a confirmação por simples análise de restrição. Pode-se utilizar então confirmação por PCR já que o bacmídeo contém sítios para os *primers* M13 Forward e M13 Reverse,

flanqueando a região de transposição. Fez-se PCR do bacmídeo utilizando esta combinação de *primers*, baseando-se na região de transposição, conforme a Figura 5.4.

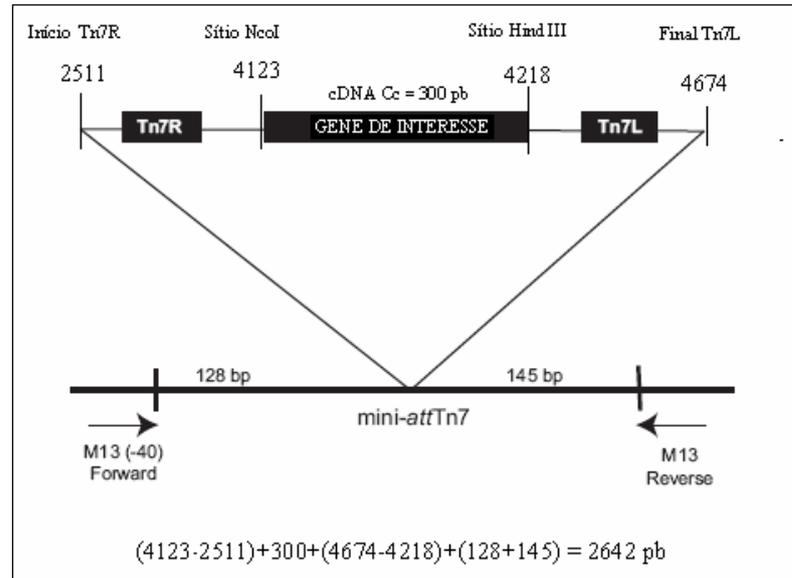


Figura 5.4: Esquema da confirmação da transposição por PCR com *primers* M13F e M13R. Os valores utilizados no cálculo podem ser verificados nos Apêndices A e B (mapa do vetor de expressão pFastBac HTA e seqüência da região de múltipla clonagem do pFastBac HTB).

A Figura 5.5 representa a confirmação por PCR utilizando os *primers* M13-F e M13-R, o que corresponde a banda de aproximadamente 2700 pb e com os *primers* Canacistatina F e M13-R (banda de 901 pb: $300 + (4672 - 4218) + 145$).

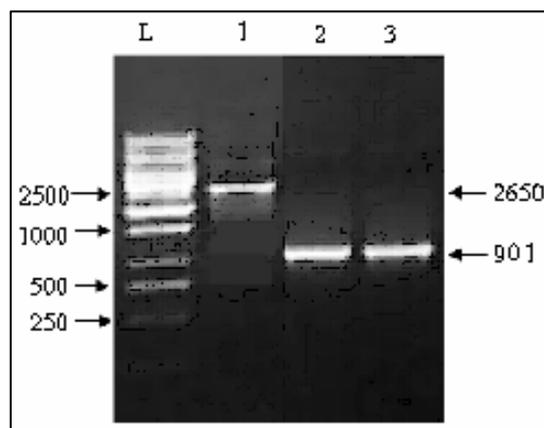


Figura 5.5: Confirmação de bacmídeo recombinante por PCR: L – marcador de peso molecular; 1- *primers* M13-F e M13-R e 2 e 3- *primers* Canacistatina-F e M13-R. Gel de Agarose 1%, corado com Brometo de Etídio.

Realizou-se a amplificação da colônia identificada como positiva, ou seja, contendo o bacmídeo recombinante para estocagem da mesma e para extração de bacmídeo.

5.1.3. Geração do baculovírus recombinante por transfecção de células Sf9: dificuldades encontradas e soluções propostas.

O protocolo seguido para a construção do baculovírus recombinante vAcCANA (Invitrogen, catalogo 10359) recomenda algumas etapas a começar pela transfecção, que não foram eficientes em termos de produção e identificação do baculovírus recombinante. A primeira delas é o tempo de incubação das células transfectadas para se coletar o primeiro estoque viral: recomenda 72 a 120 horas, tempo que pode ser insuficiente, de modo que ocorra a produção de vírus, mas em muito baixa concentração.

Outro fator problemático é que o protocolo propõe o acompanhamento da geração de baculovírus somente pelo aspecto visual das células, o que não é simples quando se tem o primeiro contato com infecção celular por baculovírus recombinante, que não produz poliedros. Neste caso, a única alteração visual é a hipertrofia do núcleo celular e aspecto granuloso. Além disso, o protocolo propõe a identificação do vírus através da proteína recombinante, expressa após amplificação do primeiro estoque. De maneira resumida a rota proposta pelo protocolo pode ser expressa como:

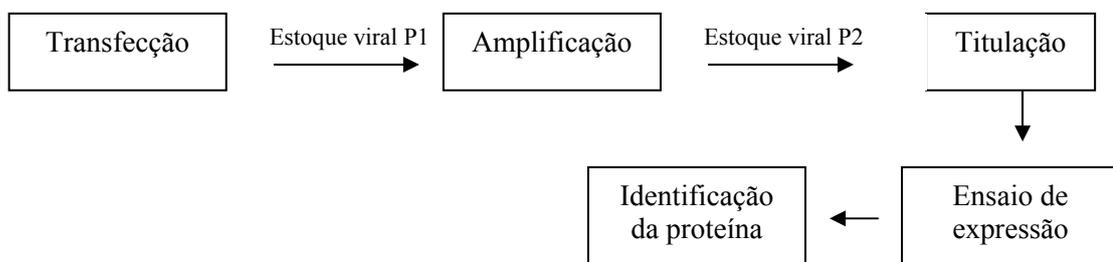


Figura 5.6: Proposta para identificação da proteína recombinante de acordo com o protocolo utilizado neste trabalho (Invitrogen, catálogo nº 10359).

A dificuldade existente nesta rota de atividades é que se o estoque viral P1 for produzido de maneira ineficiente, possuindo muito baixa concentração de vírus, mesmo após a amplificação será produzida quantidade muito diluída de proteína, dificultando a identificação e purificação.

Com base nestas questões desenvolveram-se alterações em cada etapa no sentido de otimizar a produção e identificação do estoque viral. Para tanto a transfecção foi incubada por sete dias e utilizou-se 1mL de estoque viral para amplificação, infectando 10^6 células em 4 mL de meio. Com esta estimativa foi previsto pelo menos 1 partícula viral para infectar cada célula. Além disso, o estoque P2 também foi incubado por sete dias e a seguir titulado para posteriores ensaios de expressão. Outra técnica que o protocolo não indica e que é muito útil é a extração de RNA de células infectadas com estoque P2, para reação com a enzima transcriptase reversa, que produz cDNA a partir do RNAm, e a seguir realização de PCR com os *primers* específicos da Canacistatina, técnica conhecida como RT-PCR. Isto foi realizado neste trabalho e obteve-se resultado positivo, como pode ser verificado na Figura 5.7 onde há a banda correspondente ao cDNA da Canacistatina, de aproximadamente 300 pares de base.

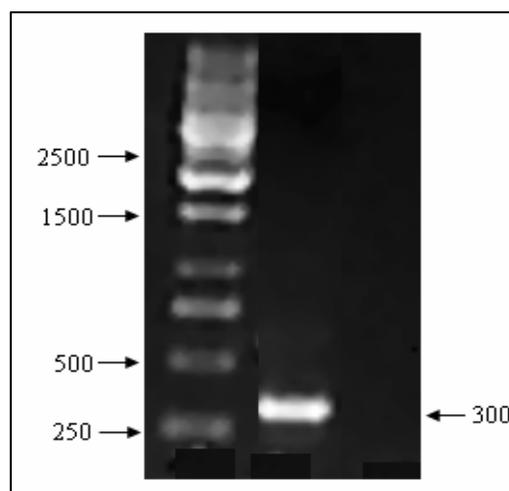


Figura 5.7: Amplificação por PCR do cDNA da Canacistatina (~300pb) produzido por reação de mRNA com Transcriptase Reversa. Gel de Agarose 1%, corado com Brometo de Etídio.

O baculovírus recombinante foi também confirmado através da extração de DNA de ‘*budded virus*’, BV, que são as partículas virais infecciosas geradas da propagação viral em cada célula infectada. O DNA foi extraído de sobrenadante de células infectadas, a 144 horas pós infecção, e amplificado por PCR utilizando os *primers* da Canacistatina, tendo como controle positivo o pFastBac-CANA recombinante. O resultado pode ser visto na Figura 5.8:

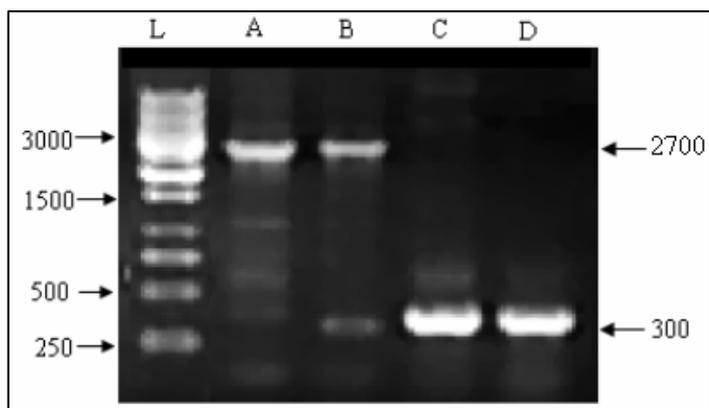


Figura 5.8: PCR de DNA extraído de *Budded Virus*. (L): Ladder; (A): pFastBac-CANA com *primers* M13F e M13R (~2700 pb); (B) DNA de BV com *primers* M13F e M13R; (C): pFastBac-CANA com *primers* CanaF e CanaR (~300pb); (D): DNA de BV com *primers* CanaF e CanaR. Gel de Agarose 1%, corado com Brometo de Etídio.

5.1.4. Características morfológicas de células infectadas por baculovírus recombinante

A caracterização do aspecto visual, ou seja, da morfologia das células após a infecção é um modo de se inferir, diretamente, que o processo de infecção está ocorrendo. Estas características podem ser acompanhadas todas as horas após a infecção viral sempre em comparação com células saudáveis, não infectadas. Contudo, identificar as diferenças não é uma técnica simples quando se trata de vírus recombinante onde não é expressa a proteína poliedrina e não se formam poliedros, que são facilmente identificados ao microscópio acima de 24 horas após infecção. Na Figura 5.9 pode ser visualizado o aspecto da célula quando da formação de poliedros, numa infecção de células Sf9 com baculovírus AgMNPV (*Anticarsia gematalis* Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus), a 96 horas de infecção.

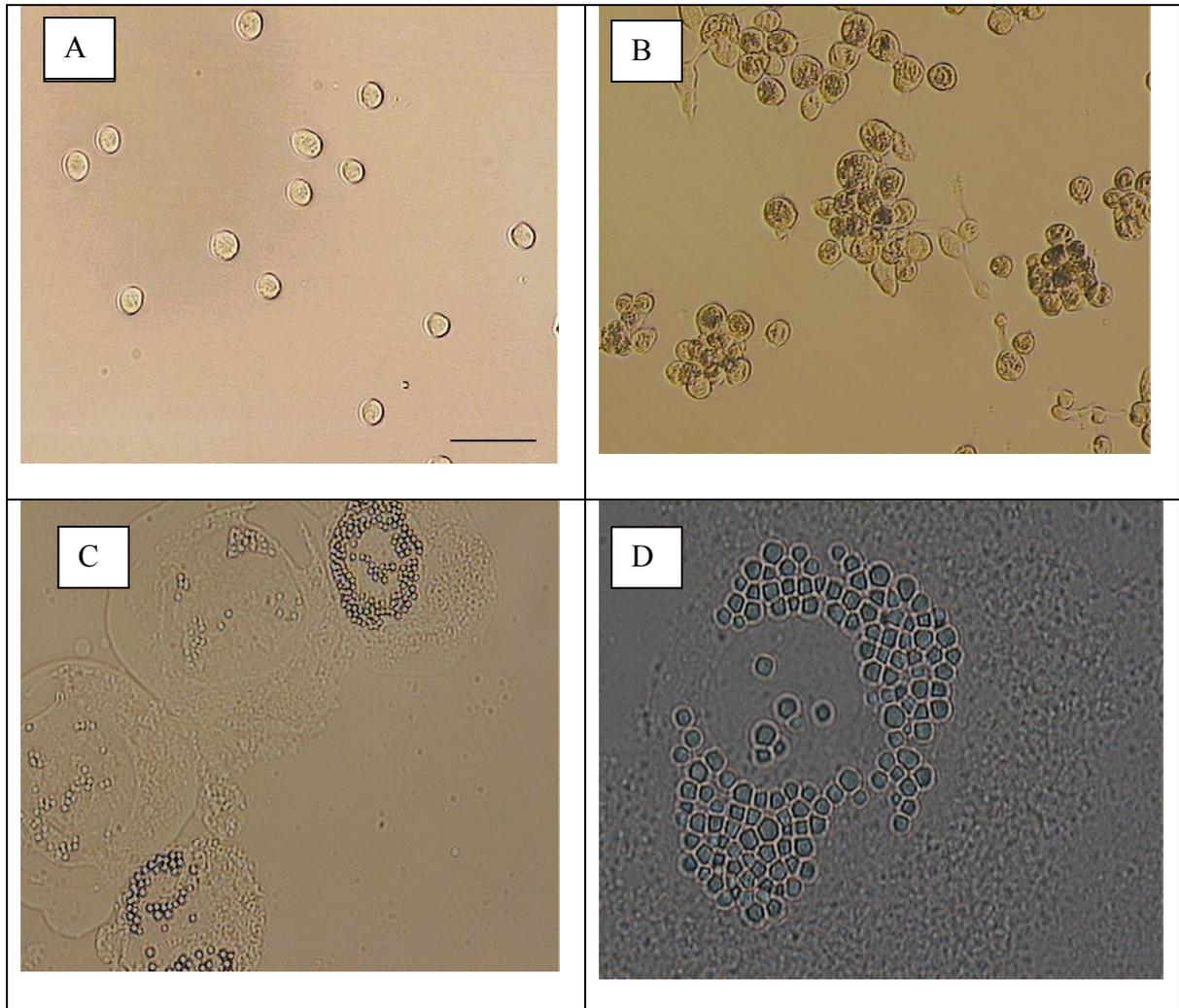


Figura 5.9: Formação de poliedros em células Sf9 infectadas com AgMNPV, a 96 horas p.i. (A): Sf9 não infectada, 200X; (B), (C) e (D): células com poliedros observadas sob aumento de 200, 400 e 1000X respectivamente.

Pode-se observar através destas imagens que é relativamente simples identificar poliedros nas células infectadas, mesmo sob aumento de 200 vezes. Embora estas imagens se refiram a 96 horas de infecção, a partir de 24 horas, aproximadamente, já podem ser visualizados os primeiros poliedros. Comparando-se as imagens A e B percebe-se também o aumento do diâmetro celular, conseqüência da formação dos poliedros no núcleo celular.

Já para infecção com baculovírus recombinante sem o gene da poliedrina, a alteração visual é a hipertrofia do núcleo e nos estágios mais tardios da infecção é possível notar o

aumento do tamanho celular. Visualmente, a partir de uma certa familiaridade com as modificações no aspecto das células, pode-se identificar a ocorrência da infecção pela hipertrofia do núcleo celular, como pode ser visto na Figura 5.10:

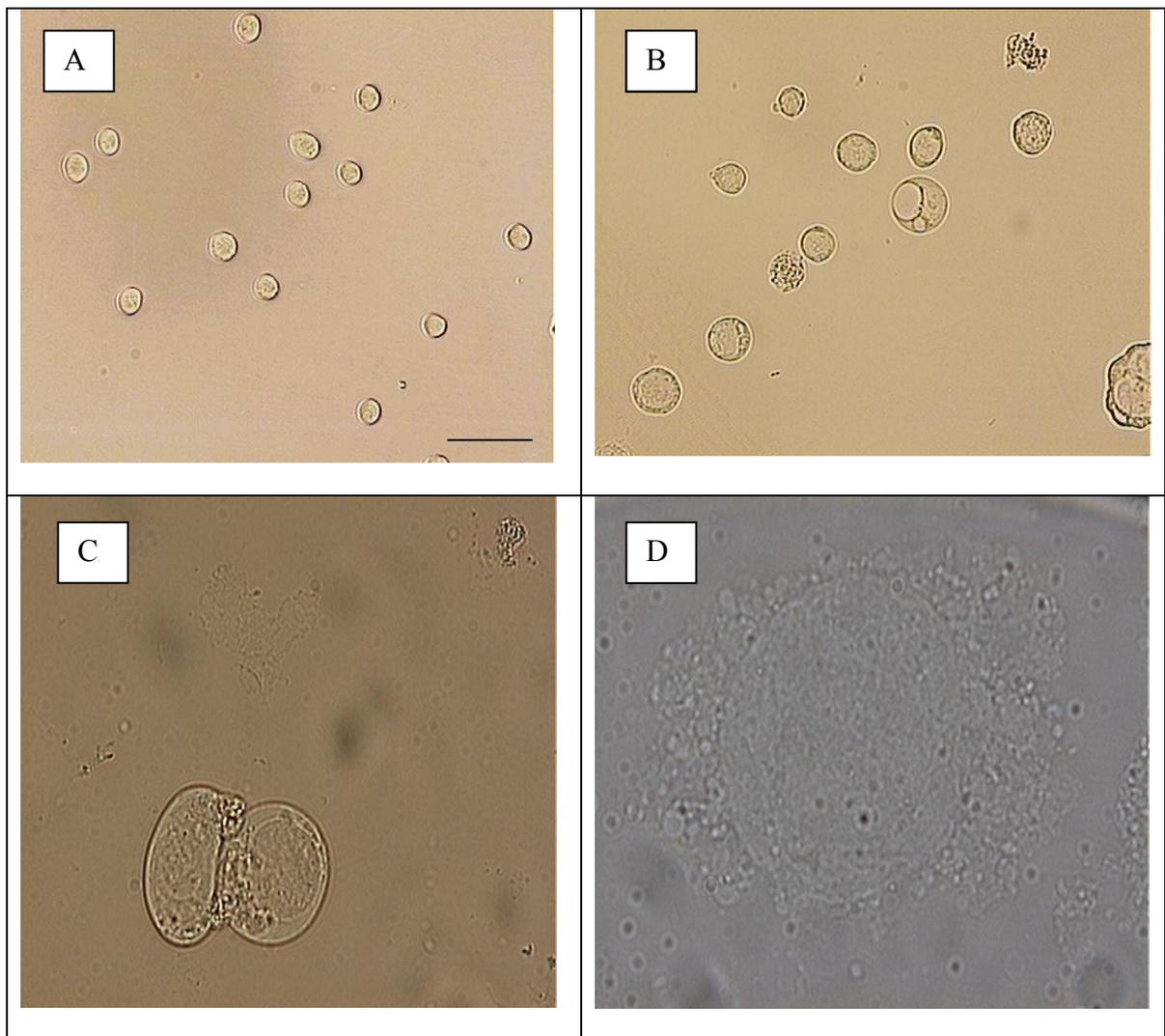


Figura 5.10: Células Sf9 infectadas com baculovírus recombinante, vAcCANA, a 96 horas p.i. (A): Sf9 não infectada, 200X; (B), (C) e (D): células infectadas observadas sob aumento de 200, 400 e 1000X respectivamente.

Além da característica visual, a infecção pode ser acompanhada pelo aumento do tamanho celular, como consequência da proliferação de vírus e produção de proteínas recombinantes. Uma vez que as células apresentaram formato esférico, mesmo após a

infecção, o diâmetro pode ser utilizado como medida do tamanho celular. A distribuição do diâmetro celular antes e após a infecção foi analisada nas duas culturas com populações de aproximadamente 400 células, obtendo-se os tamanhos de $10,5\mu\text{m}$ (desvio padrão $\pm 1,8\mu\text{m}$) para células não infectadas e $16,84\mu\text{m}$ (desvio padrão $\pm 3,97\mu\text{m}$) para células infectadas com baculovírus vAcCANA, a 96 horas p.i. Observou-se para a distribuição dos diâmetros o seguinte histograma:

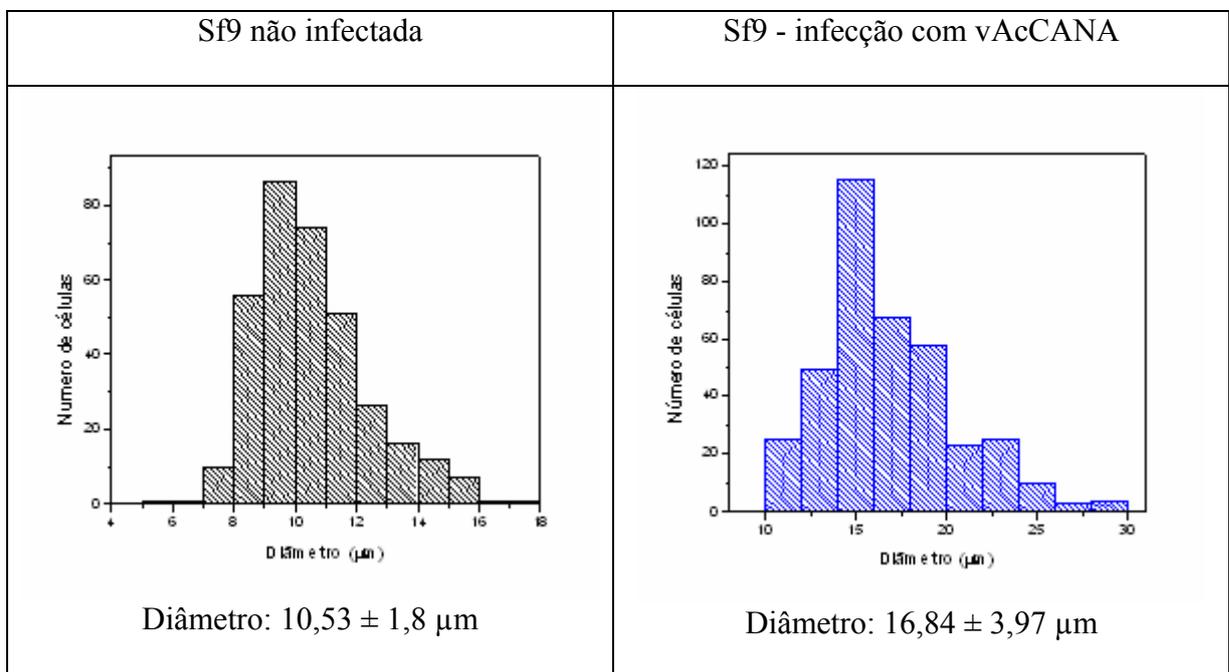


Figura 5.11: Distribuição de diâmetro celular para células Sf9 infectadas e não infectadas.

Observa-se no caso de células infectadas que a distribuição de diâmetro varia desde $10\mu\text{m}$ a $30\mu\text{m}$, sendo a média $16,84\mu\text{m}$. Isto pode ser explicado pelo fato de haver na população celular total células que não foram infectadas e possuem diâmetro normal, em torno de $10\mu\text{m}$, bem como poucas células que aumentaram muito de tamanho, entretanto devem ser consideradas no cálculo da média por se tratar realmente de células infectadas.

O tamanho celular é considerado um parâmetro importante na cultura celular especialmente pelo fato de refletir de maneira confiável a produção de proteína recombinante (LLOYD *et al.*, 2000), além do fato de tratar-se de um parâmetro fácil de ser medido.

Especificamente para produção de proteínas recombinantes por infecção com baculovírus Palomares, Pedroza e Ramirez (2001), estudaram a relação entre o diâmetro celular e a produção de proteínas. Constataram que o diâmetro celular aumenta a partir de 24 horas p.i. e que a concentração de proteínas é diretamente proporcional ao diâmetro celular. Neste mesmo trabalho, onde foram infectadas células Sf9 com baculovírus recombinante AcMNPV codificando a proteína VP8 de rotavírus, os diâmetros celulares após a infecção variaram entre 16.1 e 18.4 μm , para diferentes condições de cultivo e concentrações de proteína. Estes valores compreendem a faixa de valores obtidos no presente trabalho, para células Sf9 infectadas com vAcCANA.

5.2 Experimentos de cultivo de células Sf9 em frascos *Schott*

Frascos de cultura do tipo *Schott* agitados em mesa incubadora rotativa, permitem condições de cultivo similares àquelas obtidas em bioreatores tipo tanque-agitado, uma vez que as células crescem em suspensão e são submetidas a troca de oxigênio pela agitação mecânica, porém sem o uso de impelidores. Desta forma, podem ser utilizados num estudo de aumento de escala prévio ao uso de bioreatores, com a vantagem de possibilitar a utilização de menores volumes de cultivo. Os itens seguintes relatam todos os experimentos realizados em frascos *Schott*.

5.2.1 Crescimento de células Sf9 em meio TNM-FH.

O meio TNM-FH (Sigma) é um dos meios utilizados para cultura de célula de inseto, sendo que podem ser encontrados vários trabalhos na literatura sobre cultivos realizados neste meio (MENDONÇA, PALOMARES E RAMIREZ,1999; DREWS, PAALME e VILU, 1995). Trata-se de um produto de baixo custo, em relação a meios não suplementados, e que requer a adição de soro fetal bovino como fonte de fatores de crescimento celular. Pode ser preparado a partir do meio de Grace (Meio Grace + 3,33 g/L de lactoalbumina + 3,33 g/L extrato de levedura) como um enriquecimento deste primeiro.

Com o caráter de ensaios preliminares, foram realizados cultivos neste meio de cultura em frascos *Schott* de 100 mL, com volume de trabalho de 20 mL, a 100 rpm e 28°C (Figura 5.12).

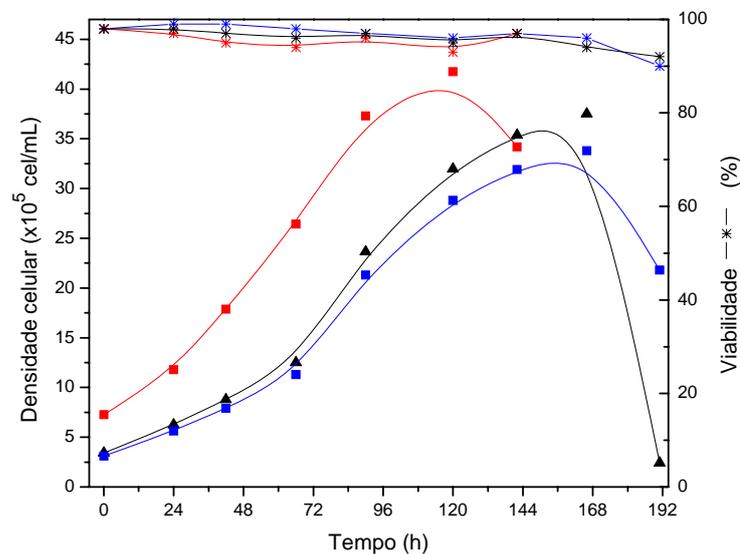


Figura 5.12: Crescimento e viabilidade de células Sf9 em meio TNM-FH + 10% de SFB, cultivadas em frasco *Schott* de 100 mL com 20 mL de volume de trabalho.

Os valores obtidos de máxima densidade celular, tempo e velocidade específica de crescimento são similares a valores prévios observados nestas condições de cultivo

(MENDONÇA, PALOMARES E RAMIREZ, 1999). Observou-se aqui um crescimento celular lento, com velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) igual a $0,01944 \text{ h}^{-1}$, o que é notado no gráfico pelo longo período de tempo necessário para que as células alcançassem a máxima densidade celular: entre 120 e 168 horas. Além disto, esta densidade celular é baixa quando comparada a cultivos em meios de cultura mais ricos, como o SF900 II, mas nota-se uma satisfatória manutenção da viabilidade celular.

Embora comumente utilizado, o meio TNM-FH possui baixa concentração de nutrientes e suporta cultivos de baixo crescimento, como cultivo estático (em garrafa) para fins de experimentos em baixa escala. Mas tratando-se de cultivos de maior rendimento, em frascos agitados, spinner ou bioretos este não é um meio favorável apesar de seu baixo custo. Cite-se, por exemplo, cultivos de células Sf9 em *shaker* neste meio realizados por Mendonça, Palomares e Ramirez (1999), que apresentaram densidade celular máxima de em média, $3 \times 10^6 \text{ cel/mL}$ e velocidade específica de crescimento em torno de $0,022 \text{ h}^{-1}$.

Estas informações já estão bem estabelecidas na literatura específica sendo que há trabalhos que propõem a suplementação deste meio com nutrientes essenciais. Neste sentido Drews, Paalme e Vilu (1995), estudaram o crescimento de células Sf9 neste meio em spinner observando que o máximo crescimento celular foi de $3,5 \times 10^6 \text{ cel/mL}$ e que a glicose do meio, carboidrato consumido preferencialmente, foi completamente consumida à densidade de $2 \times 10^6 \text{ cel/mL}$. Estes dois parâmetros, crescimento celular e consumo de glicose mostram que a limitação do cultivo é devida à escassez de nutrientes essenciais, no caso de cultivos de alta produtividade, em suspensão. Os autores também notaram que quando o meio TNM-FH foi suplementado até as concentrações finais de 10 g/L de glicose e $8,0 \text{ g/L}$ de extrato de levedura obteve-se em spinner densidade celular máxima de $1,8 \times 10^7 \text{ cel/mL}$, o que significa alto rendimento em densidade celular.

Deve-se considerar ainda a necessidade de suplementação destes meios com soro fetal bovino (SFB), responsável pela estimulação do crescimento celular através de fatores de crescimento, hormônios, minerais, lipídeos, proteínas transportadoras entre outros compostos (Freshney, 1994). Entretanto, a utilização de SFB é um fator crítico devido às questões de variabilidade inerente a cada lote, o que compromete a reprodutibilidade dos resultados, além da possibilidade de contaminação por micoplasma e dificuldades na purificação de proteínas devido à presença abundante de albumina bovina no SFB.

Um dos maiores objetivos em cultura de células atualmente tem sido o desenvolvimento de meios de cultura quimicamente definidos e livres de soro. Com relação à ausência de SFB, autoridades reguladoras como o FDA (US Food and Drug Administration) desde 1993 propõem esta condição com base no potencial de risco de transmissão de viroses e doenças de origem bovina. Apesar da possibilidade de o material ser identificado, testado extensivamente e ter contaminantes inativados, o FDA aconselha o uso de meios livres de soro e inclusive proíbe o uso de algumas frações de albumina. Nesta discussão, tem grande importância também o fator custo, onde a garantia de pureza pode significar um considerável aumento no custo de produção do meio (Van der Pol e Tramper, 1998).

5.2.2 Crescimento de células Sf9 em meio SF900 II

Amplamente utilizado para o cultivo de células Sf9, o meio de cultura livre de soro SF900 II (Invitrogen – Gibco) foi o primeiro a ser utilizado no presente trabalho, a partir da observação do baixo crescimento obtido em ensaios prévios com meio de baixo custo, suplementado com SFB (meio TNM-FH, item 5.2.1).

Neste meio foi inicialmente realizado o levantamento dos dados cinéticos em função da densidade de inóculo e da velocidade de agitação para cultivos em frasco *Schott* de 100 mL com volume de trabalho igual a 20 mL.

5.2.3 Efeito da densidade de inóculo e velocidade de agitação

Testou-se a influência das variáveis densidade de inóculo e velocidade de agitação sobre o cultivo de células Sf9, cujos resultados podem ser observados na Figura 5.13:

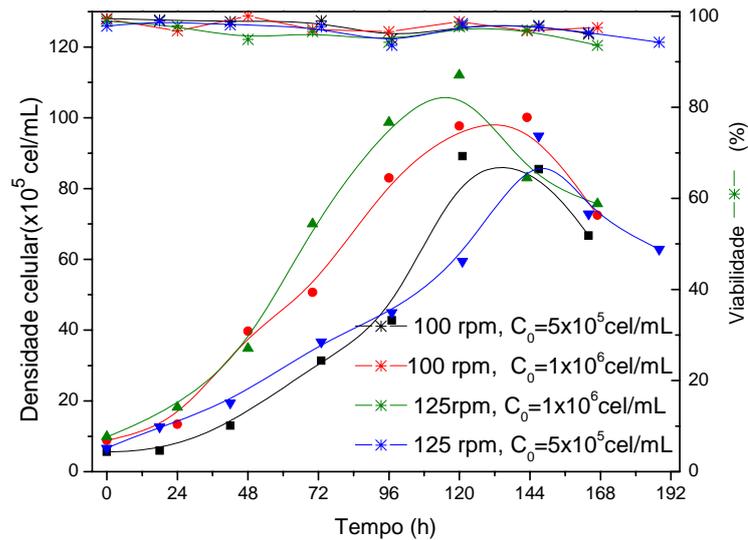


Figura 5.13: Efeito da densidade do inóculo e da velocidade de agitação para cultivos de células Sf9 em meio de cultura SF900 II, em frasco shott de 100 mL, com 20 mL de volume de trabalho.

Os resultados obtidos nestes experimentos podem ser interpretados com relação às duas variáveis testadas da seguinte forma:

- Quanto à densidade de inóculo: observa-se claramente o efeito positivo da utilização de um inóculo de maior densidade celular, com relação a ocorrência de fase lag, onde para o menor inóculo utilizado a fase lag é de aproximadamente 20 horas, o que não é notado para o maior inóculo. Este efeito é muito positivo já que uma fase lag, onde não ocorre crescimento celular, representa um tempo não proveitoso e acarreta na diminuição da densidade celular nos pontos seguintes. Além disso, o maior número inicial de células permite a maior densidade ao

longo do tempo, o que é interessante quando se deseja utilizar grandes quantidades de células durante a fase de crescimento, quer para realizar outro inóculo, quer para realizar infecções. Marteiijn *et al.*, (2000) estudaram a relação entre densidade de inóculo e velocidade específica de crescimento, mostrando que há uma relação linear entre estes parâmetros. Este estudo foi feito para três linhagens de células, entre elas Sf21, também originada de *Spodoptera frugiperda*. O trabalho recomenda a utilização de um inóculo de no mínimo de 3×10^5 cel/mL e mostra que, sendo possível e viável a utilização de inóculos maiores, isto deverá resultar em maior velocidade específica de crescimento.

- Quanto à velocidade de agitação: Para cultivos de células Sf9 em frascos agitados em mesa incubadora rotativa utilizam-se, em geral, velocidades entre 90 e 120 rpm do início ao fim do cultivo (BENSLIMANE *et al.*, 2005, YAMAJI *et al.*, 2003). A utilização de maiores velocidades de agitação, nas quais ocorre maior taxa de transferência de oxigênio, pode ser uma estratégia simples de otimização de cultivo com relação a suprimento de oxigênio. Entretanto, esta maximização é limitada pelos efeitos de cisalhamento e *stress* mecânico a altas velocidades. Para as velocidades testadas aqui, 100 e 125 rpm, pôde-se notar resultados semelhantes com relação à máxima densidade celular e à velocidade específica de crescimento, mas ao combinar inóculo e agitação maiores a vantagem foi mais notável (Tabela 5.2).

Tabela 5.2: Densidade celular máxima ($X_{m\acute{a}x}$), Velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$) e Tempo de geração (t_g) em diferentes condições de agitação e densidade de inoculo.

Densidade de inóculo (cel/mL)	Velocidade de agitação (rpm)	$C_{m\acute{a}x}$ (cel/mL)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (h^{-1})	Coefficiente de correlação, R^2	Tempo de geração t_g (h)
5×10^5	100	$8,92 \times 10^6$	$0,0237 \pm 0,00155$	0,99518	29,25
	125	$9,49 \times 10^6$	$0,0226 \pm 0,00235$	0,98933	30,67
1×10^6	100	$1,00 \times 10^7$	$0,02455 \pm 0,00185$	0,99162	28,23
	125	$1,12 \times 10^7$	$0,0266 \pm 0,0017$	0,99592	26,06

A partir destes resultados define-se a velocidade de agitação de 100 rpm como sendo adequada para os cultivos de células Sf9 em frascos *Schott*, considerando-se as conveniências do laboratório apesar das observações quanto aos efeitos satisfatórios do aumento da agitação.

Com relação à densidade de inóculo, para todos os experimentos de cultivo posteriores a estes resultados, adotou-se a densidade celular de 1×10^6 cel/mL.

5.2.4 Efeito da aeração do cultivo

Para avaliar o efeito da aeração superficial do cultivo sobre o crescimento celular, foram realizados experimentos em frasco adaptado com um sistema de aeração, compostos de filtros que permitem a entrada de ar do ambiente para o frasco, utilizando volume total de 500 cm^3 e volume de trabalho de 50 mL. As células foram inoculadas à densidade de 1×10^6 cel/mL e mantidas a 100 rpm. Os resultados podem ser observados na Figura 5.14.

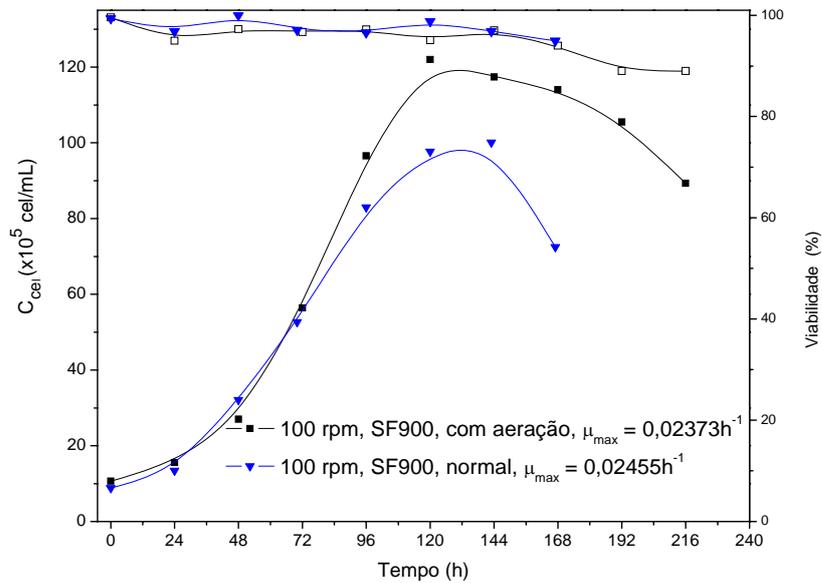


Figura 5.14: Comparação entre cultivo de células Sf9 com aeração (frasco *Schott* aerado de 250 mL com 50 mL de volume de trabalho) e nas condições padrão (frasco *Schott* simples de 100mL com 20 mL de volume de trabalho).

Através deste experimento nota-se que a utilização de um sistema de aeração ambiente não resulta em maior velocidade específica de crescimento e conseqüentemente, as concentrações celulares ao longo de 96 horas são muito próximas. A diferença observada é que o cultivo alcança uma maior densidade celular máxima, 20% maior em relação ao cultivo nas condições padrão.

Esta observação aponta para a importância do oxigênio em cultivos de células Sf9 quando se comparam os dois cultivos: na ausência de aeração o oxigênio é limitante do crescimento quando a densidade celular é próxima de 10^7 células/mL. Já na aeração do cultivo, embora se note uma diminuição da velocidade de crescimento após 96 horas, as células continuam a crescer, alcançando densidade 20% maior. Após 120 horas porém, provavelmente ocorre escassez de oxigênio, de modo que as células param de se multiplicar. Este resultado é indicativo do comportamento que se observaria em bioreator, onde é possível

manter estável a saturação de oxigênio e conseqüentemente possibilitar maiores rendimentos celulares.

Sabe-se que como conseqüência da escassez de oxigênio ocorre o aumento da concentração de ácido láctico no meio, já que as células partem para um metabolismo de caráter fermentativo. Verificaram-se os níveis de produção deste metabólito para todos os cultivos sendo que sete deles são apresentados na Figura 5.15:

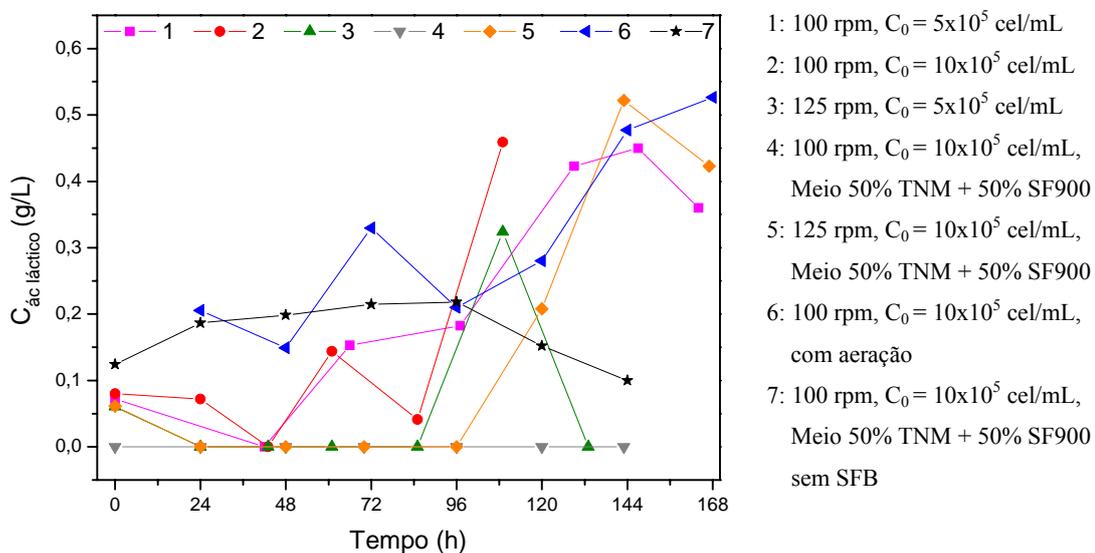


Figura 5.15: Produção de lactato para experimentos de cultivo sob sete diferentes condições.

Observa-se em geral que a produção de ácido láctico aumenta consideravelmente após 96 horas de cultivo, momento que coincide com o fim do crescimento exponencial, indicando a influência do oxigênio neste parâmetro. No caso do cultivo com aeração em que houve crescimento celular até 120 horas (Figura 5.14), observa-se que a produção de ácido láctico é maior a partir deste momento.

Com relação à coerência destes valores em relação à literatura, para o caso de cultivos de células em shaker, sem controle da oxigenação, outros autores observaram também a baixa produção de lactato (inferior a 0,5 g/L), como Bedard *et al.* (1993) e Mendonça, Palomares e

Ramirez (1999), todos cultivando células Sf9 em meio TNM-FH. Com outro meio de cultura, YPR, Ikonomou e colaboradores (2001) observaram produções de lactato de no máximo 0,75g/L.

Embora se perceba a importância do oxigênio nos cultivos de células Sf9, no presente trabalho os cultivos não serão aerados já que não se obtém aumento das concentrações celulares até 96 horas de cultivo e isto é o desejado, pois os cultivos serão interrompidos na metade da fase exponencial de crescimento para a infecção por baculovírus recombinante. Além disso, sabe-se que a utilização de frascos *Schott* mantendo-se a relação volume de trabalho/volume do frasco em torno de 0,2 é adequada para cultivos celulares agitados (Swiech, 2005). Porém, para cultivos em bioreatores, em que esta relação é diminuída, a simples troca de oxigênio através da superfície não é suficiente e se faz necessário a aplicação de oxigenação (O'REILLY, MILLER e LUCKOW, 1994).

5.2.5 Otimização do meio de cultura: combinação entre SF900 II e TNM-FH com SFB

Os ensaios prévios em meio SF900 II (item 5.2.3) apresentaram bons resultados quando comparados à literatura específica, em termos de crescimento celular e velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), como pode ser visto na Tabela 5.3.

Tabela 5.3: Dados da literatura para cultivos de células Sf9 em SF900 II, frascos agitados em mesa incubadora rotativa, com agitação entre 100 e 120 rpm.

$C_{\text{máx}}$ (cel /mL)	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	Referência
8×10^6	0,025	Benslimane, 2005
5×10^6	0,031	Ikonomou, 2001
6×10^6	0,028	Doverskog, 2000
7×10^6	0,040	Gotoh, 2004
8×10^6	0,030	Batista, 2003

Associando-se a literatura aos experimentos deste trabalho, foi possível realizar ensaios com combinação de meios de cultura, tendo por referência o desempenho do cultivo em SF900 II onde se observou a ‘sub-utilização’ da glicose, substrato essencial para o metabolismo celular, presente neste meio (Figura 5.19).

A combinação de meios de cultura foi feita na proporção 1:1 entre os meios SF900 II e TNM-FH, sendo que a princípio acrescentou-se 5% de SFB, já que o meio TNM-FH é comumente utilizado com este suplemento. Esta estratégia tem em vista a redução do custo do processo em torno de 50%, uma vez que o meio SF900 II possui alto custo.

Os cultivos com a combinação de meios foram realizados a 100 e 125 rpm, com densidade de inoculo de 1×10^6 cel/mL, em frascos *Schott* de 100 ml com volume de trabalho de 20 mL e estão comparados a cultivos em SF900 II com $C_0 = 1 \times 10^6$ cel/mL, a 100 e 125 rpm na Figura 5.16:

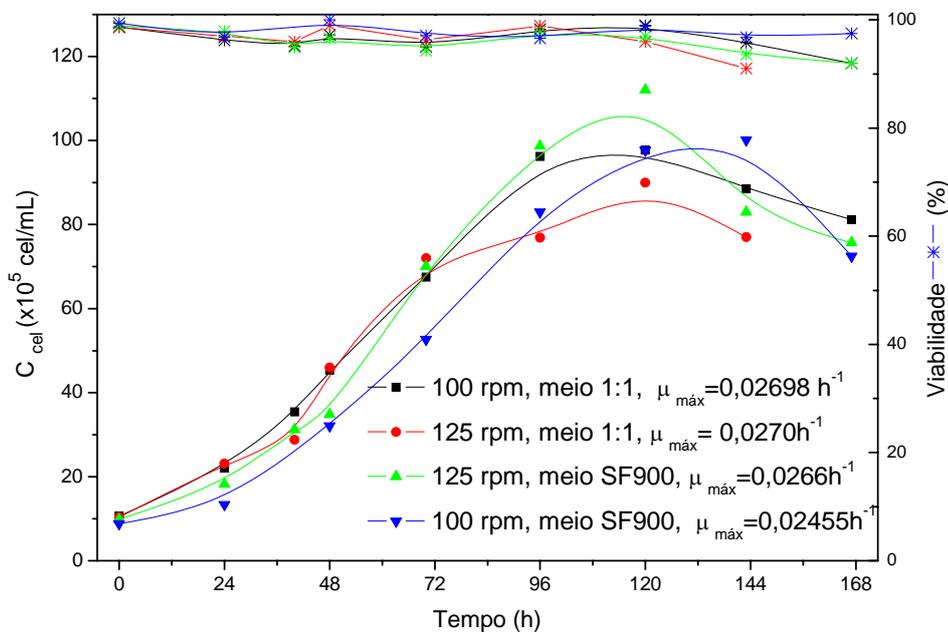


Figura 5.16: Comparação entre os cultivos de células Sf9 nos meios SF900 II e combinação SF900 II + TNM-FH (com 5% de SFB) e duas velocidades de agitação. $C_0 = 1 \times 10^6$ cel/mL para todos os casos.

Através deste experimento, observou-se que o crescimento celular é muito semelhante para os dois meios de cultura e que, apesar da diluição do meio mais rico (SF900 II) ainda são mantidas as concentrações mínimas de substratos para que não ocorra limitação do crescimento por substratos. Este dado é constatado através das análises de carboidratos (item 5.2.7) como também observaram Radford, Reid e Greenfield (1997) para células Sf9 em meio SF900 II: no final da fase exponencial ainda havia grande disponibilidade de glicose, 30% da concentração inicial de maltose e somente o aminoácido cisteína havia exaurido. Apesar disto, estes pesquisadores indicam cisteína como sendo o substrato limitante somente da produção de proteína.

Apesar do baixo crescimento de células em meio TNM-FH (item 5.2.1), este meio é de fácil preparação, através da suplementação do meio de Grace com hidrolisado de lactoalbumina (3,33 g/L), extrato de levedura (3,33 g/L) e 10% de SFB (Gibco), além de apresentar baixo custo em relação a meios livres de soro; deste modo, este meio foi escolhido para a combinação com SF900 II, na proporção de 50%, tendo concentração final de 5% de SFB.

A concentração dos principais nutrientes nesta mistura pode ser prevista combinando-se os valores obtidos utilizando meio comercial TNM-FH, disponível na literatura, com aqueles obtidos por análise de carboidratos e aminoácidos realizadas no LATECC pela técnica HPLC (Tabela 5.4).

Tabela 5.4: Concentração de aminoácidos e carboidratos nos meios TNM-FH , SF900 II e combinação destes dois meios na proporção 1:1 (Meio 50%). Valores exatos para TNM-FH e aproximados para os demais casos.

Principais Nutrientes	Meio TNM-FH (g/L) ⁽¹⁾	Meio SF900 II (g/L) ⁽²⁾	Meio SF900 II (g/L) ⁽³⁾	Meio SF900 II (g/L) ⁽⁴⁾	Meio 50% (g/L) ⁽⁵⁾
Alanina	0,4	0,31	0,36	0,33	0,38
Arginina	0,7	0,78	0,59	0,69	0,64
Asparagina	0,35	1,80	1,41	1,60	0,88
Ácido Aspártico	0,35	nd	nd	nd	nd
Cisteína	0,025	nd	0,04	0,04	0,032
Glutamina	0,6	2,06	2,26	2,16	1,43
Ácido Glutâmico	0,6	nd	1,65	1,65	1,12
Glicina	0,65	0,53	0,57	0,55	0,61
Histidina	2,5	nd	0,61	0,61	1,56
Isoleucina	0,05	1,05	0,76	0,90	0,4
Prolina	0,35	nd	0,59	0,59	0,47
Lisina	0,625	0,88	0,64	0,76	0,63
Threonina	0,175	0,46	0,35	0,40	0,26
Leucina	0,075	0,52	0,36	0,44	0,22
Fenilalanina	0,15	1,0	0,87	0,93	0,51
Metionina	0,05	0,89	0,92	0,90	0,49
Valina	0,1	0,70	0,62	0,66	0,36
Tirosina	0,072	0,36	0,23	0,29	0,15
Serina	1,1	0,47	0,6	0,53	0,85
Glicose	0,7	nd	10	10	5,35
Frutose	0,4	nd	nd	nd	nd
Sacarose	26,68	nd	2,0	2,0	14,3
Maltose	0	nd	1,2	1,2	0,6

(nd): não determinado; (1): valores determinados pelo fabricante; (2): Ikonomou, Bastin e Schneider (2001); (3): determinado através de análises por HPLC no LATECC; (4): Médias entre 2 e 3 e/ou valores de (3) e (5): concentração aproximada de cada nutriente para a combinação de meios TNM-FH e SF900 II na proporção 1:1 (valor calculado utilizando dados de SF900 II ⁽³⁾ e TNM-FH ⁽¹⁾).

Observa-se que, além da baixa concentração de diversos aminoácidos no meio TNM-FH em relação ao meio SF900 II, ele ainda possui baixíssima concentração de glicose, carboidrato essencial para células Sf9. Entretanto, sua utilização na diluição do meio SF900 II pode ser adequada para fins de cultivos, pois vários aminoácidos mantêm as concentrações mínimas após a diluição, incluindo os mais críticos como cisteína.

5.2.6 Combinação entre SF900 II e TNM-FH sem a utilização de SFB.

Foram realizados experimentos de cultivo utilizando a mesma combinação entre os dois meios de cultura, combinação 1:1 entre SF900 II e TNM-FH, porém sem a adição de SFB, no intuito de se minimizar os problemas desta suplementação (item 2.12). Os resultados obtidos para o ensaio em triplicata e a comparação com os cultivos anteriores são expressos nas Figuras 5.17 e 5.18.

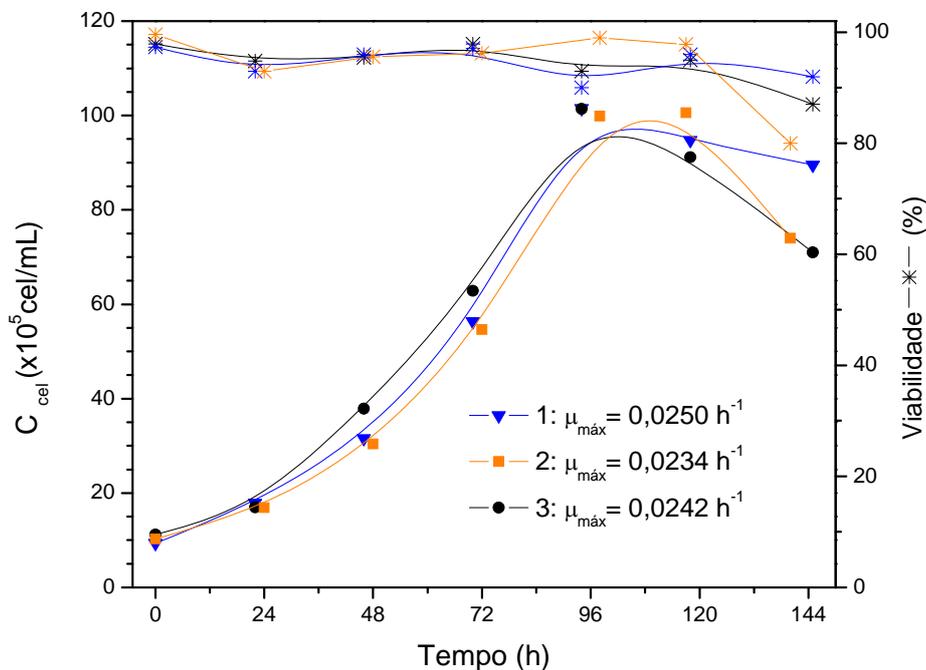


Figura 5.17: Ensaio em triplicata para crescimento de células Sf9 a 100 rpm, $C_0=1 \times 10^6$ cel/mL na combinação de meios SF900 II e TNM-FH, sem SFB. 1 e 2 realizados na mesma data, partindo de um único pré-inóculo.

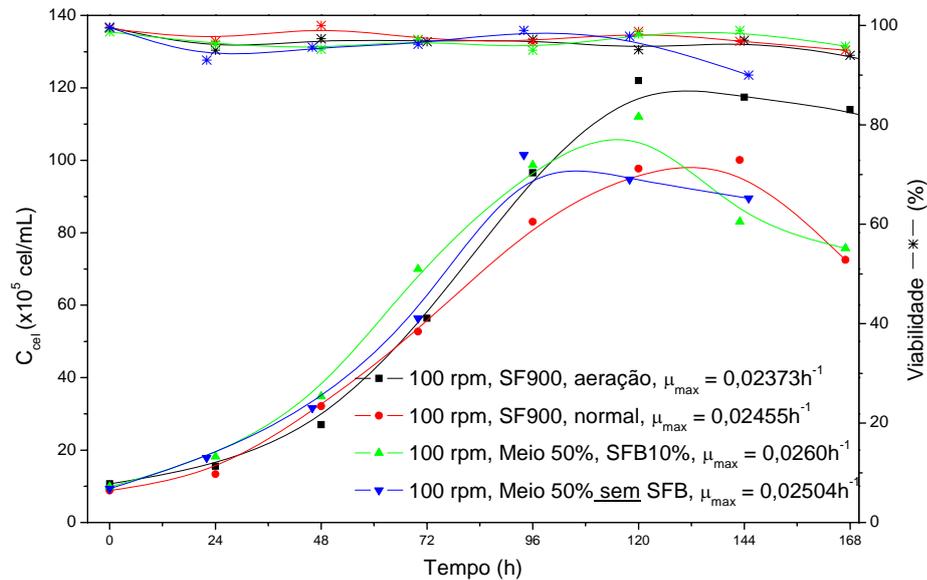


Figura 5.18: Comparação entre os cultivos de células Sf9 em diferentes meios de cultura para $C_0 = 1 \times 10^6$ cel/mL e velocidade de agitação de 100 rpm.

Através desta comparação pode-se verificar que a combinação de meios de cultura sem a adição de SFB é adequada para o cultivo de células Sf9 sem acarretar perdas quer para a densidade celular máxima quer para a velocidade específica máxima de crescimento, μ_{\max} , quando comparado ao cultivo em SF900 II, sem aeração. Deste modo, esta estratégia pode ser adotada nos experimentos de cultivo resultando em minimização do custo e eliminação do inconveniente da utilização de SFB, além do rendimento satisfatório.

5.2.7 Caracterização do metabolismo de carboidratos de células Sf9 nos diferentes meios e condições de cultivo.

Foram analisadas neste trabalho as concentrações de carboidratos para cada um dos experimentos de cultivo nos seguintes meios de cultura: SF900 II, combinação 1:1 SF900 II + TNM-FH com SFB e esta combinação na ausência de SFB. Os carboidratos analisados em

cada caso foram maltose e glicose e o comportamento observado pode ser expresso na Figura 5.19.

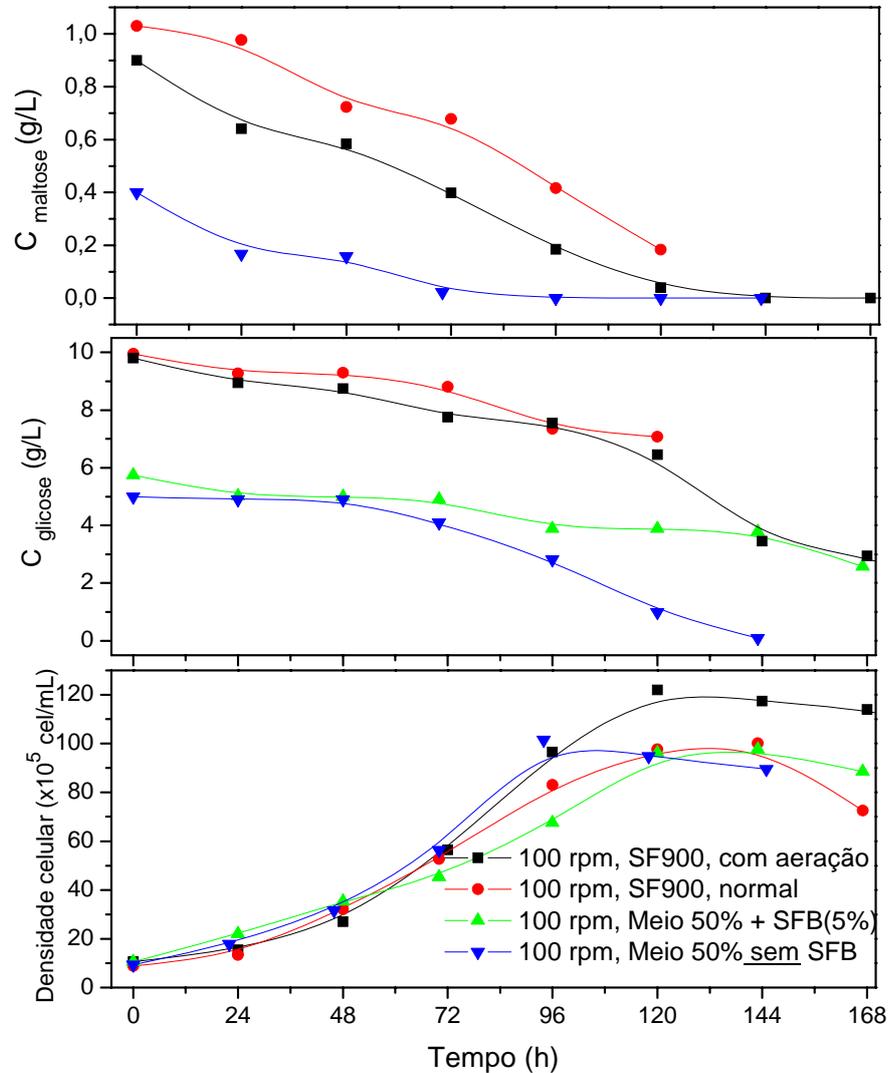


Figura 5.19: Consumo de glicose e maltose para células Sf9 cultivadas sob diferentes condições a 100 rpm e $C_0 = 1 \times 10^6$ cel/mL. Não foi possível quantificar maltose para um dos experimentos.

Na Figura acima se observa que o crescimento celular exponencial cessa em torno de 96 horas de cultivo. Neste momento, ocorre a inibição do crescimento celular por alguma limitação do cultivo. A partir das observações expressas no item 5.2.4 e Figura 5.15 que

demonstram que pode haver neste momento influência da escassez de oxigênio, procura-se averiguar também se há algum carboidrato relacionado a esta limitação. Neste sentido, pode ser notado o seguinte aspecto para o consumo de maltose e glicose, na Tabela 5.5:

Tabela 5.5: Resumo do consumo de glicose e maltose para cada experimento de cultivo.

Cultivo	C _{glicose} (g/L)		% consumo a 96 h	C _{maltose} (g/L)		% consumo a 96h
	C ₀	C _{96h}		C ₀	C _{96h}	
SF900 II, com aeração	9,8	6,45	34%	0,9	0,18	80%
SF900 II, Normal	9,95	7,0	30%	1,0	0,41	60%
Meio 50%, com SFB	5,74	3,8	34%	nd	nd	nd
Meio 50%, sem SFB	5,0	2,82	44	0,4	0,0	100%

(nd): não determinado.

Nota-se para todos os casos que o carboidrato glicose não pode ser o responsável pela limitação do crescimento uma vez que no fim do crescimento exponencial ainda está presente a altas concentrações, em torno de 60-70% do valor inicial. Este comportamento com relação ao consumo de glicose já foi observado várias vezes na literatura para meio SF900 II e para outros meios cujas concentrações iniciais de glicose são altas, sendo que mesmo após a infecção glicose não se torna substrato limitante (IKONOMOU, BASTIN e SCHNEIDER, 2001).

Até mesmo para cultivos em SF900 II em bioreator, o que permite maior crescimento celular, Radford e colaboradores, 1997, mostraram que no final da fase exponencial de crescimento a concentração de glicose estava em torno de 50% do valor inicial. Recentemente (2005), Marques realizou cultivos de Sf9 em SF900 II em bioreator de 2 litros e constatou no

final da fase exponencial de crescimento a concentração de glicose em torno de 70% do valor inicial. Com todas estas indicações, conclui-se que é possível utilizar a diluição do meio SF900 II com outro meio de cultura, no que diz respeito às concentrações mínimas de glicose, o que também foi observado na Figura 5.19 e Tabela 5.5.

Com relação ao carboidrato maltose (Figura 5.5) notou-se que no final do crescimento exponencial este substrato está presente a baixas concentrações, e exaurido no caso da combinação de meios. Pode-se prever que ele exerça influência sobre o crescimento ao verificar-se o seguinte: se o crescimento celular foi mais lento, o consumo de maltose também o foi (cultivo normal em SF900 II); quando as células cresceram até 120 horas, foi somente neste momento que maltose acabou (cultivo em SF900 II, com aeração); quando o cultivo entra em fase de morte a 96 horas, a concentração de maltose é zero (cultivo em Meio 50%, sem aeração).

Decidiu-se então por realizar experimentos de cultivo com adição de maltose, diluída em meio de cultura a fim de averiguar o comportamento do cultivo nestas condições. Foram realizados dois conjuntos de experimentos: adicionando-se 0,6 g/L de maltose, o que eleva a concentração de 1,0 para 1,6 g/L (no meio SF900 II) e de 0,5 para 1,1 g/L (no Meio 50%) e adicionando-se maltose até a concentração final de 2,0 g/L, para os dois meios. As curvas de crescimento e de variação dos carboidratos são exibidas nas Figura 5.20 e 5.21. Entretanto não foi possível determinar a concentração de maltose para o primeiro conjunto de experimentos.

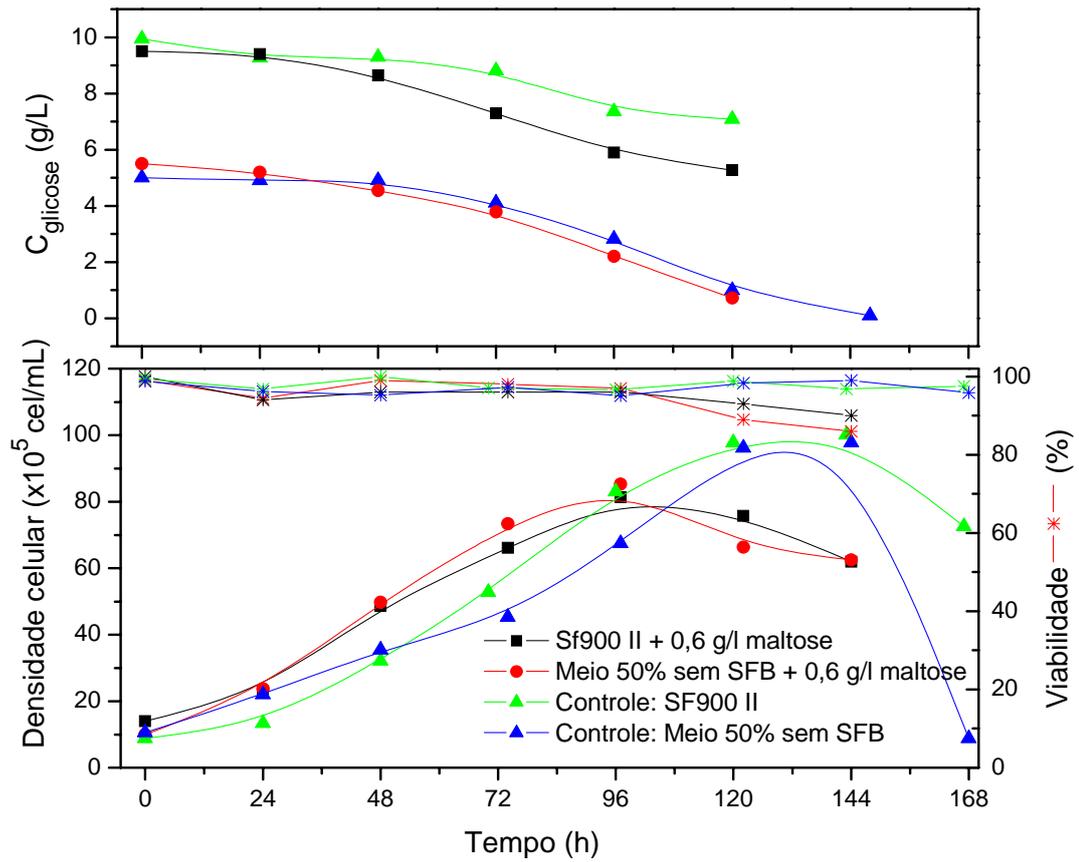


Figura 5.20: Cultivo de células Sf9 em diferentes meios de cultura: suplementados com 0,6 g/L de maltose e sem suplementação (controles). Condições: $C_0 = 1 \times 10^6 \text{ cel/mL}$, 100 rpm.

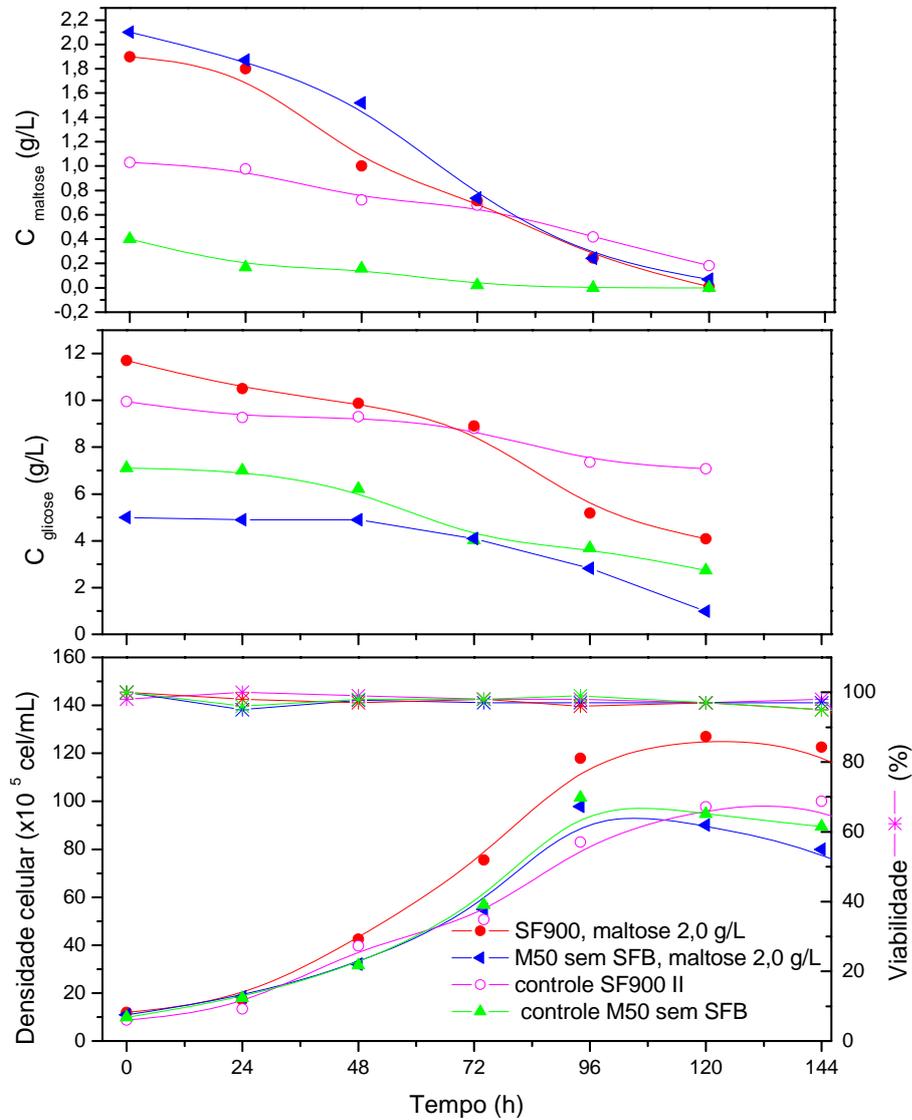


Figura 5.21: Cultivos de células Sf9 em meios suplementados com maltose ($C_{\text{final}} = 2,0$ g/L). Cultivos controle: sem suplementação. Condições: $C_0 = 1 \times 10^6$ cel/mL, 100 rpm.

Os efeitos da maltose sob o cultivo podem ser analisados sob dois aspectos cinéticos: densidade celular em cada tempo e velocidade específica de crescimento. A Tabela 5.6

resume as velocidades específicas máximas ($\mu_{\text{máx}}$) de experimentos mais relevantes para fins de comparação.

Tabela 5.6: Velocidades específicas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e Tempos de geração (t_g) para diferentes cultivos de células Sf9.

Condição	Meio SF900 II			Meio 50%sem SFB		
	$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$	R^2	$T_g(\text{h})$	$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$	R^2	$T_g(\text{h})$
Com aeração	0,0237	0,9946	29,2	-	-	-
Normal	0,0245	0,9916	28,23	0,0250	0,9992	28,1
Adição de 0,6 g/L de maltose	0,0219	0,9863	32,00	0,0272	0,9842	25,5
$C_{\text{final}} = 2,0 \text{ g/l}$ de maltose	0,0255	0,9929	27,25	0,0229	0,9987	30,2

Em termos de $\mu_{\text{máx}}$, observa-se pouca diferença entre um experimento e outro exceto para aqueles em que não ocorreu crescimento típico ($\mu_{\text{máx}} = 0,0219$ e $0,02292$). A diferença notada entre os cultivos diz respeito ao crescimento celular nos meios suplementados com maltose, onde se observa para o primeiro conjunto de experimentos (adição de 0,6 g/L de maltose) maior densidade celular em relação aos controles somente entre 24 e 72 horas. Tal como nos cultivos controle, o crescimento celular declina a 96 horas e inclusive, nos meios suplementados a densidade celular máxima é menor. Entretanto, como não foi possível determinar as concentrações de maltose ao longo do tempo, as conclusões para este experimento não são completas. Já para o caso de adição de maltose até concentração final de 2,0 g/L, observa-se maior crescimento celular em cada ponto e maior $C_{\text{máx}}$, ao mesmo tempo em que o a velocidade de consumo de maltose é maior (o que pode ser inferido do gráfico). Esta situação não é observada para o cultivo em meio 50% com a mesma adição de maltose, no qual ocorreu crescimento similar ao controle e baixa velocidade de consumo de maltose, em relação ao meio SF900 II suplementado.

Poucos trabalhos sobre metabolismo na literatura tratam a utilização de maltose por células Sf9, mas Radford, Reid e Greenfield (1997), observaram para meio SF900 II em bioreator a utilização de maltose por células Sf9 como fonte alternativa de glicose, sendo que no final da fase exponencial de crescimento este carboidrato estava praticamente exaurido. No presente trabalho observa-se também esta utilização de maltose e inclusive o melhor desempenho quando se adiciona maltose ao meio SF900 II.

Com relação ao carboidrato sacarose, presente no meio TNM-FH a 26,68 g/L, e portanto presente na combinação entre este meio e o SF900 II, não se realizou a avaliação do seu consumo neste trabalho por conhecer-se previamente na literatura que este carboidrato não é utilizado por células Sf9. Suas concentrações permanecem constantes ao longo do cultivo para o meio TNM-FH (MENDONÇA, PALOMAREZ e RAMIREZ,1999).

5.2.8 Metabolismo de aminoácidos

Dentre os trabalhos mais completos da literatura acerca do metabolismo de células Sf9 em meio SF900 II, deve-se destacar Radford, Reid e Greenfield (1997), que analisaram cada um dos aminoácidos para células Sf9 infectadas e não infectadas neste meio, observando que cisteína é o único aminoácido exaurido, para cultivo em bioreator, quando cessa o crescimento celular.

Baseado nestas observações, realizou-se neste trabalho a investigação acerca dos aminoácidos presentes nos cultivos em meio SF900 II, e são apresentados na Figura 5.22 aqueles que mais variaram para dois cultivos:

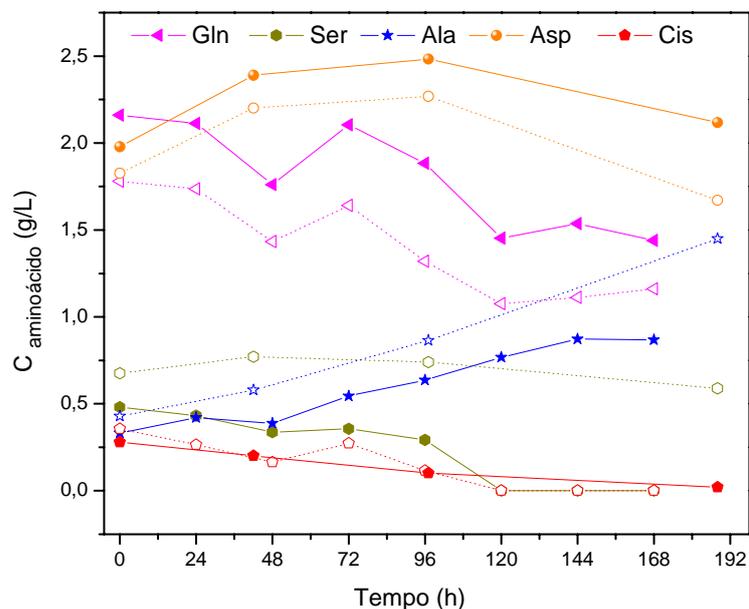


Figura 5.22: Aminoácidos que mais variaram para dois cultivos de células Sf9 em meio SF900 II, em condições similares.

Como pode ser observado nesta Figura, ocorreu a produção de alanina, típico de cultivos de células Sf9. Tal produção segue um mecanismo metabólico já caracterizado (Figura 3.4). Entretanto, não foi observada a participação de cisteína como aminoácido limitante do crescimento, pois a 96 horas de cultivo este aminoácido ainda está presente. Esta diferença em relação literatura pode ser devida ao fato de que, no presente trabalho os cultivos são realizados em frascos *Schott* e na literatura citada, usam-se bioreatores.

Foi analisada também a concentração de aminoácidos para um cultivo em combinação de meios de cultura, Meio 50%, com concentração final de 2,0 g/L de maltose (Figura 5.21) no qual a concentração inicial de alguns aminoácidos é reduzida (Tabela 5.4). Na Figura 5.23 pode-se verificar que o perfil da variação de aminoácidos é similar ao de cultivos em meio SF900 II e que o único aminoácido que fica a níveis muito baixos é a cisteína, que já começa com apenas 0,03 g/L e portanto não pode ser indicada como limitante.

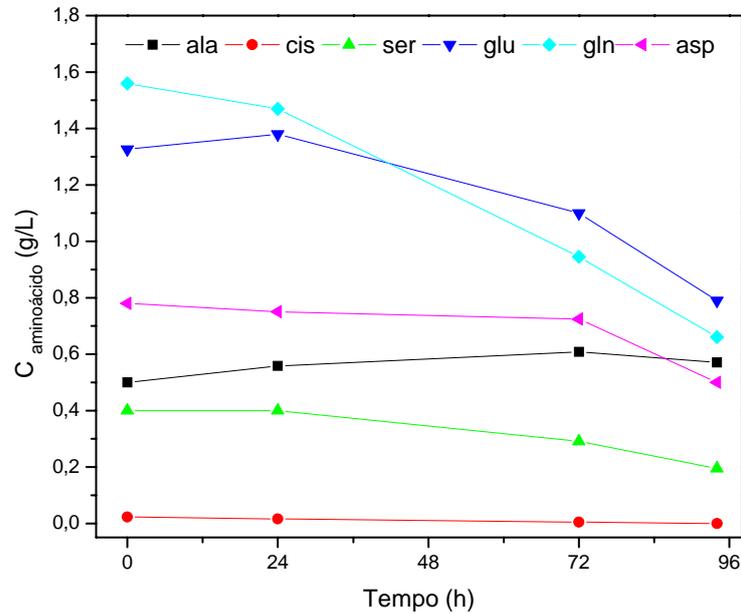


Figura 5.23: Variação dos principais aminoácidos para um cultivo em Meio 50% (2,0 g/L de maltose).

5.2.9 Sensibilidade de células Sf9 ao cisalhamento

Conforme descrito em Materiais e Métodos, cultivos de células Sf9 foram submetidos a velocidades de cisalhamento de 90, 180, 250 e 300 s^{-1} . A resposta das células foi registrada em termos de viabilidade teórica, resultado direto do método de exclusão por azul de tripan e viabilidade real, obtida pela relação entre densidade de células a cada tempo e densidade inicial. O comportamento para cada caso pode ser observado na Figura 5.24 onde nota-se que da menor à maior tensão de cisalhamento aplicada nos experimentos, as células apresentam sensibilidade considerável, com quedas de viabilidade de até 20%. Poderia esperar-se que com o aumento da tensão de cisalhamento a sensibilidade da célula também aumentasse, resultando em maior morte celular; entretanto este comportamento não foi observado. Similarmente, Mardikar e Niranjan (2000), em estudo com diferentes células em viscosímetro cilíndrico concêntrico observaram que a maioria das células apresentou morte

celular tanto a muito baixas como a muito altas tensões de cisalhamento, passando por um máximo de sobrevivência em torno de 10 N.m^{-2} .

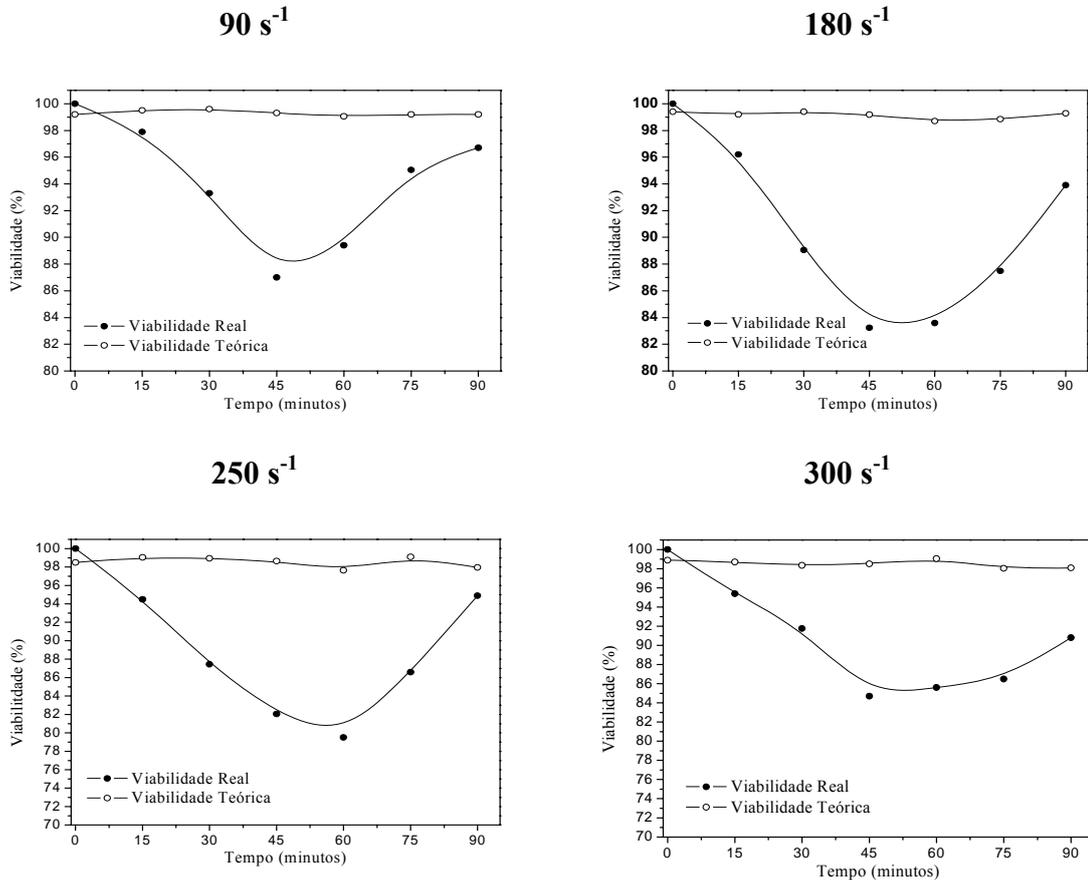


Figura 5.24: Viabilidade das células Sf9 após exposição a diferentes velocidades de cisalhamento, em meio SF900 II e 28°C . Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados apresentados são a média em cada caso.

Uma importante característica identificada nos experimentos é que para as condições de cisalhamento estudadas e apesar de as células Sf9 sofrerem morte celular, elas apresentam a capacidade de se adaptarem a novas condições de cultura (maiores tensões de cisalhamento) e inclusive apresentarem crescimento celular após um período de tempo. Este comportamento pode ser relacionado a características da membrana de células de inseto, provavelmente mais resistente do que células de mamíferos ao *stress* gerado por diferentes velocidades no fluido.

Esta característica pode ser importante no desenvolvimento do bioprocesso uma vez que denota uma boa adaptabilidade para culturas em suspensão em larga escala.

Além da resposta ao cisalhamento pôde-se verificar através destes experimentos que a viabilidade determinada diretamente por exclusão com azul de tripan não representa o real estado das células na cultura, nestas condições experimentais, uma vez que enquanto decresce a densidade de células viáveis, a viabilidade por azul de tripan permanece praticamente constante, em torno de 98%. Isto pode ser devido ao fato de ocorrer rápida lise celular nas condições de cisalhamento, o que não é detectado pelo corante que marca células mortas mas não desintegradas. Além disso, um fator de erro na utilização do método de exclusão com azul de tripan é que ele não marca células apoptóticas que muitas vezes são identificadas como vivas (não coradas) embora estejam ‘condenadas’ à morte posterior.

5.3 Experimentos de infecção de células Sf9 para expressão de Canacistatina

Uma vez produzido o baculovírus recombinante e caracterizadas as principais condições de cultivo de células Sf9 (velocidade de agitação, densidade de inóculo, duração da fase exponencial, melhor meio para o cultivo), foram conduzidos os experimentos de infecção para avaliação da infecção celular e da produção da Canacistatina, passando da escala de placa de poços (2 mL) para escala de *Schott* (20 mL ou 50 mL).

5.3.1 Ensaio preliminar de expressão em placas de poços

Este ensaio teve por finalidade verificar ao longo da infecção qual o melhor momento para coleta da proteína, ou seja, qual o momento de máxima produção. Para tanto se realizou uma infecção de 10^6 células Sf9 por poço (seis poços totais) em meio SF900 II e a $MOI= 5,0$

pfu/cel. Coletou-se o pellet de células com intervalos de 24 horas e analisou-se por SDS-PAGE e *Western Blotting*, que é apresentado na Figura 5.25:

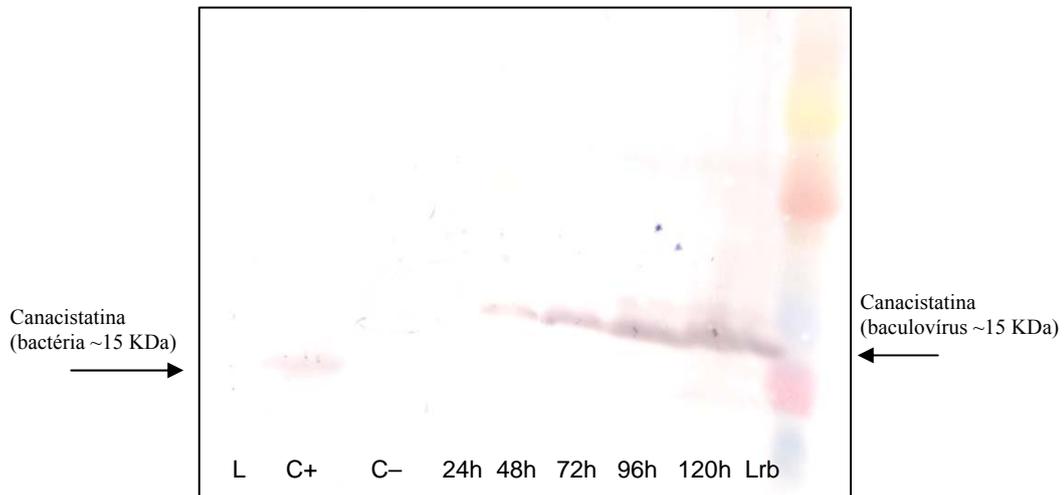


Figura 5.25: Análise por *Western Blotting* do ensaio de expressão de Canacistatina coletada em diferentes tempos p.i. (L): Ladder, (C+): Canacistatina purificada expressa em bactéria; (C-): Células Sf9; (24 a 120h): momentos de coleta do *pellet* infectado e (Lrb): Ladder.

Com esta análise observou-se que já em 24 horas pós-infecção (p.i.) pode-se encontrar Canacistatina, o que é coerente já que sob controle do promotor da poliedrina, a expressão tem início a partir de 24 horas, quando a proteína começa a ser identificada por SDS-PSGE. Com relação à máxima produção de proteína, espera-se para proteínas recombinantes secretadas produção máxima entre 30 e 72 horas e para proteínas não secretadas entre 48 e 96 horas (O'REILLY, MILLER e LUCKOW, 1994).

No caso da Canacistatina, não secretada, obteve-se máxima concentração a 96 e a 120 horas. Contudo, definiu-se para este trabalho o momento de coleta do pellet infectado a 96 horas p.i. a fim de se evitar possíveis degradações protéicas, que são resultantes da liberação de proteases pelas células que lisam, o que a 120 horas p.i. pode ser mais expressivo, devido à morte celular.

5.3.2 Infecção em frascos Schott e purificação da Canacistatina

Uma vez determinado o momento de coleta do pellet celular infectado realizou-se um experimento de expressão em escala de *Schott*, infectando 15 mL de cultivo a $1,5 \times 10^6$ cel/mL em SF900 II e MOI= 5 pfu/cel, em *Schott* de 150 mL. Coletou-se o pellet celular a 96 horas p.i. e realizou-se a purificação em coluna de níquel, cujo princípio da retenção da proteína é a afinidade entre a cauda de histidina que a proteína contém e o níquel na coluna.

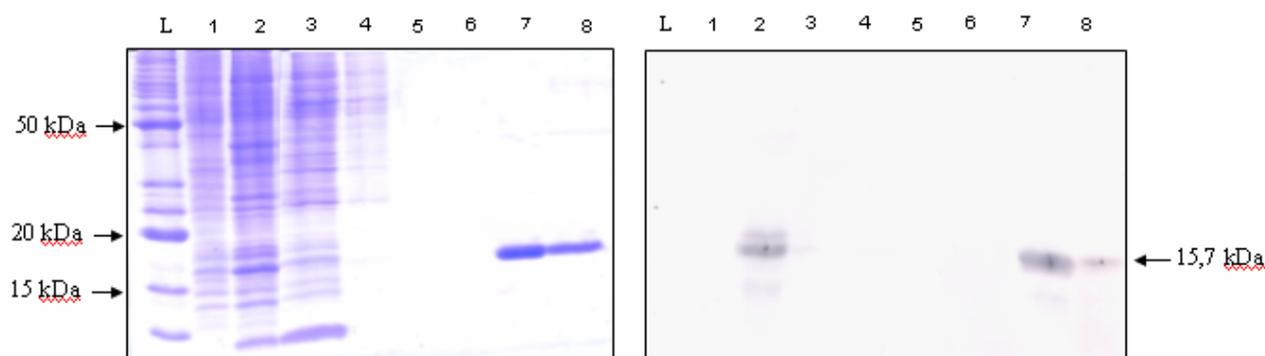


Figura 5.26: SDS-Page e Western Blotting da purificação de Canacistatina em coluna de níquel. L: Ladder; 1: Células Sf9 não infectadas; 2: Extrato celular de células Sf9 infectadas; 3: Sobrenadante eluído; 4 e 5: Frações 1e 2 do tampão de lavagem (imidazol 20 mM); 6, 7 e 8: Frações 1, 2 e 3 do tampão de eluição (imidazol 250 mM). SDS-PAGE 15% corado com Azul de Comassie.

Pôde-se definir através desta análise que a maior recuperação de Canacistatina no processo de purificação acontece na segunda e terceira eluição, cuja concentração de imidazol é de 250 mM. Destas, realizou-se a análise da concentração de proteína pelo método de Bradford e obteve-se o valor de 23 mg/L, nas condições de infecção adotadas (MOI= 5 pfu/cel, $C_{CCI} = 1,5 \times 10^6$ cel/mL). Neste ensaio preliminar não foram acompanhadas as variações de densidade celular, viabilidade e substratos ao longo do tempo, o que foi realizado em todos os ensaios posteriores.

5.3.3 Produção de Canacistatina em diversas condições de infecção

Realizaram-se experimentos de infecção de células Sf9 em meio SF900 II e Meio 50% com três valores de MOI: 1,0 , 5,0 e 10,0 pfu/cel, nas condições: 100 rpm de agitação, frascos *Schott* de 125 mL com 20 mL de volume de trabalho , acompanhando ao longo de 96 horas as variações de densidade celular, viabilidade e substratos (Figura 5.27).

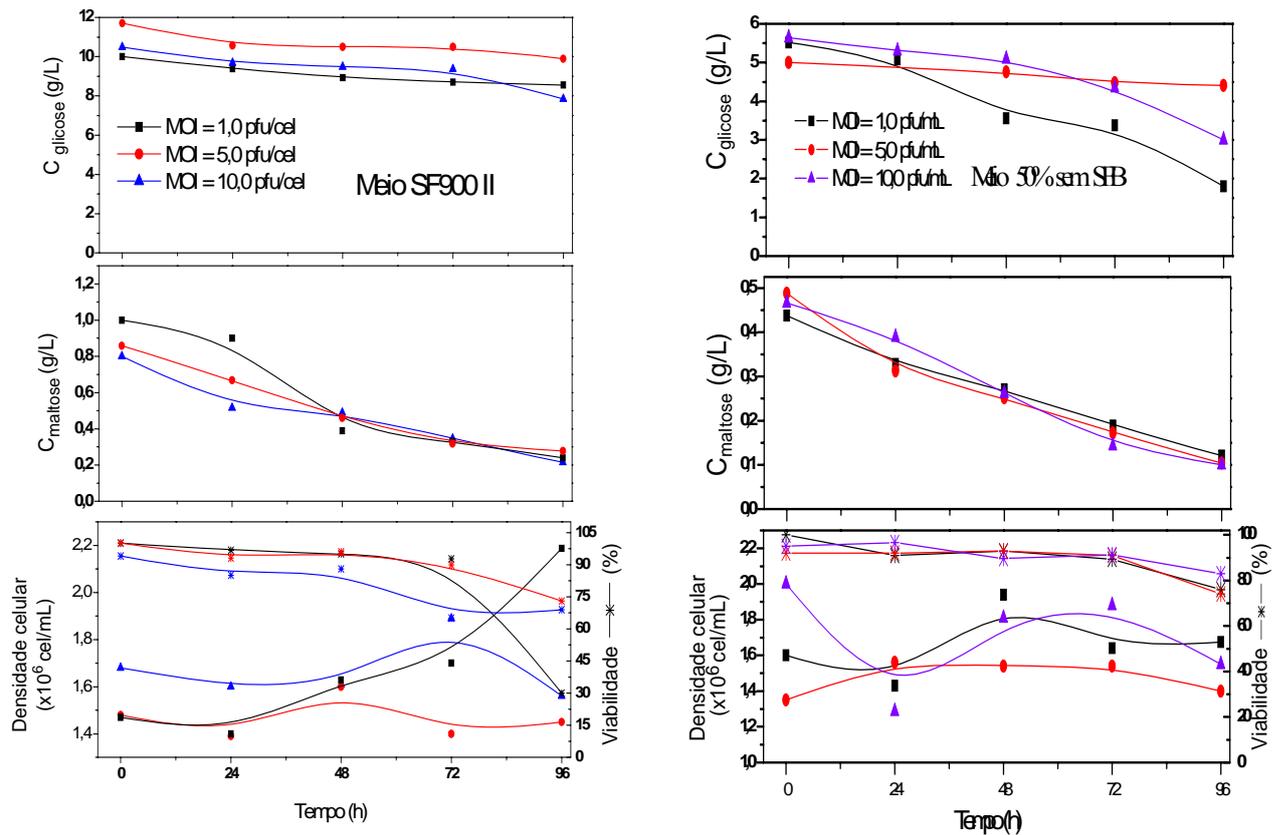


Figura 5.27: Infecção de células Sf9 com vAcCANA em dois meios de cultura e três valores de MOI.

Para os dois meios de cultura testados notou-se comportamento similar tanto na cinética da infecção como na utilização de substratos. Com relação à influência do MOI sobre a cinética da infecção celular observou-se que para estes valores, maiores que 1,0 pfu/cel, não ocorreu crescimento celular após a infecção. Uma infecção sincrônica impede o crescimento celular pois a maquinaria das células passa a priorizar a replicação viral e não

mais sintetizar suas próprias moléculas, o que seria necessário para crescimento celular. Na literatura, é indicado para uma infecção sincrônica MOI de pelo menos 5,0 pfu/cel (O'RELLY, MILLER e LUCKOW, 1994) onde cerca de 100% das células sejam infectadas por pelo menos uma partícula viral no momento inicial. Valores entre 10 e 20 pfu/cel asseguram, além de uma infecção sincrônica, que a replicação viral aconteça a altas velocidades.

No que diz respeito à glicose e maltose observou-se baixa utilização após a infecção, para os dois meios de cultura, sem ocorrência de escassez destes substratos inclusive para o meio com menor concentração (Meio 50%). Esta observação pode ser atribuída ao fato de não ocorrer replicação celular mas somente manutenção para síntese de partículas virais e de proteína recombinante. Foram analisadas também as concentrações de aminoácidos para dois experimentos de infecção, nos meios SF900 II e Meio 50% (Figura 5.28), nos quais se observou que não ocorre escassez de aminoácidos ao longo da infecção, com exceção de cisteína que já no início está presente a concentrações muito baixas. Entretanto, de acordo com os valores de produtividade de proteína recombinante obtidos (Tabela 5.7), pode-se dizer que não ocorre limitação nem mesmo pela ausência deste aminoácido.

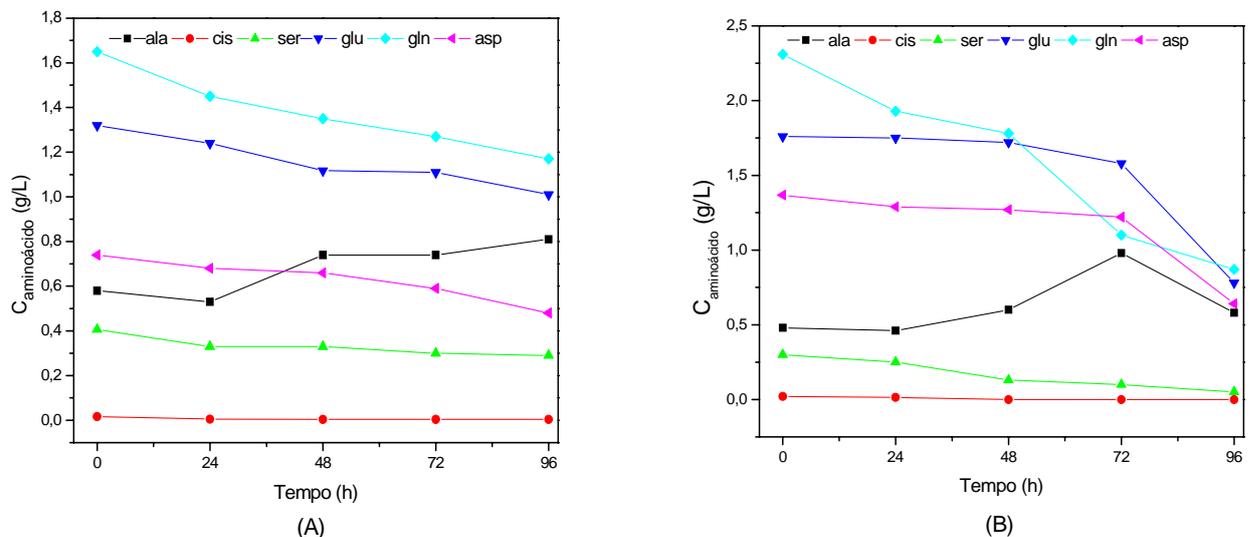


Figura 5.28: Variação de aminoácidos ao longo das infecções. (A): Meio 50% , MOI 10,0 pfu/cel; (B): Meio SF900 II, MOI 10,0 pfu/cel.

Contudo, o fator mais importante ao se comparar diferentes meios de cultura e MOIs é a produção da proteína recombinante. Para todos os experimentos de infecção realizados neste trabalho os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.7, onde se verificam também todas as variáveis importantes do processo de infecção e obtenção de proteína recombinante. Pode-se observar que a produtividade de Canacistatina foi maior ao se utilizar o Meio 50% (concentração 20 a 60% maior), o que pode estar relacionado a fatores nutricionais presentes no meio TNM-FH (utilizado na composição do Meio 50%) que estimulem a replicação viral ou mesmo a síntese protéica. Entretanto, ao se considerar cada meio de cultura isoladamente observa-se que a produtividade pode ser muito semelhante utilizando MOI 5 ou 10 pfu/cel (17,7 X 17,9 $\mu\text{g}/10^6\text{cel}$ em meio SF900 II e 28,6 X 25,8 $\mu\text{g}/10^6\text{cel}$ em meio 50%).

Tabela 5.7: Resumo das variáveis e resultados dos experimentos de infecção em dois meios de cultura e três valores de MOI.

Meio de cultura	MOI (pfu/cel)	Volume	C _{cel} Inicial (cel/mL)	C _{cel} a 96 h (cel/mL)	V _i (%)	V _f (%)	Cc (mg/L)	Pro Cc ($\mu\text{g}/10^6\text{cel}$)
SF900 II*	5,0	15 mL	1,5 x 10 ⁶	1,92 x 10 ⁶	98	87	23	12,0
SF900 II*	5,0	15 mL	1,5 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁶	100	92	23	17,7
SF900 II*	5,0	20 mL	2,0 x 10 ⁶	2,1 x 10 ⁶	98	90	25	11,9
SF900 II	1,0	25 mL	1,68 x 10 ⁶	1,56 x 10 ⁶	100	30	25	16,0
SF900 II	5,0	25 mL	1,47 x 10 ⁶	2,19 x 10 ⁶	94	69	23	10,5
SF900 II	10,0	25 mL	1,48 x 10 ⁶	1,45 x 10 ⁶	100	73	26	17,9
Meio50%	1,0	25 mL	1,6 x 10 ⁶	1,67 x 10 ⁶	100	76	33	19,8
Meio50%	5,0	25 mL	1,35 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁶	95	74	40	28,6
Meio50%	10,0	25 mL	2,0 x 10 ⁶	1,55 x 10 ⁶	95	83	40	25,8

(*): Para estes experimentos não foram construídas as curvas de crescimento C_{cel}: Densidade celular ; V_i e V_f: Viabilidades inicial e final; Cc: Canacistatina; Pro Cc: Produtividade de Canacistatina.

Comparando os valores de produtividade obtidos neste trabalho com os da literatura para infecção de células Sf9 com baculovírus recombinante (Tabela 5.8), pode-se dizer que a produção de Canacistatina foi muito satisfatória. Além disso, estes dados da literatura apontam para um importante fator: o tempo de coleta da proteína.

Tabela 5.8: Comparação entre a o rendimento da produção de Canacistatina e de outras proteínas recombinantes da literatura, expressas em condições semelhantes.

Condições da infecção	Concentração de proteína (mg/L)	Produtividade ($\mu\text{g}/10^6\text{cel}$)	Produtividade específica ($\mu\text{g}/10^6\text{cel.h}$)	Proteína/Referência
Sf9/ SF900 II	22	11	0,28	VP2/ Lecina <i>et al.</i> , 2006
CCI= $2 \cdot 10^6\text{cel}$				
MOI= 1,5				
T _{coleta} = 40 h				
Sf9/ Bioinsect I	10	3,3	0,083	rHAM ⁺ / Taylor <i>et al.</i> , 2006
CCI= $3 \cdot 10^6\text{cel}$				
MOI= 0,5				
T _{coleta} = 48 h				
Sf9/ SF900 II	18	12,8	0,184	VP2 / Hu <i>et al.</i> , 1999
CCI= $1,4 \cdot 10^6\text{cel}$				
MOI= 10				
T _{coleta} = 70 h				

Pelo tempo de coleta destas proteínas listadas na Tabela 5.8, que também são expressas sob o promotor da poliedrina, de máxima expressão entre 72 e 96 horas, fica claro a questão da degradação protéica pela ação de proteases liberadas pela lise celular. No caso da proteína rHAM⁺, por exemplo, a produção em alta concentração se deu previamente a MOIs altos, entre 15 e 30, e a 96 horas (TAYLOR *et al.*, 2006) Entretanto, nestas condições houve grande degradação da proteína, motivo pelo qual o tempo de coleta foi reduzido para 48 horas, quando ainda havia alta viabilidade celular e utilizou-se baixo MOI de 0,5 pfu/cel

(Tabela 5.8). Conseqüentemente obteve-se um menor rendimento, entre 4 e 10 mg/L. Este efeito também foi observado para a proteína VP2 (Hu *et al.*) tanto em meio SF900 II como em Ex-Cell 401 (JHR Biosciences) para alto MOI (10), cuja concentração diminui acima de aproximadamente 70 horas, proveniente de degradação por proteases liberadas na lise celular.

Já a Canacistatina não apresentou este problema e foi coletada em 96 horas sendo que, de acordo com o ensaio de expressão, poderia ser coletada também em 120 horas. Isto é coerente pelo fato de as proteínas cistatinas serem inibidoras de proteases, especificamente cisteínoproteases, que são largamente presentes no processo de infecção celular juntamente com carboxylproteases, em torno de 48 horas pós-infecção (GOTOH, MOCHIZUKI e KIKUCHI, 2001).

5.4 Considerações finais: produção de Canacistatina em célula de inseto X bactéria.

A produção de Canacistatina em célula de inseto neste trabalho (entre 23 e 40 mg/L) é pelo menos duas vezes maior que aquela observada anteriormente em bactéria, de acordo com Soares-Costa (2002) que descreveu a obtenção de 10 mg/L de Canacistatina para cultivos em *shaker*. Apesar disto, sabe-se que a produção em células de inseto envolve técnicas mais difíceis, com custo e tempo maiores do que a produção em bactéria e que comparações entre os dois sistemas de expressão só seriam possíveis averiguando-se detalhadamente as características da proteína produzida em cada um dos dois sistemas a fim de se avaliar se o sistema eucariótico resulta em vantagens que compensem sua utilização.

Entretanto, o presente trabalho não se propôs à comparação destes dois sistemas para a produção de Canacistatina mas utilizou esta proteína como modelo de estudo do processo biotecnológico de produção de proteínas recombinantes por células Sf9/ baculovírus. Por outro lado, a construção do baculovírus recombinante para a produção desta proteína,

inibidora de cisteínoproteases, gera a possibilidade de estudo da atividade deste baculovírus *In Vivo*, em pesquisas de controle de pragas utilizando infecção com baculovírus, o que se sugere como trabalhos futuros.

6. CONCLUSÕES

A primeira e maior parte deste trabalho envolveu experimentos de cultivo de células Sf9 em pequena escala, em frascos *Schott* de 100 mL com volume de trabalho de 20 mL. Para estas condições foi possível caracterizar o cultivo de células Sf9 nos seguintes aspectos:

1. O meio TNM-FH, embora de baixo custo e grande utilização para cultivos estáticos de células Sf9 (em frascos T), não é adequado para cultivos em suspensão pois promove baixo crescimento celular, provavelmente devido à sua baixa concentração de nutrientes em relação a outros meios de cultura.
2. Células Sf9 crescem bem em meio SF900 II, mas podem ser cultivadas utilizando uma combinação entre os meios de cultura SF900 II e TNM-FH, nas proporções de 1:1, sem qualquer prejuízo em termos de densidade máxima celular alcançada ou velocidade específica máxima de crescimento, $\mu_{\text{máx}}$. Além disto, embora o meio TNM-FH seja sempre utilizado acrescido de Soro Fetal Bovino (SFB), é possível utilizar a combinação de meios na ausência total deste aditivo. Com estas alternativas reduz-se consideravelmente o custo do meio de cultura além de eliminarem-se os problemas relacionados ao uso de SFB.
3. Para cultivos em frascos *Schott* agitados, a velocidade de agitação de 100 rpm é adequada para promover crescimento celular satisfatório.
4. O oxigênio pode ser considerado limitante para cultivos em frascos *Schott* agitados, o que pode ser minimizado com a utilização de sistema de aeração adaptado aos frascos para o caso onde se pretende maior $X_{\text{máx}}$ o que não se aplica a $\mu_{\text{máx}}$.

5. A utilização de uma densidade de inóculo de 1×10^6 cel/mL e cerca de 20% de meio condicionado, propicia um crescimento otimizado onde se obtém em menor tempo a densidade ideal de células para realizar a infecção viral.
6. O carboidrato glicose não é o substrato limitante em nenhum dos meios de cultura utilizados, mas maltose é totalmente consumido até o final da fase exponencial de crescimento, para os cultivos em meio SF900 II. Apesar disto, quando se utiliza a combinação de meios de cultura, na qual a concentração inicial de maltose é metade daquela em SF900 II, o crescimento celular é praticamente o mesmo. Isto indica que embora células Sf9 consumam maltose preferencialmente este substrato não pode ser considerado limitante.
7. Com relação a aminoácidos não foram identificados, nas condições de trabalho adotadas, aminoácidos que exerçam papel de limitação no cultivo de células Sf9 e por isso não se indica qualquer suplementação
8. Através dos estudos de sensibilidade ao cisalhamento percebeu-se que células Sf9 apresentam alta sensibilidade, mostrando quedas de viabilidade de até 20% para valores altos de cisalhamento. Entretanto, apresentam uma capacidade de adaptação a estas condições estressantes o que foi notado pelo crescimento celular a partir de um determinado tempo de exposição. Esta informação é importante especialmente para cultivos em bioreator onde o problema de cisalhamento é mais considerável do que para frascos agitados.

Para os experimentos de infecção de células Sf9 com baculovírus recombinante vAcCANA (para expressão de Canacistatina) foi possível caracterizar os seguintes aspectos:

1. O melhor momento para a purificação da Canacistatina do pellet celular é de 96 horas pós-infecção.
2. Para os valores de MOI testados recomenda-se a utilização de MOI= 5,0 pfu/cel, cujos rendimentos de proteína foram reprodutivos. Os melhores resultados obtidos neste trabalho indicam para a utilização de Meio 50%, com MOI = 5,0 pfu/cel.
3. Os rendimentos de Canacistatina (entre 23 e 40 mg/L) nas diferentes condições de infecção são considerados altos quando comparado a rendimento de proteínas expressas por este mesmo sistema, na literatura.
4. Comparando-se os rendimentos de proteína recombinante no meio SF900 II e no meio diluído, Meio 50%, conclui-se que não há limitações na produção de proteína relacionadas à disponibilidade de nutrientes. Assim, recomenda-se a utilização do Meio 50% como alternativa de redução de custo sem prejuízos à produtividade.
5. Para a identificação de células infectadas deve-se recorrer aos aspectos morfológicos, que não são tão evidentes como no uso de baculovírus com poliedros, mas deve-se identificar a hipertrofia do núcleo celular e aumento do tamanho das células.
6. O diâmetro celular após a infecção pode ser usado como parâmetro de identificação do processo de infecção, comparado ao diâmetro de células não infectadas, já que células Sf9 apresentam formato esférico. Isto pode ser uma indicação da sincronia da infecção, onde se a maior parte da população de células foi infectada ao mesmo tempo seria observado nos resultados um desvio padrão menor.

7. SUGESTÕES

Como continuidade deste trabalho sugere-se, com relação aos estudos de características cinéticas e fisiológicas de células de inseto Sf9, a realização de cultivos em biorreator testando-se a combinação de meios de cultura testada neste trabalho, com a finalidade de verificar a aplicação deste meio em escalas maiores e a possibilidade de suplementação.

Com respeito à proteína Canacistatina sugere-se sua co-expressão, pelo mesmo sistema célula de inseto/baculovírus, com proteínas mais susceptíveis à ação de proteases a fim de se verificar sua atividade de inibição de proteases e neste caso a proteção da proteína de interesse. Além disso, poderia ser estudado seu efeito antiapoptótico com base na existência deste efeito para outras cistatinas.

Outro aspecto interessante a ser estudado seria a função da Canacistatina *In Vivo* através da infecção de lagartas (*Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens* ou lagartas que atacam a cana-de-açúcar) a fim de se avaliar a possível utilização do baculovírus recombinante no controle de pragas.

8. REFERÊNCIAS

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

AKHNOUKH, R.; KRETZMER, G. and SCHUGERL, K. On-line monitoring and control of *Spodoptera frugiperda* Sf9 insect cells and β -galactosidase production by *Autographa californica* virus vector. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, p. 220-228, 1996.

ARANTES, M. K. Identificação de fatores metabólicos chaves de células S2 visando a realização de cultivos com alta produtividade celular. São Carlos: UFSCar/ Depto. De Engenharia Química. Relatório de Iniciação Científica, 2004.

BARNETT, B.B. Insect Cell Culture Technology. *Art Sci*, 17, p. 1-7, 1998.

BATISTA, F.R.X. Desenvolvimento de meio de cultura para células de inseto e avaliação do potencial de replicação de baculovírus. Dissertação de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos – Faculdade de Engenharia Química, Unicamp, Campinas, Dezembro de 2003.

BENSLIMANE, C. *et al.* Insights into the central metabolism of *Spodoptera frugiperda* and *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 insect cells by radiolabing studies. *Biotechnology Progress*, v. 21, p.78-86, 2005.

CHAN, C. L. L. *et al.* Production of the baculovirus-expressed dengue virus glycoprotein NS1 can be improved dramatically with optimised regimes for fed-batch cultures and the addition of the insect moulting hormone, 20-Hidroxyecdysone. *Journal of Virological Methods*, v. 105, p. 87-98, 2002.

CRUZ, P.E. *et al.* Optimization of the production of virus-like particles in insect cells. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 60, p. 408–418, 1998.

DEE, K. U.; SHULER, M.L. Optimization of an Assay for Baculovirus titer na Design of Regiments forthe Synchronous Infection of Insect Cells. *Biotechnology Progress*, v. 13, p.14-24, 1997.

DOVERSKOOG, M.; HAN, L.; HAGGSTROM, L. Cysteine metabolism in cultured Sf9 cells: influence of cell physiology on biosynthesis, amino acid uptake and growth. *Cytotechnology*, v. 26, p. 91-102, 1998.

DOVERSKOOG, M. *et al.* Cell cycle progression in serum-free cultures od Sf9 insect cells: modulation by conditioned medium factors and implications for proliferation and productivity. *Biotechnology Progress*, v. 16, p. 837-846, 2000.

DOYLE, A.; GRIFFITHS, J. B. *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*. New York: JhonWilley and Sons, 1998.

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

GOOSEN, M.F.; DAUGULIS, A.J. *Insect cell culture engineering*. Marcel Dekker, 1993.

GOTOH ,T.; MOCHIZUKI,G.; KIKUCHI , K.-I. Perfluorocarbon-mediated aeration applied to recombinant protein production by virus-infected insect cells. *Biochemical Engineering Journal*, v. 7, p 69–78, 2001.

GOTOH, T.; CHIBA, K.; KIKUCHI, K-I. Probabilistic characterization for baculovirus – infected cells destined to syntethize progeny virus and recombinant protein and to die. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, v. 37, n°11, p. 1357-1366, 2004.

HU, Y. C.; BENTLEY, W. E. A kinetic and statistical-thermodynamic model for baculovirus infection and virus-like particle assembly in suspended insect cells. *Chemical Engineering Science*, v. 55, Issue 19, p. 3991-4008, 2000.

IKONOMOU, I.; BASTIN, Y.J.; SCHNEIDER, S.N. Design of an efficient medium for insect cell growth and recombinant protein production. *In Vitro Cell Development Biology Animal*, v. 37, p. 549-559, 2001.

JARVIS, D.L. *et al.* Use of early baculovirus promoters for continuous expression and efficient processing of foreign gene products in stably-transformed lepidopteran insect cells. *Bio-Technology*, v. 8, p. 50-55, 1990.

JOYCE, K.A. *et al.* Synthesis of functional GABA-A receptors in stable insect cell lines. *FEBS Letters*, v. 335, p. 61-64, 1993.

LECINA, M. *et al.* Application of on-line OUR measurements to detect acitons points to improve baculovirus-insect cell cultures in bioreactors. *Journal of Biotechnoloy*, v.125, p. 385-394, 2006.

LLOYD, D. R. *et al.* Relationship between cell size, cell cycle and specific recombinant protein productivity. *Cytotechnology*, v. 34, p. 59, 2000.

MARDIKAR, S.H.; NIRANJAN, K. Observations on the shear damage to different animal cells in a concentric cylinder viscometer. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 68, p. 697, 2000.

MARANGA, L. *et al.* Production of core and virus-like particles with baculovirus infected insect cells. *Advanced Biochemical Engeeniring and Biotechnology*, v. 74, p.183-206, 2002.

MARANGA, L. *et al.* Scale-up of virus-like particles production: effects of sparging, agitation and bioreactor scale-up on all growth, infection kinetics and productivity. *Journal of Biotechnology*, v. 107, p. 55-64, 2004.

MARQUES, F.H. Influencia do oxigênio dissolvido na produção de poliedros de baculovírus por células de inseto em bioreator. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Instituto de Engenharia Química, USP, Sao Paulo, 2005.

MARTEIJN, R.C.L. *et al.* Effect of low inoculation density in the scale-up of insect cell cultures. *Biotechnology Progress*, v. 16, p. 795-799, 2000.

MASSOTE, D., FLEIG, U.; PALME, K. Purification and characterization of an auxin-binding protein from *Arabidopsis thaliana* expressed in baculovirus-infected insect cells. *Protein Expression and Purification*, v. 6, p. 220-227, 1995.

MEIJ, P. *et al.* Production monitoring and purification of EBV encoded latent membrane protein 1 expressed and secreted by recombinant baculovirus infected insect cells. *Journal of Virological Methods*, v. 90, 193-204, 2000.

MENDONÇA, R.Z.; PALMARES, L.A.; RAMIREZ, O.T. An insight into insect cell metabolism through selective nutrient manipulation. *Journal of Biotechnology*, v. 72, p. 61-75, 1999.

MENESES-ACOSTA, A. *et al.* Comparative characterization of cell death between Sf9 insect cells and hybridoma cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 72, p. 441-457, 2001.

MONTOR, W.R.; SOGAYAR, M. C. Insetos como biofábricas de proteínas humanas. *Ciência Hoje*, v. 33, p. 16-23, 2003.

OLEZAK, M.; OLEZAK, T. Expression and purification of active plant diphosphonucleotide phosphatase/phosphodiesterase from baculovirus-infected insect cells. *Protein Expression and Purification*, v. 39, p. 116-123, 2005.

OLIVA, M.L.V. *et al.* Inhibitory selectivity of canecystatin: a recombinant cysteine peptidase inhibitor from sugarcane. *Biochemical and Biophysical Communication*, v. 320, p.1082-1086, 2004.

OLIVEIRA, A.S.; XAVIER-FILHO, J.; SALES, M.P. Cysteine Proteinases and Cystatines. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 46, p. 91-104, 2003.

O'REILLY, D.R.; MILLER, L.K. and LUCKOW, V.A. Baculovirus Expression Vectors: A laboratory manual. New York: *Oxford University Press*, 1994.

PALOMARES, L.A.; PEDROZA, J.C. and RAMIREZ, O.T. Cell size as a tool predice the production of recombinant protein by baculovirus expression system. *Biotechnology Letters*,. 23, p. 359-364, 2001.

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

RADFORD, K.M.; REID, S.; GREENFIELD P.F. Substrate limitation in the baculovirus expression vector system. *Biotechnology and Bioengineering*, v.56, nº1, Oct, 1997.

RHIEL, M.; MITCHELL-LOEGEAN, C. M.; MURHAMMER, D. W. Comparison of *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (High five) and *Spodoptera frugiperda* Sf9 insect cell line metabolism in suspension cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 55, p. 909-920, 1997.

SHAH, K. *et al.* Expression of the *Daucus carota* somatic embryogenesis receptor kinase (DcSERK) protein in insect cells. *Biochimie*, v. 83, p. 415-421, 2001.

SCOTT, R.I.; BLANCHARD; J.H. FERGUSON, C.H.R. Effects of oxygen on recombinant protein production by suspension cultures of Sf-9 insect cells. *Enzyme Microbiology and Technology*, v.14 , p.798–804, 1992.

SOARES-COSTA, A. *et al.* A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 296, p.1194–1199, 2002.

SOLOMON, M. *et al.* The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *The Plant Cell*, v. 11, p. 431-443, 1999.

TAYLOR, A. *et al.* High yield of biologically active recombinant human amelogenin using the baculovirus expression system. *Protein Expression and Purification*, v. 45, p 43-53, 2006.

TRAMPER J.; WILLIAMS,J.B.; JOUSTRA, D. Shear sensitivity of insect cells in suspension. *Enzyme Microbiology and Technology*, v. 8, p.33–36, 1986.

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

YAMAJI, H. *et al.* Production of protein kinase C- δ by the baculovirus-insect cell system in serum-supplemented and serum-free medium. *Journal of Bioscience and Biotechnology*, v. 95, p. 185-187, 2003.

YU-CHEN HU; BENTLEY, W. Enhancing yield of infection bursal disease virus structural proteins in baculovirus expression Systems: focus on media, protease inhibitors and dissolved oxygen. *Biotechnology Progress*, v. 125, p.1065-1071. 1999.

WANG, L.Y. *et al.* Kinetic analysis of alkaline protease activity, recombinant protein production and metabolites for infected insect (Sf9) cells under different DO levels. *Journal of Biotechnology*, v. 46, p. 243-254, 1996.

WANG, M. Y.; SIMON, K.; BENTLEY, W.E. Effects of oxygen/glucose/glutamine feeding on insect cell baculovirus protein expression: a study of epoxide hidrolase production. *Biotechnology Progress*, v. 9, p. 355-361.

WU, SUH-CHIN; DALE, B.E.; LIAO, J.C. Kinetic characterization of baculovirus-induced cell death in insect cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 41, p. 104-110.

ZHANG, Y. H.; ENDEN, G.; MERCHUK, J.C. Insect cells-baculovirus system: factors affecting growth and low MOI infection. *Biochemical engineering Journal*, v.27, p. 8-16, 2005.

ZEIZER, A. *et al.* On-line monitoring of physiological parameters of insect cell cultures during the growth and infection process. *Biotechnology Progress*, v. 16, p. 803-808.

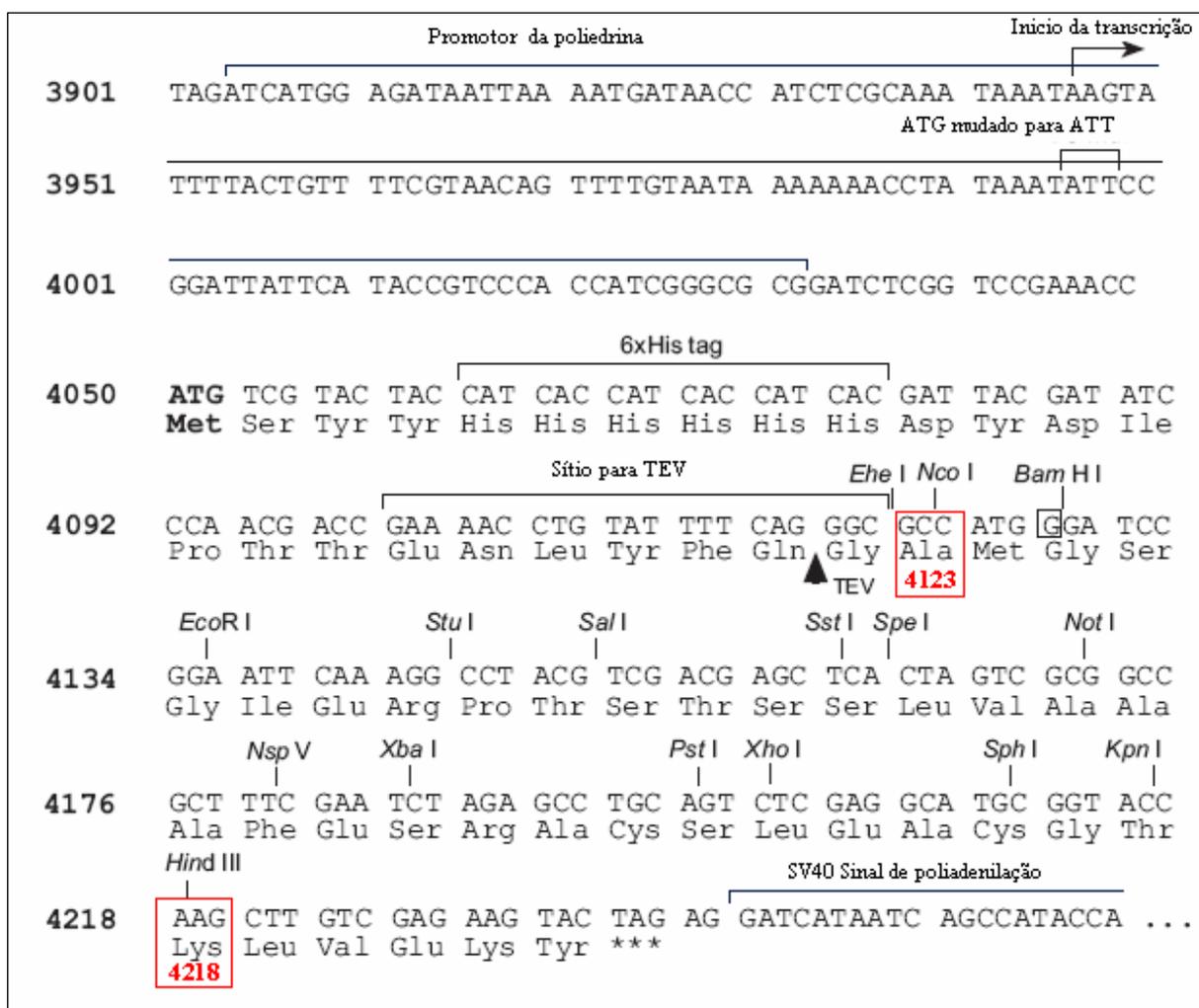
Invitrogen: *Bac-to-Bac Baculovirus Expression System*. An efficient site-specific transposition system to generate baculovirus for high-level expression of recombinant proteins. Version D, 6 April 2004. Catalog nº 10359.

QIAGEN: *The QIAexpressionist*. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. Fifth Edition, June 2003.

Defesa Reforçada: Revista Fapesp, Edição 83, p. 1-2, Janeiro de 2003. Disponível em <http://www.revistapesquisa.fapesp.br/?art=2027&bd=1&pg=1&lg> Consultado em 01/2007

APÊNDICE A

Seqüência da região de múltipla clonagem do vetor de expressão pFastBac HTB.

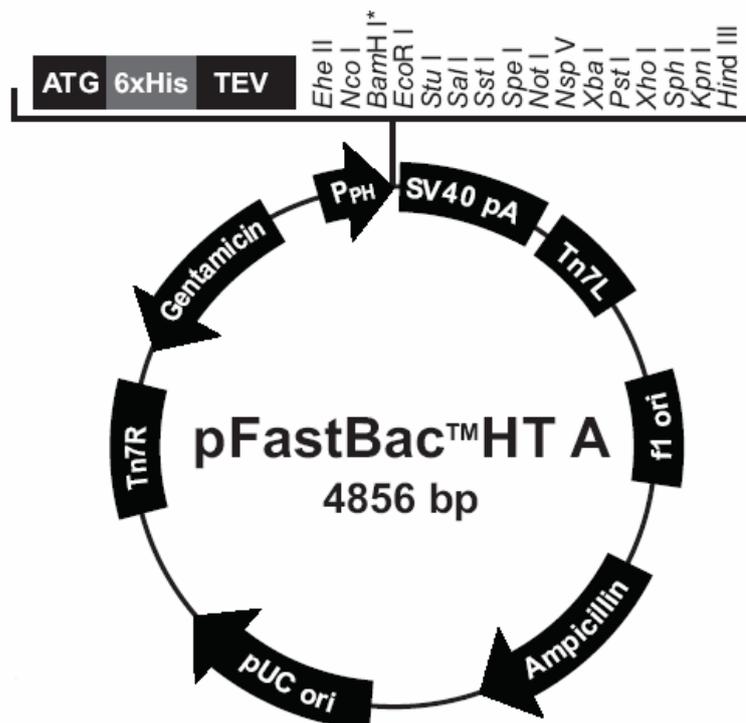


Fonte: Protocolo Bac-to-Bac *Baculovirus Expression System*, 2004 (Invitrogen).

APÊNDICE B

Mapa e descrição do vetor de expressão pFastBac HTA (Manual Bac-to-Bac *Baculovirus Expression System*, 2004, Invitrogen).

O pFast HTB difere do HTA em 1pb, e corresponde à segunda ORF.



Origem f1: bases 2-457

Gene de resistência a ampicilina: bases 589-1449

Origem pUC: bases 1594-2267

Tn7R: bases 2511-2735

Gene de resistência a gentamicina: bases 2802-3335

Promotor da poliedrina (P_{PH}): bases 3904-4032

Iniciação ATG: bases 4050-4052

6xHis tag: bases 4062-4079

Sítio TEV: bases 4101-4121

Sítio de múltipla clonagem: bases 4119-4222

Sinal de poliadenilação SV40: bases 4240-4480

Tn7L: bases 4509-4674.

Fonte: Protocolo Bac-to-Bac *Baculovirus Expression System*, 2004 (Invitrogen).

APÊNDICE C

As planilhas C1 a C15 correspondem aos valores utilizados na construção de cada um dos gráficos de crescimento celular X tempo, viabilidade celular X tempo e concentração de carboidratos e aminoácidos X tempo.

C1. Dados correspondentes à Figura 5.12.

Tempo em horas (t), densidade celular x 10⁵ cel/mL (c) e viabilidade celular % (v).

t[X]	c1[Y]	v1[Y]	c2[Y]	v2[Y]	c3[Y]	v3[Y]
0	3,42	98	7,27	98	3,11	98
24	6,23	99	11,77	97	5,61	98
42	8,769	99	17,87	95	7,9	97
66	12,5	98	26,42	94	11,3	96
90	23,64	97	37,29	96	21,3	97
120	31,97	96	41,74	93	28,8	95
142	35,36	97	34,2	97	31,9	97
166	37,5	96			33,8	94
191	2,41	90			21,8	92

C2. Dados correspondentes à Figura 5.13.

Tempo em horas (t), densidade celular x 10⁵ cel/mL (c) e Viabilidade Celular % (v).

t1[X1]	c1[Y1]	t2[X2]	c2[Y2]	t3[X3]	c3[Y3]	t4[X4]	c4[Y4]	v1[Y4]	v2[Y4]	v3[Y4]	v4[Y4]
0	5,64	0	8,83	0	9,84	0	6,61	99,4	98,9	99,5	97,8
18	5,99	24	13,4	24	18,2	18	12,7	96,8	97,9	99,2	98,9
42	13	48	39,7	48	34,8	42	19,43	100	94,9	98,8	98,1
73	31,4	70	50,7	70	70	73	36,7	97,1	96,6	99	97,7
97	42,8	96	83	96	98,7	97	45	96,6	94,3	95	93,6
121	89,2	120	97,7	120	112	121	59,5	98,8	97,7	98	98,4
147	85,5	143	100,1	143	83	147	94,9	96,8	97	98	97,7
164	66,7	167	72,5	167	75,7	164	72,9	97,5	93,6	96,1	96,4
188	66					188	62,9	95			94,3

C3. Dados correspondentes à Figura 5.14.

Tempo em horas (t), densidade celular x 10⁵ cel/mL (c) e viabilidade celular % (v).

t1[X1]	c1[Y1]	v1[Y1]	t2[X2]	c2[Y2]	v2[Y2]
0	10,67	99,6	0	8,83	99,4
24	15,54	95	24	13,4	96,8
48	27	97,3	48	32,1	100
72	56,4	96,7	70	52,7	97,1
96	96,57	97,2	96	83	96,6
120	122	95,1	120	97,7	98,8
144	117,4	97	143	100,1	96,8
168	114	94	167	72,5	95
192	105,5	89			
216	89,3	89			

C4. Dados correspondentes à Figura 5.15.

Tempo em horas (t) e concentração de lactato em g/L (lac).

t1[X1]	lac1[Y1]	t2[X2]	lac2[Y2]	t3[X3]	lac3[Y3]	t4[X4]	lac4[Y4]	t5[X5]	lac5[Y5]	t6[X6]	lac6[Y6]	t7[X7]	lac7[Y7]
0	0,072	0	0,0801	0	0,0603	0	0,0612	24	0,20565	0	0,1242		
42	0	24	0,072	24	0	24	0	48	0,1494	24	0,1865		
66	0,153	43	0	43	0	48	0	72	0,3294	48	0,1986		
97	0,1827	61	0,144	61	0	70	0	96	0,21015	72	0,2146		
129	0,423	85	0,0414	85	0	96	0	120	0,28035	96	0,2184		
147	0,45	109	0,459	109	0,324	120	0	144	0,477	120	0,152		
164	0,36			133	0	143	0	168	0,5265	144	0,1		
						167			0,423				

C5. Dados correspondentes à Figura 5.16.

Tempo em horas (t), densidade celular x 10⁶ cel/mL (c) e viabilidade celular % (v).

t1et4[X1]	c1[Y1]	t2et3[X2]	c2[Y2]	c3[Y2]	c4[Y2]	v1[Y2]	v2[Y2]	v3[Y2]	v4[Y2]
0	1,06	0	0,883	1,04	0,984	98,7	99,4	98,6	98,9
24	2,2	24	1,34	2,31	1,82	96,2	96,8	97	97,9
40	3,54	48	3,21	2,88	3,12	95,2	100	96	94,9
48	4,53	70	5,27	4,6	3,48	97,2	97,1	99	96,6
70	6,75	96	8,3	7,2	7	95	96,6	96,3	94,3
96	9,62	120	9,77	7,69	9,87	98,3	98,8	98,9	97,7
120	9,77	143	10,01	9	11,2	99	96,8	96	97
143	8,85	167	7,25	7,7	8,3	95,8	97,5	91	93,6
167	8,12				7,57	92			92

C6. Dados correspondentes à Figura 5.17.

Tempo em horas (t), densidade celular x 10⁶ cel/mL (c) e viabilidade celular % (v).

t1et3[X1]	t2[X2]	c1[Y2]	c3[Y2]	c2[Y2]	via1[Y2]	via2[Y2]	via3[Y2]
0	0	0,9375	1,121	1,03	97,3	99,6	97,9
22	24	1,788	1,7	1,688	93	93	94,8
46	48	3,162	3,787	3,044	96	95,6	95,4
70	72	5,638	6,283	5,467	97,1	96,2	97,9
94	98	10,15	10,14	9,988	90	99	93
118	117	9,475	9,114	10,06	96	97,8	95
145	140	8,95	7,1	7,4	92	80	87

C7. Dados correspondentes à Figura 5.18.

Tempo em horas (t), densidade celular x 10⁵ cel/mL (c) e viabilidade % (v).

t1[X1]	c1[Y1]	t2et3[X2]	c2[Y2]	c3[Y2]	t4[X3]	c4[Y3]	v1[Y3]	v2[Y3]	v3[Y3]	v4[Y3]
0	10,67	0	8,83	9,84	0	9,375	99,6	99,4	98,7	99,6
24	15,54	24	13,4	18,2	22	17,88	95	96,8	96,2	93
48	27	48	32,1	34,8	46	31,62	97,3	100	95,2	95,6
72	56,4	70	52,7	70	70	56,38	96,7	97,1	97,2	96,2
96	96,57	96	83	98,7	94	101,5	97,2	96,6	95	99
120	122	120	97,7	112	118	94,75	95,1	98,8	98,3	97,8
144	117,4	143	100,1	83	145	89,5	97	96,8	99	90
168	114	167	72,5	75,7			94	95	95,8	

C8. Dados correspondentes à Figura 5.19.

Tempo em horas (t), densidade celular x 10⁵ cel/mL (c), concentração de glicose em g/L (gli) e de maltose em g/L (ma).

t1[X1]	c1[Y1]	t2et3[X2]	c2[Y2]	c3[Y2]	t4[X3]	c4[Y3]	gli2[X]	ma2[Y]	gli3[Y]	ma1[Y]	gli1[Y]	gli4[Y]
0	10,67	0	8,83	10,6	0	9,375	9,95	1,03	5,74	0,9	9,8	5
24	15,54	24	13,4	22	22	17,88	9,27	0,977	5,02	0,641	8,95	4,9
48	27	48	32,1	35,4	46	31,62	9,3	0,723	5	0,583	8,75	4,9
72	56,4	70	52,7	45,3	70	56,38	8,81	0,678	4,9	0,398	7,75	4,1
96	96,57	96	83	67,5	94	101,5	7,35	0,416	3,88	0,1844	7,55	2,82
120	122	120	97,7	96,2	118	94,75	7,08	0,183	3,88	0,039	6,45	0,986
144	117,4	143	100,1	97,7	145	89,5			3,78	0	3,45	0,09
168	114	167	72,5	88,5					2,57	0	2,95	

C9. Dados correspondentes à Figura 5.20.

Tempo em horas (t), densidade celular x 10⁶ cel/mL (c) e concentração de glicose em g/L (gli).

t[X1]	c1[Y1]	c2[Y1]	t3et4[X2]	c3[Y2]	c4[Y2]	gli1[Y]	gli2[Y]	gli3[Y]	gli4[Y]
0	1,4	1	0	0,883	1,06	9,5	5,5	9,95	5
24	2,3	2,37	24	1,34	2,2	9,41	5,2	9,27	4,9
48	4,862	4,97	48	3,21	3,54	8,642	4,55	9,3	4,9
74	6,614	7,34	70	5,27	4,53	7,3	3,789	8,81	4,1
97	8,13	8,525	96	8,3	6,75	5,896	2,2	7,35	2,82
122	7,58	6,634	120	9,77	9,62	5,27	0,712	7,08	0,986
144	6,2	6,25	143	10,01	9,77				0,09
	-	-	167	7,25	8,85				

C10. Dados correspondentes à Figura 5.21.

Tempo em horas (t), densidade celular x 10⁶ cel/mL (c).

t[X]	c1[Y]	c2[Y]	v1[Y]	v2[Y]	c3[Y]	c5[Y]	v3[Y]	v4[Y]
0	1,19	1,1	98	100	0,883	0,987	100	100
24	1,71	1,84	100	95	1,34	1,788	98	96
48	4,25	3,2	99	97,8	3,97	3,162	97	98
74	7,55	5,5	98	97	5,07	5,68	98	98
94	11,8	9,78	98	97	8,3	10,15	96	99
120	12,7	9	97	97	9,77	9,47	97	97
144	12,26	8	98	97	10,01	8,95	95	95
168	9,05	5,5	66	90	7,25		85	93

Concentração de glicose em g/L (gli) e de maltose em g/L (ma).

gli1[Y]	gli2[Y]	gli3[Y]	gli4[Y]	ma1[Y]	ma2[Y]	ma3[Y]	ma4[Y]
11,7	7,1	9,95	5	1,9	2,1	1,03	0,4
10,5	7	9,27	4,9	1,8	1,87	0,977	0,168
9,879	6,22	9,3	4,9	1	1,52	0,723	0,158
8,91	4,02	8,81	4,1	0,714	0,737	0,678	0,022
5,18	3,68	7,35	2,82	0,245	0,243	0,416	0
4,08	2,74	7,08	0,986	0,008	0,069	0,183	0
			0,09				0

C11. Dados correspondentes à Figura 5.22.

Tempo em horas (t), concentração de aminoácidos em g/L (asp, ala, ser, gln, cis).

t[X]	asp1[Y]	gln[Y]	ser1[Y]	ala1[Y]	cis1[Y]	t2[Y]	asp2[Y]	gln2[Y]	ser2[Y]	ala2[Y]	cis2[Y]
0	1,78	2,16	0,48	0,332	0,356	0	1,9789	1,8253	0,6755	0,4277	0,28
24	1,736	2,112	0,432	0,42	0,264	42	2,3888	2,2017	0,7715	0,5783	0,2
48	1,432	1,76	0,336	0,388	0,164	97	2,4829	2,269	0,7391	0,8643	0,1
72	1,64	2,104	0,356	0,544	0,272	188	2,118	1,6703	0,5881	1,4491	0,0211
96	1,32	1,884	0,292	0,636	0,116						
120	1,076	1,452	0	0,768	0						
144	1,112	1,536	0	0,872	0						
168	1,16	1,44	0	0,868	0						

C12. Dados correspondentes à Figura 5.23.

Tempo em horas (t), concentração de aminoácidos em g/L (asp, ala, ser, glu, gln, cis).

t[X]	ala[Y]	cis[Y]	ser[Y]	glu[Y]	gln[Y]	asp[Y]
0	0,5	0,023	0,4	1,326	1,56	0,78
24	0,558	0,0153	0,4	1,38	1,47	0,75
72	0,608	0,0044	0,29	1,1	0,945	0,724
94	0,57	0	0,195	0,79	0,66	0,5

C13. Dados correspondentes à Figura 5.27 (infecção em SF900 II).Tempo em horas (t), densidade celular x 10⁶ cel/mL (c), concentração de glicose e maltose em g/L (gli e mal).

t[X]	c1[Y]	c10[Y]	v1[Y]	v10[Y]	c5[Y]	v5[Y]	mal1[Y]	mal5[Y]	mal10[Y]	gli5[Y]	gli1[Y]	gli10[Y]
0	1,68	1,48	100	100	1,47	94	0,8	1	0,858	10	10,48	11,7
24	1,6	1,39	96,7	93	1,399	85	0,516	0,9	0,668	9,38	9,678	10,56
48	1,61	1,6	95	96	1,629	88	0,488	0,39	0,46	8,93	9,482	10,5
72	1,89	1,4	92,7	89,9	1,7	65	0,345	0,33	0,318	8,7	9,352	10,5
96	1,56	1,45	30	73	2,187	69	0,215	0,24	0,278	8,553	7,85	9,9

C14. Dados correspondentes à Figura 5.27 (infecção em Meio 50%).Tempo em horas (t), densidade celular x 10⁶ cel/mL (c), concentração de glicose e maltose em g/L (gli e ma/m).

t[X]	c1[Y]	c5[Y]	c10[Y]	v1[Y]	v5[Y]	v10[Y]	mal1[Y]	m5[Y]	m10[Y]	gli1[Y]	gli5[Y]	gli10[Y]
0	1,6	1,35	2	100	92	95	0,438	0,488	0,466	5,52	5	5,64
24	1,43	1,56	1,286	91	92	96,7	0,328	0,312	0,389	5,08	-	5,3
48	1,94	1,54	1,81	93	93	89,7	0,271	0,252	0,262	3,56	4,76	5,09
72	1,64	1,54	1,88	89,3	91	91,3	0,189	0,172	0,143	3,38	4,48	4,35
96	1,675	1,4	1,55	76	74	83	0,121	0,104	0,1	1,8	4,41	3

C15. Dados correspondentes à Figura 5.28 A (1) e 5.28 B (2):

Tempo em horas (t), concentração de aminoácidos em g/L (ala, cis, ser, glu, gln, asp).

t(X)	ala1(Y)	cis1(Y)	ser1(Y)	glu1(Y)	gln1(Y)	asp1(Y)	ala2(Y)	cis2(Y)	ser2(Y)	glu2(Y)	gln2(Y)	asp2(Y)
0	0,58	0,016	0,406	1,32	1,65	0,74	0,48	0,02	0,3	1,76	2,31	1,367
24	0,53	0,0045	0,33	1,24	1,45	0,68	0,46	0,015	0,25	1,75	1,93	1,29
48	0,74	0,004	0,33	1,117	1,35	0,66	0,6	0	0,13	1,72	1,78	1,27
72	0,74	0,004	0,3	1,11	1,27	0,59	0,98	0	0,1	1,58	1,1	1,22
96	0,81	0,004	0,29	1,01	1,17	0,48	0,58	0	0,05	0,78	0,87	0,64