



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

Dissertação de Mestrado

Estudo de parâmetros cinéticos do sistema comercial Bac-to-Bac[®] para produção de proteínas recombinantes

Aluna: Thaís Portantiolo Corrêa

Orientadores:

Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça

Dr. Claudio Alberto Torres Suazo

SÃO CARLOS - SP

2011



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

“Estudo de parâmetros cinéticos do sistema comercial Bac-to-Bac[®] para produção de proteínas recombinantes”

Thaís Portantiolo Corrêa

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.

Orientadores:

Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça

Dr. Claudio Alberto Torres Suazo

SÃO CARLOS - SP

2011

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

C824ep

Corrêa, Thaís Portantiolo.

Estudo de parâmetros cinéticos do sistema comercial Bac-to-Bac[®] para produção de proteínas recombinantes / Thaís Portantiolo Corrêa. -- São Carlos : UFSCar, 2011. 60 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Bioquímica. 2. Baculovírus. 3. Células de inseto. 4. Proteínas recombinantes. 5. Apoptose. I. Título.

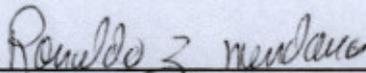
CDD: 574.192 (20^a)

Thais Portantiolo Corrêa

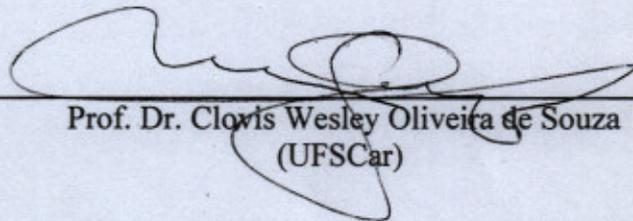
Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 31/08/2011

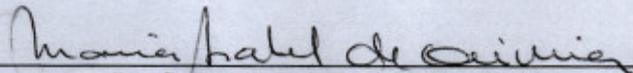
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça (Orientador)
(Butantã)



Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza
(UFSCar)



Prof.^a Dr.^a Maria Isabel de Oliveira
(Inst. Adolfo Lutz)

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, pela sua misericórdia e graça.

Aos meus pais Inivaldo e Graça por investirem e acreditarem no meu futuro.

Ao meu esposo Maurilio pelo companheirismo, dedicação e amor.

Ao meu irmão Guilherme, e os irmãos que Deus me presenteou Ana Paula e Gustavo pelo apoio constante.

Aos professores, Dr. Cláudio Alberto Torres Suazo e Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça, pela orientação, aprendizado e oportunidade de aprofundar meus conhecimentos na área de Cultivo de Células.

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

A Ana Carolina Viegas do Carmo pela grande colaboração, apoio e amizade nessa caminhada.

As amigas Esmeralda e Thaís que sempre me encorajaram e compreenderam minha ausência em certos momentos.

Aos irmãos do grupo de oração e ao pastor da Igreja Metodista pelo apoio e sustentação na fé cristã.

Ao colega Camilo Calderón Riquelme pela ajuda e treinamento no laboratório.

As amigas do laboratório, Amanda, Thaila, Marlei, por toda colaboração e pela ótima convivência.

RESUMO

O sistema de expressão de proteínas recombinantes em células de inseto/baculovírus (BEVS) foi descrito e introduzido em 1983, e desde então tornou-se uma ferramenta poderosa para a produção de proteínas recombinantes de interesse biotecnológico. O objetivo deste trabalho foi estudar os parâmetros cinéticos do sistema Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expression (Invitrogen[™]) utilizado para a produção de proteínas recombinantes, avaliando os padrões de crescimento e consumo de nutrientes de células de inseto Sf-9 infectadas com este bacmídeo comercial e determinando o efeito do inoculo viral. Para isso células Sf-9 foram cultivadas a 29°C em frascos T contendo 5 mL de meio SF-900 II, ou em frascos Schott com volume de trabalho de 15 mL e agitação orbital a 90 rpm. Células UFLAG-286 também foram testadas a 29°C em meio TC-100 suplementado com 10% de soro fetal bovino. Os baculovírus utilizados foram o *Autographa californica* nuclear polyhedrosis vírus (AcMNPV), como modelo de infecção de baculovírus selvagem, o bacmídeo extraído da bactéria DH10Bac[™] e transposto com o vetor de transferência vazio (pFastBac[™]1), chamado de Bac sprec e o bacmídeo recombinante AcMNPV-GUS com a sequência codificante do gene β -glucuronidase, utilizado como um padrão para experimentos de transposição e transfecção. As células foram infectadas em diferentes momentos (TOI), seja na fase inicial, na fase exponencial ou fase estacionária do crescimento celular e com diferentes multiplicidades de infecção (MOI) (0,01; 0,1; 1 e 10). Observou-se que o MOI não influencia a replicação viral, pois mesmo com baixo MOI o crescimento celular foi inibido. Já o TOI teve influência na produção de proteínas totais da célula, sendo que a infecção no início da fase exponencial foi que obteve maior número de proteínas totais. A suplementação do cultivo de Bac sprec com serina e glutamina não levou a uma maior produção viral. O sobrenadante de cultivos infectados com o Bac sprec foi capaz de inibir a morte celular onde houve indução de apoptose por terbutil, indicando conter alguma proteína com atividade antiapoptótica. Este efeito não foi observado com o baculovírus selvagem.

ABSTRACT

The expression system of recombinant proteins in insect cells/baculovirus (BEVS) was described and introduced in 1983 and since then has become a powerful tool for the production of recombinant proteins of biotechnological interest. This work studied the kinetics of Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expression System (Invitrogen[™]) used for the production of recombinant proteins, evaluating growth patterns and consumption of nutrients from Sf-9 insect cells infected with this commercial bacmid and determining the effect of viral inoculum. For this, Sf-9 cells grew at 29°C in T flasks containing 5 mL of SF-900 II medium or Schott bottles with working volume of 15 mL and orbital shaking at 90 rpm. UFLAG-286 cells were also tested at 29°C in TC-100 medium supplemented with 10% bovine fetal serum. The baculovirus used were the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) as a wild baculovirus infection model, the bacmid extracted from DH10Bac[™] bacteria and transposed with the transfer vector empty (pFastBac[™]1), called Bac sprec and the bacmid recombinant AcNPV with the GUS coding sequence of the gene β -glucuronidase, used as a standard for transposition experiments and transfection. Cells were infected at different times (TOI), on the initial phase, the exponential phase or stationary phase of cell growth, and with different multiplicities of infection (MOI) (0.01, 0.1, 1 and 10). It was observed that the MOI does not influence the viral replication, because even with the low MOI the cell growth was completely inhibited. TOI had already affected the production of total cell proteins, and infection in the early exponential phase was that obtained the highest number of total proteins. The supplementation of the cultivation with Bac sprec with serine and glutamine did not lead to increased viral production. The supernatant of cultures infected with Bac sprec was able to inhibit cell death where there was induction of apoptosis by terbutyl, indicating contain some protein with anti-apoptotic activity. This effect was not observed on wild baculovirus.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Geração do bacmídeo recombinante conforme manual Bac-to-Bac [®]	7
Figura 2. Diagrama das partículas virais do baculovírus..	8
Figura 3. Células Sf-9 normais e infectadas com baculovírus selvagem.	8
Figura 4. Esquema do ciclo da infecção do baculovírus selvagem no inseto.....	10
Figura 5. Esquema do ciclo da infecção do baculovírus recombinante.	11
Figura 6. Vetor pFastBac [™] 1.	12
Figura 7. Foto ilustrando células coradas com laranja de acridina e brometo de etídeo.....	19
Figura 8. Eletroforese confirmando sequência para o bacmídeo Bac sprec.....	26
Figura 9. Eletroforese e confirmando a presença do DNA.	27
Figura 10. Eletromicrografia mostrando bacmídeo em cultivo de célula Sf-9 transfectada. ...	28
Figura 11. Título do baculovírus Bac sprec.....	29
Figura 12. Fotomicrografia de células UFLAG e células Sf-9 normais ou infectadas.	30
Figura 13. Fotomicrografia de células Sf-9 infectadas nos dias 4, 6 e 8 após a infecção.....	31
Figura 14. Perfil cromatográfico de cultivos infectados e controles.....	33
Figura 15. Cultivo de células Sf-9 infectadas ou não com Bac sprec	34
Figura 16. Células Sf-9 infectadas com diferentes MOI de baculovírus selvagem.....	35
Figura 17. Células Sf-9 infectadas com diferentes MOI de baculovírus Bac sprec	36
Figura 18. Células Sf-9 infectadas com baculovírus selvagem nos dias 1, 2 e 4.	37
Figura 19. Células Sf-9 infectadas com Bac sprec no dia 3 e no dia 5	38
Figura 20. Viabilidade de células Sf-9 infectadas com Bac sprec.....	38
Figura 21. Proteínas totais no sobrenadante de células Sf-9 infectadas com Bac sprec.	39
Figura 22. Células Sf-9 infectadas com Bac sprec e adição de serina e glutamina.	41
Figura 23. Consumo e produção de aminoácidos de células Sf-9 infectadas com Bac sprec. .	42
Figura 24. Cultivo de células Sf-9 infectadas com Bac sprec (P6), GUS e vírus selvagem. ...	44
Figura 25. Título de baculovírus Bac sprec (P6), GUS e baculovírus selvagem.....	45
Figura 26. Células Sf-9 normais em presença de hemolinfa total e Bac sprec.....	46
Figura 27. Células Sf-9 em diferentes quantidades de indutor de apoptose (terbutil).	46
Figura 28. Efeito do baculovírus Bac sprec em células Sf-9 com indução de apoptose por terbutil.....	47
Figura 29. Fotomicrografia de Sf-9 infectadas com características morfológicas distintas.....	48
Figura 30. Fotomicrografia CONFOCAL de Sf-9 infectadas com características morfológicas distintas.....	49

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Produtos terapêuticos aprovados produzidos por cultivo de células animais	3
Tabela 2. Tamanhos dos fragmentos de PCR	20
Tabela 3. Concentração de aminoácidos e açúcares em cultivos de células Sf-9.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcMNPV	<i>Autographa californica</i> Multiple Nuclear Polihedrosis Vírus
AgMNPV	<i>Anticarsia gemmatilis</i> Multiple Nuclear Polihedrosis Vírus
AcMNPV-rAPLO	<i>Autographa californica</i> Multiple Nuclear Polihedrosis Vírus com sequência recombinante da proteína antiapoptótica
AcMNPV-GUS	<i>Autographa californica</i> Multiple Nuclear Polihedrosis Vírus com sequência recombinante da proteína β -glucuronidase
AO	Laranja de acridina
APLO	Proteína antiapoptótica da lagarta <i>Lonomia obliqua</i>
ATP	Adenosina trifosfato
Bac GUS	<i>Autographa californica</i> Multiple Nuclear Polihedrosis Vírus com gene expressando a proteína GUS
Bac sprec	Bacmídeo comercial Bac-to-Bac [®] transposto com o vetor (pFastBac [™] 1) vazio
Bac W	Bacmídeo selvagem (AcMNPV)
Bcl-2	Grupo de genes de mamíferos que inibem apoptose
BEVS	Sistema Vetor de Expressão em Baculovírus
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> – Albumina de soro bovino
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EB	Brometo de etídeo
HPLC	<i>High Performanced Liquid Chromatograph</i>
HV-AM1	Linhagem celular derivada da lagarta <i>Heliothis virescens</i>
IAP	Gene inibidor de apoptose
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i> (multiplicidade de infecção)
OD	Oxigênio dissolvido
p.i.	Pós-infecção
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
p35	Proteína antiapoptótica do baculovírus
PFU	<i>Plaque Forming Unit</i> (unidades formadoras de placa; partículas infecciosas)
PMM	Permeabilização da membrana mitocondrial
PTPC	<i>Permeability transition pore complex</i>

rAPLO	Proteína antiapoptótica da lagarta <i>Lonomia obliqua</i> recombinante
rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
Sf-9	Células do ovário da pupa de <i>Spodoptera frugiperda</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
t-BHP	<i>Tert-butyl Hydrogen Peroxide</i>
TCID ₅₀ /mL	Maior diluição viral capaz de causar efeito citopático em 50% do tapete celular
TOI	<i>Time of infection</i> (momento de infecção)
UV	Radiação ultra violeta
UFLAG	Linhagem de células de <i>Anticarsia gemmatalis</i>
$\Delta\Psi_m$	Potencial eletroquímico da mitocôndria

CONTEÚDO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Cultivo de células e produção de proteínas recombinantes	2
2.1.1 Sistema de expressão de proteínas em células de inseto.....	3
2.1.2 Vantagens e desafios do uso do sistema de expressão em baculovírus	5
2.2 Baculovírus selvagem e recombinante	6
2.2.1 Infecção das células de inseto com o vírus selvagem.....	7
2.2.2 Infecção dos cultivos de células de inseto com o bacmídeo recombinante	10
2.3 Apoptose	12
2.3.1 Porque utilizar o sistema de expressão célula Sf-9/baculovírus para produzir uma proteína antiapoptótica?.....	15
3. OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo geral.....	16
3.2 Objetivos específicos.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Linhagem, meio e cultivo celular	16
4.2 Vírus e infecção.....	16
4.2.1 Baculovírus selvagem	16
4.2.2 Bacmídeo Bac Sprec	17
4.2.3 Baculovírus recombinante AcNPV-GUS.....	17
4.2.4 Infecção de células Sf-9 por Baculovírus.....	17
4.2.5 Definição de passagem viral ou passagem nos cultivos	17
4.3 Indutor químico de apoptose.....	18
4.3.1 Fluorocromos para determinação de morte celular	18
4.4 Procedimentos analíticos	19
4.4.1 Geração e isolamento dos bacmídeos	19
4.4.2 Transfecção em células de inseto	21
4.5. Análises dos cultivos de células infectadas com o bacmídeo recombinante	21
4.5.1 Amostragem	21
4.5.2 Análise dos bacmídeos por PCR após transfecção.....	21

4.5.3 Titulação viral.....	22
4.5.4 Concentração e viabilidade celular.....	22
4.5.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	23
4.5.6 Determinação de aminoácidos.....	23
4.5.7 Determinação de proteínas totais.....	23
4.5.8 Identificação de células apoptóticas utilizando corantes fluorescentes.....	24
4.5.9 Efeito do bacmídeo vazio (Bac sprec) no crescimento celular.....	24
4.5.10 Ação do bacmídeo vazio (Bac sprec).....	24
4.5.11 Microscopia eletrônica.....	25
4.5.12 Perfil cromatográfico do sobrenadante de cultivos infectados.....	25
4.6 Planejamento Experimental.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1 Análise e isolamento do bacmídeo.....	26
5.1.1 Análise do bacmídeo após transfecção.....	27
5.1.2 Transfecção dos baculovírus em célula de inseto.....	27
5.2 Determinação do efeito das passagens no título viral.....	28
5.3 Perfil cromatográfico do sobrenadante de cultivos infectados.....	32
5.4 Cinética de produção celular e consumo de nutrientes após infecção com o baculovírus vazio (Bac sprec).....	33
5.4.1 Diferentes Multiplicidades de Infecção (MOIs).....	34
5.4.2 Diferentes Tempos de Infecção (TOIs).....	36
5.5 Consumo de nutrientes e o efeito da concentração na infectividade viral.....	39
5.6 Ação de uma proteína antiapoptótica sobre a replicação do baculovírus.....	43
5.7 Investigação da ação antiapoptótica.....	45
5.8 Morfologia em cultivos estáticos infectados com Bac sprec.....	47
6. CONCLUSÕES.....	50
7. BIBLIOGRAFIA.....	51

1. INTRODUÇÃO

A tecnologia de cultivo de células animais tem uma ampla faixa de aplicações, como por exemplo, transplante de órgãos, terapias celulares e gênicas, toxicologia e fisiologia *in vitro*, produção de biopesticidas e nanobiotecnologia. O cultivo de células animais obteve um grande avanço nos últimos 20 anos, auxiliando em uma melhor compreensão do metabolismo e da fisiologia celular, o que resultou na produção de meios de cultura definidos, na eliminação de aditivos como Soro Fetal Bovino, na obtenção de novas linhagens celulares, em novos sistemas de expressão de proteínas recombinantes, e no aumento na produtividade específica dessas proteínas. Todos estes avanços contribuíram para a produção de biofármacos seguros e eficazes (Butler, 2005; Moraes, 2007).

Uma das aplicações práticas da biotecnologia é a expressão de genes exógenos em bactérias e leveduras ou mesmo em células animais através da tecnologia de DNA recombinante. Esta tecnologia tornou possível a obtenção de produtos terapêuticos em escala comercial como insulina, vacina contra hepatite B, hormônio de crescimento, ativador tissular do plasminogênio espécie-específico (tPA) e alfa-interferon (Alves, 2007; Kretzmer, 2002).

O sistema de expressão de proteínas recombinantes em células de inseto/baculovírus (BEVS) tornou-se uma ferramenta poderosa para a produção de proteínas recombinantes. Esse sistema tem sido amplamente utilizado para a produção de proteínas recombinantes complexas que precisam de modificações pós-traducionais para sua correta utilização terapêutica (Carpentier, 2001, Kost, 2005).

Para este sistema, as células Sf-9 são um bom suporte, e foi utilizada neste trabalho por ser uma célula bem estudada e possuir um excelente crescimento em suspensão especialmente em biorreatores, o que permite seu uso em bioprocessos de maior escala.

Um dos alvos do nosso grupo de pesquisa é a produção e otimização de uma proteína antiapoptótica recombinante (rAPLO), obtida da lagarta *Lonomia obliqua*, pelo sistema de expressão célula Sf-9/baculovírus (AcMNPV-rAPLO). A produção em maior escala desta proteína tem grande potencial de aplicação, seja na área médica, ou na área biotecnológica. A aplicação de proteínas indutoras ou inibidoras de apoptose é de grande importância em terapias contra doenças como o câncer e Alzheimer, onde o processo de apoptose tem um papel relevante na fisiopatologia das doenças degenerativas.

O processo de apoptose tem um papel central não só na área médica, como também na produtividade de processos biotecnológicos que envolvam cultivos celulares. Recentemente foi reportada por nosso grupo a ocorrência de morte celular por apoptose em cultivos de células de mamíferos e de insetos limitados de nutrientes (Menezes-Acosta, 2001; Mendonça, 2002) e a suplementação dessas culturas com a hemolinfa de *Lonomia obliqua* foi capaz de estender a viabilidade da cultura evitando a morte por apoptose (Maranga, 2003; Raffoul, 2005). Também foi demonstrado que tanto a hemolinfa bruta, como a proteína antiapoptótica purificada (APLO) inibiu a morte celular por apoptose provocada por limitação de nutrientes ou por agentes químicos em cultivos de células Sf-9 (Souza, 2005). A adição da APLO aos cultivos celulares poderia levar a uma proteção celular e a um prolongamento da viabilidade do cultivo, permitindo uma maior replicação viral, e um aumento na produção de proteínas recombinantes expressas pelo sistema Sf-9/baculovírus.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cultivo de células e produção de proteínas recombinantes

Na última década do século 19 deu-se início ao cultivo de células animais, com as primeiras tentativas de se manter pedaços de tecidos em plasma ou fluidos biológicos por vários dias ou semanas. A partir dessas tentativas grandes avanços foram alcançados, constituindo atualmente uma das áreas mais promissoras da biotecnologia, conhecida como tecnologia de cultivo de célula animal (Moraes, 2007).

Cerca de metade dos produtos biofarmacêuticos em fase de testes clínicos é produzida por esta tecnologia, e movimenta bilhões de dólares ao ano, com um crescimento acelerado proporcionando um impacto inumerável na saúde e na qualidade de vida da população mundial (Moraes, 2007; Chu, 2001). Segue abaixo a Tabela 1 que exemplifica alguns medicamentos aprovados e produzidos em células animais.

Tabela 1. Alguns exemplos de produtos terapêuticos aprovados produzidos por cultivo de células animais.*

Produto	Proteína	Indicação	Célula	Ano de Aprovação
Epogen®	Eritropoetina	Anemia	CHO	1989
Kogenate®	Fator VIII	Hemofilia A	BHK	1993
Gonal-f®	Hormônio folículo-estimulante	Infertilidade feminina	CHO	1995
Avonex®	Interferon- β	Esclerose múltipla	CHO	1996
BeneFIX®	Fator IX	Hemofilia B	CHO	1997
Herceptin® (trastuzumab)	Anticorpo monoclonal	Câncer de mama	CHO	1998
Simulect® (basiliximab)	Anticorpo monoclonal	Rejeição ajuda a transplante renal	Mieloma de rato	1998
Campath® (alemtuzumab)	Anticorpo monoclonal humanizado	Leucemia	CHO	2001
Xolair® (omalizumab)	Anticorpo monoclonal humanizado	Asma	CHO	2003
Avastin® (bevacizumab)	Anticorpo monoclonal humanizado	Carcinoma de colo ou reto	CHO	2004

*Retirado de Moraes, 2007.

A primeira proteína terapêutica humana licenciada utilizando a tecnologia de DNA recombinante foi a insulina em 1982 produzida em larga escala em bactérias *Escherichia coli*, que apresenta crescimento mais rápido comparado com o de células animais. Porém, devido à inviabilidade de expressão de proteínas complexas nas bactérias, o cultivo e expressão em células animais tornaram-se uma alternativa interessante para suprir esta carência das células bacterianas (Butler, 2005).

2.1.1 Sistema de expressão de proteínas em células de inseto

As células de mamíferos são utilizadas para a expressão de proteínas recombinantes, porém, o alto custo do processo devido à baixa produtividade, a utilização de meios de cultura complexos e a baixa resistência a metabólitos tóxicos, muitas vezes faz com que a utilização dessas células seja desvantajosa (Moraes, 2007).

Uma alternativa é a utilização do sistema de expressão de proteínas recombinantes em células de inseto/baculovírus (BEVS) que foi descrito e introduzido em 1983 e desde então, é

utilizado para a produção de proteínas recombinantes de interesse biomédico ou tecnológico (Smith^a, 1983). Esse sistema tem sido utilizado para a produção de proteínas recombinantes complexas que precisam de modificações pós-traducionais (Carpentier, 2001; Kost, 2005).

Um dos exemplos de modificação pós-traducional é a glicosilação, ou seja, a adição de carboidratos (glicanas) às proteínas sintetizadas pelas células. Parâmetros da cultura celular como concentração de nutrientes, pH, temperatura, assim como concentração de oxigênio dissolvido (OD) e de metabólitos tóxicos (geralmente lactato ou amônia) podem ter um efeito significativo na distribuição das estruturas glicanas encontradas nas proteínas recombinantes, tornando o controle destes parâmetros de extrema importância para a otimização do processo de produção das proteínas recombinantes (Butler, 2005).

Comparadas às células de mamíferos, as células de inseto apresentam outras vantagens, como a facilidade no cultivo, alta tolerância a osmolaridade e altos níveis de expressão quando infectadas por um baculovírus recombinante (Batista, 2006; Cha, 2005).

As linhagens celulares mais frequentemente utilizadas são células epiteliais de ovário de lagartas da espécie *Spodoptera frugiperda* ('lagarta do cartucho do milho'), conhecidas comercialmente como Sf-9 e células ovo de *Trichoplusia ni* (Tn), comercializada com o nome de High Five™ (Morais, 2001; Arantes, 2007).

A linhagem celular UFLAG, células originárias da lagarta *Anticarsia gemmatalis* é promissora para expressão de proteínas heterólogas, pois é conhecida pela alta produção de proteínas recombinantes, mas ainda não é muito bem conhecida e estudada, tendo poucos relatos na literatura (Gioria, 2006; Castro, 1999).

Algumas características apresentadas pelas células Sf-9 são: alta capacidade de liberação de proteína por secreção, crescimento rápido permitindo tempos de incubação mais curtos, baixos gastos com substrato para manutenção do cultivo, altos rendimentos celulares, fornece um ambiente eucariótico que favorece o enovelamento, modificações pós-traducionais e ligações dissulfeto que, muitas vezes, são fundamentais para a atividade biológica da proteína de interesse, e ainda não necessitam de incubação com CO₂ e adição de Soro Fetal Bovino (SFB) ao meio de cultura, o que é indispensável em culturas de células de mamíferos (Granados, 2007; Arantes, 2007).

A soma destas características tornou o sistema célula Sf-9/baculovírus uma escolha apropriada para a produção em larga escala de bioprodutos como: heterodímeros funcionais de imunoglobulinas humanas (Hasemann & Capra, 1990), rodopsina (Klaasen, 1999), interleucina-7 humana (Mirzaei, 2008) e enzima butirilcolinesterase humana (Li, 2010).

No ano de 1983, Smith & Summers produziram β -interferon humano através desse sistema. Em 2006, Taylor e colaboradores produziram amelogeninas em células Sf-9, proteínas estas formadoras dos dentes, com um rendimento superior a 10mg/L. Hillar em 2007 produziu uma pro-haptoglobina- $\alpha\beta$ de rato, glicoproteína presente no plasma e responsável pelo controle de inflamações, obtendo uma produção de 15 $\mu\text{g/mL}$, e ainda confirmaram a glicosilação da proteína e sua capacidade de ligar-se a hemoglobina de rato *in vivo*.

Clark em 2009 produziu partículas virais de um rotavírus do tipo C (GpC RV) que causa gastroenterite em crianças e adultos, fazendo estudos cinéticos das proteínas produzidas e otimizando o sistema em células Sf-9. Em 2010, Masroori encontrou no sistema baculovírus/Sf-9 uma alternativa para os baixos níveis de expressão de uma c-carboxilase humana (hGC) e um fator de coagulação VII (FVII), proteínas estas utilizadas em tratamento de hemofílicos, obtendo uma produtividade de 30 $\mu\text{g/mL}$.

Li (2007) produziu a enzima natoquinase (utilizada no tratamento de trombose) através do sistema Bac-to-Bac[®] e obteve a produção de 60U/mL.

2.1.2 Vantagens e desafios do uso do sistema de expressão em baculovírus

Após a escolha da linhagem celular mais adequada, o sistema de expressão em baculovírus também apresenta suas vantagens de utilização, como: uma ampla gama de hospedeiros, a ausência de citotoxicidade, expressão transiente ou estável de genes, integração ao genoma como cópia única, facilidade na ampliação de escala de produção, fácil conservação das partículas virais, aceitação de grandes insertos (aproximadamente 40kb) e a biossegurança, pois os baculovírus só se replicam em invertebrados (Arantes, 2007; Moraes, 2007).

O desafio para o uso do sistema de expressão em baculovírus é o desenvolvimento de um sistema estável, com um alto rendimento de produção de proteínas recombinantes, mas sem lise celular. Uma das alternativas é diminuir a infectividade viral e aumentar a viabilidade celular, alcançando um balanço entre replicação viral e divisão celular (Hitchman, 2009).

Os parâmetros como o momento de infecção (TOI), a multiplicidade de infecção (MOI), a temperatura e a disponibilidade de nutrientes chaves durante o cultivo celular também são essenciais para um alto rendimento na produção de uma proteína recombinante em um sistema célula de inseto/baculovírus e devem ser explorados e investigados a fundo (Zhang, 1994).

2.2 Baculovírus selvagem e recombinante

Os baculovírus, membros da família *Baculoviridae*, são vírus que infectam mais de 25 espécies de artrópodes, majoritariamente insetos da ordem *Lepidoptera*, assim como insetos das ordens *Diptera* e *Hymenoptera*. Seu genoma é composto por um DNA circular de fita dupla, variando de 80-200 kb, envolto por um capsídeo protéico em forma de bastonete, constituindo a unidade infectiva do vírus (partícula viral) (Arantes, 2007).

O baculovírus contém um gene que codifica uma proteína responsável pela formação do capsídeo viral denominada poliedrina, que é produzida em abundância. No entanto, esta proteína não é essencial para a replicação do vírus, podendo seu gene ser retirado e em seu lugar adicionado um gene de interesse, que ficará sob o controle do forte promotor da poliedrina (Arantes, 2007; Mendes, 2006).

Como vantagens para a utilização desses vetores de baculovírus podem ser citadas: a) expressão de proteínas heterólogas com altos rendimentos; b) existência de promotores fortemente ativos durante a fase tardia da infecção (não interferindo no ciclo viral); c) diferentes fases na regulação gênica do ciclo viral, oferecendo oportunidade de expressão de genes heterólogos sob diferentes condições de cultivo; d) capacidade para clonagem de grandes inserções; e) eficiência na expressão de genes de eucariotos contendo regiões codificantes e não codificantes, éxons e introns, respectivamente; e f) simplicidade de manipulação; g) e possibilidade de expressão de mais de uma proteína heteróloga ao mesmo tempo (Bollati-Fogolin, 2007; Pedrini & Mendonça, 2007; Wickham, 1992; Clem, 2001).

O baculovírus mais utilizado para expressão de proteínas recombinantes é o *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), juntamente com células de inseto Sf-9 (*Spodoptera frugiperda*) como hospedeiras, que desde os anos 80 é largamente utilizado como vetor para genes exógenos (Pedrini & Mendonça, 2007; Hitchman, 2009).

Uma das dificuldades encontradas na construção de um baculovírus recombinante é que o processo pode ser demorado, pois envolve a clonagem de um gene de interesse em um plasmídeo de transferência, para posterior inserção no genoma do vírus e o isolamento dos recombinantes. Para superar esta dificuldade Luckow e colaboradores (1993) desenvolveram e patentearam a propagação do baculovírus (bacmídeo) em *E.coli*, que revolucionou o sistema eliminando a fase de seleção (plaqueamento), gerando um vírus recombinante com eficiência e alto rendimento (Hitchman, 2009).

O sistema compreende um vetor doador (pFastBacTM1) contendo um sítio de replicação mini-F, genes marcadores para resistência à antibióticos e um sítio de

transposição Tn7, neste vetor o gene de interesse será inserido no locus da poliedrina entre os lados 5' e 3' do Tn7 (Manual Bac-to Bac[®], 2009; Mendes, 2007; Hitchman, 2009).

O segundo componente deste sistema consiste na cepa bacteriana *E.coli* DH10Bac[™], contendo um bacmídeo com um sítio alvo mini-att Tn7 e um plasmídeo *helper* que codifica a transposase (vai auxiliar na transposição) e confere resistência ao antibiótico tetraciclina. Após a transformação da cepa bacteriana *E.coli* DH10Bac[™] com o vetor doador pFastBac[™]1, contendo o gene de interesse, a transposição ocorre entre os sítios Tn7 do vetor e mini-att Tn7 do bacmídeo. Os clones recombinantes são selecionados em placas com ágar contendo os antibióticos apropriados. Após seleção, os clones são amplificados e o DNA viral recombinante de alto peso molecular é recuperado por lise alcalina, para posterior transfecção nas células de inseto. Este sistema de expressão é comercializado como Bac-to-Bac[®] (Invitrogen[™]). (Manual Bac-to-Bac[®], 2009; Kost, 2005). Este sistema é ilustrado na Figura 1 a seguir.

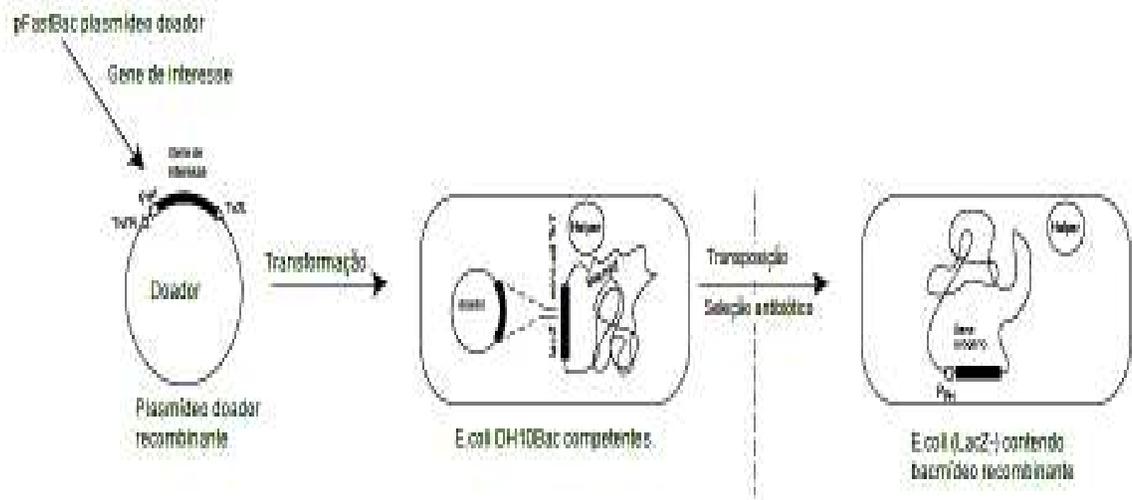


Figura 1. Geração do bacmídeo recombinante conforme manual Bac-to-Bac[®]. O gene de interesse é inserido em um plasmídeo doador que após a transformação de bactérias *E.coli* entra na célula e ocorre a transposição entre os sítios Tn7 do vetor e mini-att Tn7 do bacmídeo. Então é feita uma seleção com antibióticos apropriados e X-Gal para posterior extração do bacmídeo. Figura adaptada do Manual Bac-to-Bac[®] (Invitrogen[™]).

2.2.1 Infecção das células de inseto com o vírus selvagem

A infecção das células de inseto com o vírus selvagem produz dois tipos de progênie virais: as partículas virais extracelulares e as ocluídas. As partículas virais extracelulares são recobertas por uma membrana celular, que é responsável pela infecção célula-célula nos cultivos, mas é incapaz de infectar o inseto *in vivo*. Este papel fica com as partículas virais ocluídas, que tem seu nucleocapsídeo formado por uma matriz protéica constituída principalmente pela poliedrina. Esta matriz protéica protege o vírus contra agentes ambientais,

dessecação e luz UV, sendo dissolvida no intestino do inseto após sua ingestão (Arantes, 2007). O esquema mostrando as partículas virais (Figura 2) e fotos de células Sf-9 normais e infectadas (Figura 3) são mostradas a seguir.

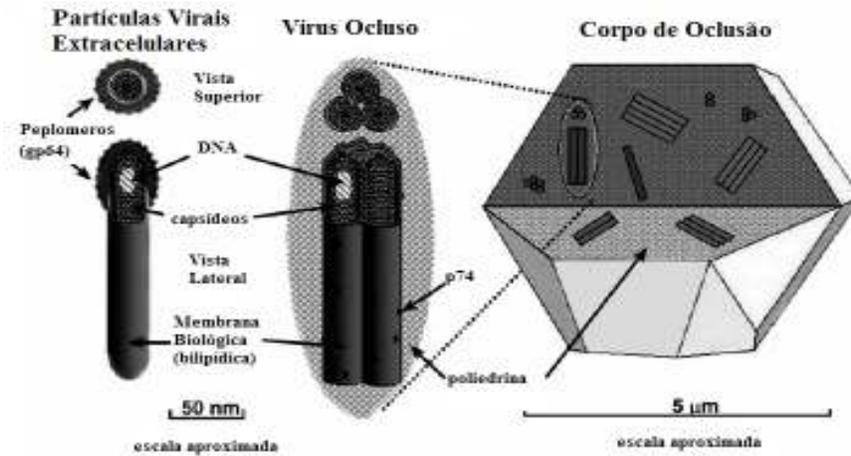


Figura 2. Diagrama das partículas virais do baculovirus. Adaptado de Hitchamn, 2009.

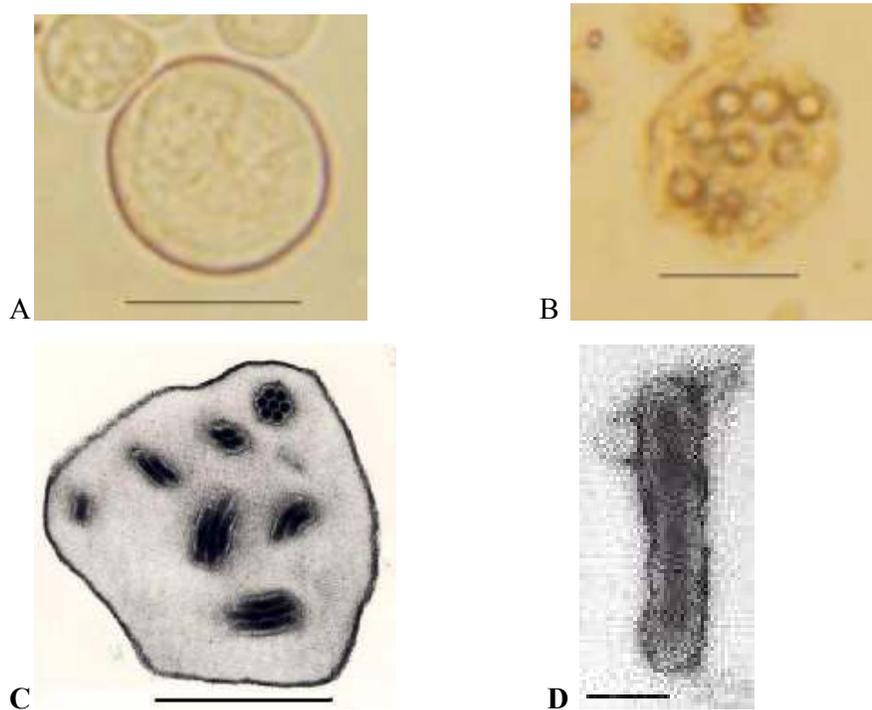


Figura 3. Células Sf-9 normais e infectadas com baculovirus selvagem, A: Célula Sf-9 normal (Barra = 10µm), B: Célula Sf-9 infectada por baculovirus apresentando vários poliedros (Barra = 10µm), C: poliedro (corpo de oclusão) com partículas virais envolvidas por um envelope de poliedrina (Barra = 1µm) e D: Partícula viral extracelular (barra = 50nm). Fotos de Mendonça, R. Z.

Nos insetos o ciclo se inicia com a ingestão de poliedros do vírus. Ao chegar no intestino médio do inseto, o vírus é submetido a um pH alcalino que dissolve os poliedros, liberando as partículas virais. As partículas virais penetram nas células através dos receptores de membrana celular. Os nucleocapsídeos são transportados até o núcleo, onde são desintegrados, liberando o DNA viral e iniciando a replicação de seu genoma, de 12 a 20 horas após a infecção. As novas cópias do genoma viral são encapsuladas no núcleo, formando novos nucleocapsídeos, e então, são dirigidos até o citoplasma e são liberados da célula pelo processo de brotamento para infectar novas células. Outros nucleocapsídeos são envelopados novamente no núcleo, dando origem aos corpos de oclusão aproximadamente 20 horas após a infecção. (Moraes, 2007; Mendes, 2006; Luque & O'Reilly, 1999). O ciclo de infecção é ilustrado na Figura 4.

Na infecção *in vitro* as partículas virais extracelulares penetram nas células, e ocorre o transporte do capsídeo viral para o núcleo, este capsídeo é destruído para a liberação do DNA viral. Imediatamente começa a transcrição do DNA, podendo ser detectados por volta de 30 minutos após a infecção. As próximas seis horas, caracterizadas pela fase inicial de infecção, precedem a replicação do DNA viral e os primeiros efeitos citopáticos podem ser observados, como a dispersão da cromatina e o aumento do volume nuclear (Arantes, 2007).

A fase tardia de infecção compreende o período de 6 a 20 horas após a infecção, e ocorre uma intensa produção de partículas virais extracelulares e a replicação do DNA viral. A produção de partículas virais extracelulares ocorre de 12 a 20 horas após a infecção, e depois decai e cessa (Mendes, 2006; Arantes, 2007).

Na fase de infecção muito tardia ocorre a produção de poliedros e a síntese de proteínas celulares é bloqueada. No núcleo da célula ocorre a síntese de membranas, que irão se unir aos nucleocapsídeos para formação do envelope viral e os corpos de oclusão. Os poliedros podem ser detectados a partir de 20 horas de infecção. As proteínas virais P10 e poliedrina são ativadas após 18 horas da infecção e sintetizadas até 72 horas pós-infecção (p.i.) (Mendes, 2006).

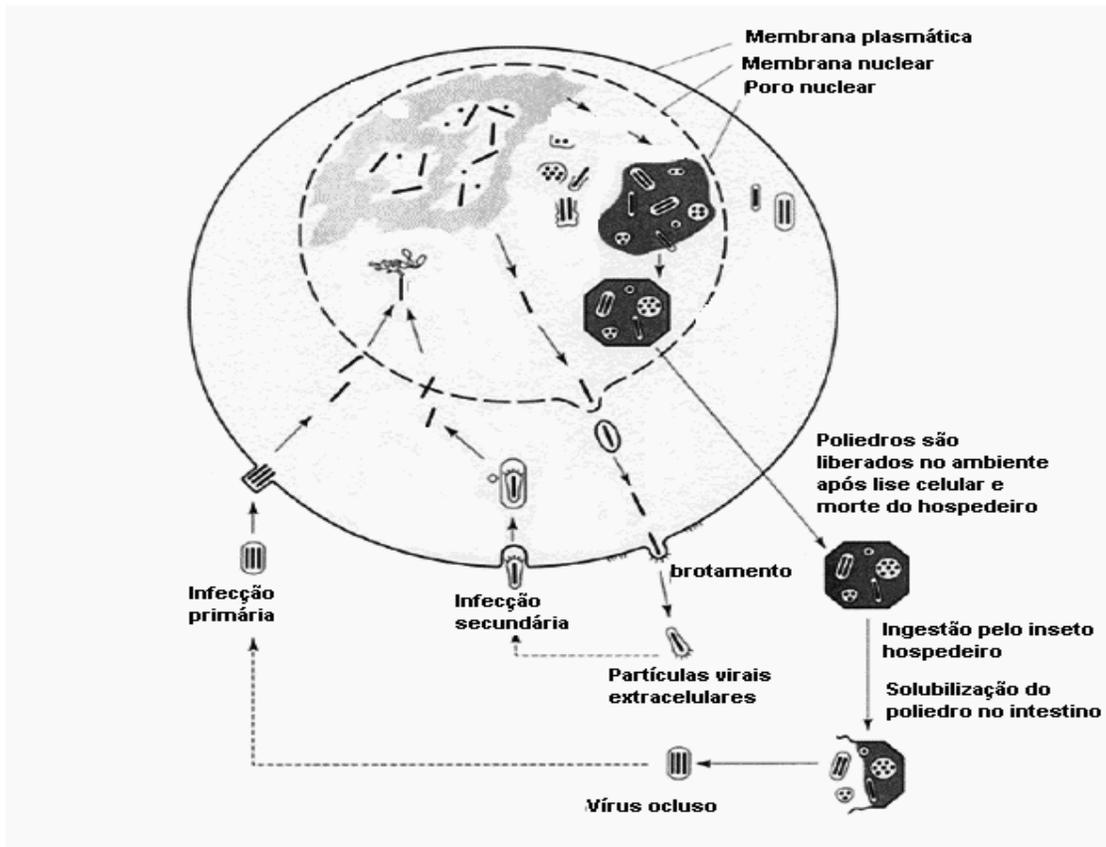


Figura 4. Esquema do ciclo da infecção do baculovírus selvagem no inseto. Na infecção com o baculovírus selvagem ocorre a expressão da proteína poliedrina e a formação dos corpos de oclusão (poliedros). Adaptado de Mendes, 2006.

2.2.2 Infecção dos cultivos de células de inseto com o bacmídeo recombinante

As células de inseto cultivadas em suspensão são infectadas pelo bacmídeo recombinante contendo o gene de interesse. O ciclo de infecção ocorre em três fases: fase inicial, tardia e muito tardia, assim como na infecção com baculovírus selvagem.

A fase inicial acontece durante as seis primeiras horas p.i., onde a célula se reprograma para a replicação do vírus. O DNA viral é liberado e se dirige ao núcleo, onde sua transcrição se inicia imediatamente (Mendes, 2006; Arantes, 2007).

A fase tardia ocorre entre 6 à 24hs após a infecção onde acontece uma intensa replicação de DNA viral.

Na fase muito tardia, após as 24hs de infecção há uma grande produção da proteína de interesse (no baculovírus selvagem ocorreria a produção da poliedrina). O esquema ilustrando o ciclo de infecção do baculovírus recombinante é mostrado na Figura 5 (Mendes, 2006; Arantes, 2007; Costa, 2008).

Os genes da poliedrina (P_{PH}) e da proteína P10 são estruturais, mas não essenciais para a replicação viral, e geralmente são substituídos pelo gene da proteína de interesse, ficando somente os fortes promotores (P_{PH} e P10) (Arantes, 2007; Costa, 2008).

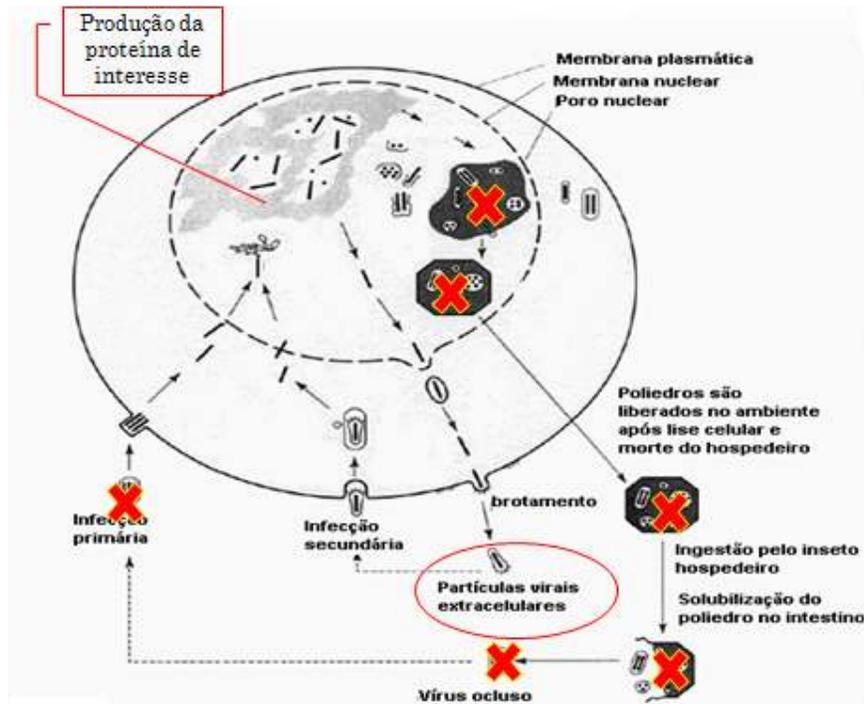


Figura 5. Esquema do ciclo da infecção do baculovírus recombinante em células de inseto. A infecção começa a partir das partículas virais extracelulares (circuladas em vermelho). No núcleo ocorre a expressão da proteína heteróloga. O núcleo começa a inchar até que se rompe liberando a proteína heteróloga produzida. Os “x” em vermelho são as etapas do ciclo infeccioso do baculovírus selvagem que não acontecem no ciclo dos recombinantes. Adaptado de Mendes, 2006.

A expressão de proteínas heterólogas durante a fase tardia é vantajosa pela utilização dos fortes promotores tardios (P_{PH} e P10) e pela possibilidade de expressão de genes citotóxicos, mas é desvantajosa pela baixa eficiência no processamento pós traducional da célula infectada, provocada pelos danos no complexo de Golgi e no retículo endoplasmático (Jarvis, 1990).

A expressão de genes com promotores na fase inicial de infecção faz com que a célula tenha mais tempo para a expressão do gene heterólogo, mas podem interferir na replicação viral, e também são conhecidos por não serem muito fortes (Mendes, 2006).

Na Figura 6 é demonstrado o vetor doador pFastBacTM1, o lócus da poliedrina e seu sítio de multiclonagem.

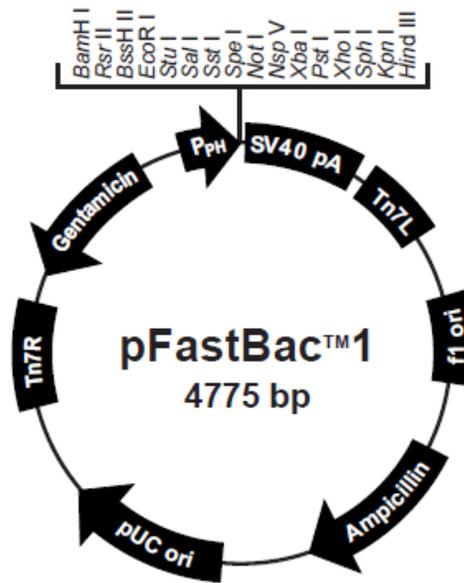


Figura 6. Vetor pFastBac[™]1 e seu sítio de multiclonagem. O gene e interesse é inserido sob o controle do promotor da poliedrina (P_{PH}), utilizando o sítio de multiclonagem. A região localizada entre as regiões Tn7R e Tn7L é transferida por transposição sítio específica para o bacmídeo.

2.3 Apoptose

A infecção de células de inseto por baculovírus induz a morte por apoptose, a qual limita a produção de proteínas recombinantes. Assim sendo, uma das formas de aumentar a produtividade celular seria inibir ou atenuar esta morte celular (Arantes, 2007).

O conceito de morte celular programada tem suas raízes na pesquisa embriológica e patológica. Em 1951, Glucksmann teorizou que a morte celular é um plano vital no desenvolvimento dos animais invertebrados e vertebrados. Investigações patológicas têm descrito a morte celular associada à picnose (espessamento) nuclear, o que indica uma característica contração e condensação do núcleo. Kerr (1972) forneceu um nome conveniente para este processo: apoptose, que em grego significa o ato de cair. (Horta, 1999; Uren e Vaux, 1997).

A necrose diferencia-se da apoptose em alguns aspectos; a necrose é causada por lesões físicas ou químicas intensas, (temperatura extrema, radiação, produtos tóxicos, falta de oxigênio, infecções), as quais não permitem que a célula se regenere da agressão, o que impede a célula de manter suas funções vitais. A necrose geralmente é acidental ou patológica (Horta, 1999; Uren e Vaux, 1997).

Já na apoptose, a célula se desprende-se das vizinhas. No núcleo, há a formação de aglomerados de cromatina nas bordas da membrana nuclear, o material nuclear é fragmentado e condensado. A célula diminui de volume pela formação de corpúsculos em sua superfície, conhecidos como corpos apoptóticos, que são constituídos por material nuclear e citoplasmático. Esta formação ocorre para que a célula reduza o seu volume, a fim de que este material seja fagocitado por outras células e eliminado do organismo (Horta, 1999; Uren e Vaux, 1997).

Este tipo de morte ocorre quando é necessário eliminar uma célula sem que haja agressão às células vizinhas, seja em processos celulares de mudanças histológicas durante a embriogênese, seja após uma infecção viral ou uma agressão química menos intensa. Nestes casos, a célula ativa uma sequência de eventos que leva ao quadro acima. Esta morte é conhecida como uma morte altruísta, devido ao fato de não ocorrer lise celular, com isso o material citoplasmático e nuclear não extravasa para o ambiente extracelular, não originando um processo inflamatório que agride as células vizinhas (Horta, 1999).

Mais detalhadamente, a via de sinalização que leva a morte por apoptose pode ser dividida em quatro fases: iniciação, sinalização, efetora e degradação. Uma vez que a apoptose foi iniciada por um indutor, como por exemplo, substâncias químicas (etoposide, estaurosporina, terbutil) ou receptores de superfície celular (receptores Fas e TNF) os sinais apoptóticos são transmitidos através da maquinaria celular. Esta fase de sinalização resulta na ativação das caspases (cisteína proteases), que executam a apoptose na fase efetora. Após a ativação, as caspases são responsáveis pelas mudanças bioquímicas observadas na apoptose, como a degradação do DNA e substratos celulares (Ferri, 2000; Kroemer, 2000).

A mitocôndria é considerada a peça chave no processo de morte celular por apoptose, pois são responsáveis por mudanças funcionais e estruturais durante o processo de morte. As mitocôndrias têm controle da apoptose, pois a permeabilização da membrana mitocondrial (PMM) pode ser um mecanismo relacionado ao processo de apoptose (Kroemer, 2000). A PMM, associada ou não com a perda do potencial eletroquímico da mitocôndria ($\Delta\Psi_m$) e a alteração da matriz mitocondrial são responsáveis pela liberação de proteínas intermembranas, como o citocromo c e o fator indutor de apoptose (AIF). Como resultado desta liberação, caspases e DNases são ativadas e o processo de morte celular por apoptose torna-se irreversível. A PMM pode causar a falta de enzimas antioxidantes, gerar espécies de oxigênio reativo e cessar a síntese de ATP levando à catástrofe bioenergética celular (Ferri, 2000; Kroemer, 2000).

Diversos elementos têm sido identificados como potenciais indutores da PMM: proteínas da mitocôndria, lipídeos, proteínas da família Bcl-2 e outros complexos protéicos (Ferri, 2000). Um exemplo destes complexos protéicos é o PTPC (*permeability transition pore complex*), o qual é formado na membrana externa e interna da mitocôndria. As proteínas mais abundantes do complexo PTPC são as proteínas ANT (*adenine nucleotide translocator*) presentes na membrana interna das mitocôndrias e os canais dependentes de íons da membrana externa das mitocôndrias. Estas proteínas podem interagir com a ciclofilina D da matriz mitocondrial e proteínas que regulam o mecanismo de apoptose como as proteínas da família Bax/Bcl-2 (Marzo, 1998; Shimizu, 1999; Shimizu, 2001).

O complicado mecanismo molecular da apoptose tem sido elucidado, o que levou a novos alvos e estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças provocadas pela disfunção na apoptose. Várias pesquisas tem investigado a inibição da morte celular de neurônios pela introdução de genes antiapoptóticos, como Bcl-2, que possibilitou uma abordagem terapêutica para o tratamento de doenças neurodegenerativas, incluindo Alzheimer's e Parkinson's (Horta, 1999).

A qualidade do processamento de proteínas, bem como a secreção e modo de conservação na célula pode ser influenciado pelo estado fisiológico da mesma. Células infectadas por vírus desenvolvem o processo de apoptose como mecanismo de defesa. Naturalmente, alguns vírus que infectam vertebrados e invertebrados podem bloquear a apoptose gerada pela infecção das células hospedeiras (Morishima, 1998). Ao bloquear este processo, pode-se retardar a morte da célula e assim prolongar a replicação viral (Lin, 2001; Al-Rubeai & Singh, 1998).

O baculovírus produz uma proteína chamada p35, cuja sequência genética foi identificada em 1987, mas sua função só foi descoberta em 1991 (Granados, 2007). Esta proteína é capaz de prevenir a indução da apoptose durante a infecção, sendo uma das mais ativas de todos os inibidores de caspase identificados, e por isso tem sido estudada extensivamente (Rabizadeh, 1993). Acredita-se que ela inibe caspases do grupo I, II e III, sendo um mecanismo de várias etapas. A p35 também está relacionada com a inibição da apoptose iniciada por outros estímulos, como raios x, ausência de nutrientes, actinomicina-D, entre outros (Granados, 2007; Lin, 2001). O gene P35 é ativado na fase inicial de infecção inclusive em células de mamíferos (Kamita, 1993; Morishima, 1998).

Outro gene inibidor de apoptose chamado IAP (*inhibitor of apoptosis*), é um gene conservado envolvido na regulação da apoptose e citocinética em organismos desde as leveduras até os humanos. As proteínas IAP são metaloproteínas, sua principal característica é

uma ligação de zinco amino terminal chamada de BIR (Baculovirus IAP Repeat) e algumas IAPs tem outra ligação de zinco carboxi terminal chamada RING (Clem, 2001). Nem todas as proteínas do grupo IAP apresentam atividade antiapoptótica, variando conforme os hospedeiros (Clem, 1996).

2.3.1 Porque utilizar o sistema de expressão célula Sf-9/baculovírus para produzir uma proteína antiapoptótica?

A expressão de proteínas recombinantes através do sistema baculovírus/Sf-9 é limitada pela apoptose, que é causada pela infecção das células pelo baculovírus. Assim sendo, uma das formas de aumentar a produtividade destas proteínas seria inibir ou atenuar esta morte pela introdução de uma proteína com ação antiapoptótica. Popham e colaboradores em 2010 mostrou também que a infecção por baculovírus afeta a expressão de proteínas das células. Esta infecção por baculovírus modulou a expressão de proteínas em diferentes linhagens de células, acarretando em mudanças substanciais na expressão de proteínas envolvidas nos sinais de transdução, ação proteica e proteção celular. Este grupo de pesquisadores demonstrou por análise de espectrometria de massa que células HV-AM1 infectadas com AcMNPV, tiveram uma diminuição na expressão de 12 proteínas celulares quando comparadas aos controles não infectados, enquanto que 6 proteínas celulares tiveram suas taxas de expressão significativamente aumentadas.

Temos observado que APLO, proteína antiapoptótica da lagarta *Lonomia obliqua*, tem ação direta sobre a membrana das mitocôndrias alterando o seu potencial por mecanismos provavelmente similares aos já relatados (Kroemer, 2000; Marzo, 1998; Shimizu, 1999; Shimizu, 2001). Pelo amplo espectro de ação da APLO, acreditamos que ela possa atuar como um supressor geral do processo de apoptose, por uma via conservada em diversos organismos. Se assim for, eventualmente a APLO atue em sinergismo com a proteína p35 presente no baculovírus, permitindo uma maior replicação viral e a expressão das proteínas recombinantes que estejam sob controle da poliedrina, promovendo esta de ação tardia.

Como um dos objetivos futuros do grupo é expressar a proteína recombinante rAPLO no sistema células Sf-9/baculovírus, e buscar a otimização da produção da mesma, é importante conhecer previamente a ação do baculovírus a ser utilizado e sua expressão nas células, para que a análise dos resultados com a rAPLO não sofra interferência do observado somente com o bacmídeo, trazendo informações errôneas ao processo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é estudar parâmetros cinéticos de cultivo de células de inseto Sf-9 infectadas com baculovírus do sistema Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expression System (Invitrogen[™]), utilizado para a produção de proteínas recombinantes.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar estudo cinético e metabólico da célula infectada com bacmídeo comercial Bac-to-Bac[®].
- Estudos cinéticos de parâmetros de infecção (tempo de infecção e multiplicidade de infecção).
- Testes de proteção antiapoptótica do cultivo infectado com o bacmídeo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagem, meio e cultivo celular

Células Sf-9 (*Spodoptera frugiperda*), foram cultivadas a 29°C em frascos T contendo 5 mL de meio SF-900 II (GIBCO), ou em frascos Schott com volume de trabalho de 15 mL e agitação orbital (*shaker*) a 90 rpm ou em microplacas de 6, 12 ou 96 poços.

Células UFLAG-286 (*Anticarsia gemmatalis*) foram cultivadas a 29°C em frascos T contendo 5 mL de meio TC-100 (GIBCO) suplementadas com 10% de soro fetal bovino ou em frascos Schott com volume de trabalho de 15 mL e agitação orbital (*shaker*) a 90 rpm.

4.2 Vírus e infecção

4.2.1 Baculovírus selvagem

Baculovírus *Autographa californica nuclear polyhedrosis* (AcMNPV) foi utilizado neste trabalho como modelo de infecção.

4.2.2 Bacmídeo Bac Sprec

Para o estudo cinético e metabólico de infecção da célula com o bacmídeo comercial Bac-to-Bac[®], foi utilizado o bacmídeo extraído da bactéria DH10Bac[™] e transposto com o vetor de transferência vazio (pFastBac[™]1, Invitrogen[™]), sem conter nenhuma sequência codificadora para proteína recombinante. Este bacmídeo foi chamado Bac sprec.

O bacmídeo Bac sprec utilizado, foi cedido gentilmente por Carmo, A. C. V. (Laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares- LATECC-UFSCar, Instituto Butantã – SP, Laboratório de Entomologia e Parasitologia, email: viegasacc@yahoo.com.br)

4.2.3 Baculovírus recombinante AcMNPV-GUS

O baculovírus recombinante AcMNPV-GUS contém a sequência do gene repórter β -glucuronidase que codifica a proteína GUS, foi gerado com a utilização do sistema comercial Bac-to-Bac[®] *Baculovirus Expression System* (Invitrogen[™]), conforme as indicações do fabricante. Este baculovírus recombinante é utilizado como um padrão recombinante para experimentos de transposição e transfecção.

4.2.4 Infecção de células Sf-9 por Baculovírus

Células Sf-9, em fase inicial ou exponencial de crescimento foram infectadas com 0,01; 0,1; 1 ou 10 MOI (multiplicidade de infecção) com os diferentes baculovírus citados acima. Todos os cultivos infectados foram mantidos a 29°C e 90 rpm.

4.2.5 Definição de passagem viral ou passagem nos cultivos

Quando os cultivos infectados alcançam o 5º dia, e praticamente todas as células estão rompidas, devido ao ciclo de infecção viral, o sobrenadante do cultivo é coletado e armazenado em geladeira (4°C). Este sobrenadante contém partículas virais, e é utilizado para infectar novas células.

Este processo de infectar novas células com o sobrenadante do cultivo anterior é chamado de passagem.

A primeira passagem ocorre quando os bacmídeos extraídos da bactéria *E.coli* DH10Bac[™] são transfectados nas células de inseto. O sobrenadante deste primeiro cultivo

será o de passagem 1. Quando novas células de inseto forem infectadas com os bacmídeos de passagem 1, o sobrenadante deste cultivo será de passagem 2, e assim por diante. O título viral de cada passagem foi determinado.

4.3 Indutor químico de apoptose

Para o teste da ação antiapoptótica dos baculovírus, foi utilizado como indutor químico o *Tert-butyl Hydrogen Peroxide* (t-BHP) nas concentrações finais de 125, 250, 500 ou 1000 μM . O t-BHP é um indutor de stress oxidativo que atua sobre as membranas das mitocôndrias.

4.3.1 Fluorocromos para determinação de morte celular

Foram utilizados como indicadores de morte celular os corantes iodeto de propídio (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Hoechst 33342 (2 μM), laranja de acridina (AO) (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e o brometo de etídio (EB) (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). O iodeto de propídio é um fluorocromo que penetra em todas as células que perderam a permeabilidade de membrana (células em processo de morte ou mortas), emitindo em vermelho, já o Hoechst é um fluorocromo que se fixa no núcleo permitindo a visualização de mudanças morfológicas de núcleos em processo de morte por apoptose.

AO e EB são corantes que se intercalam no DNA e apresentam fluorescência sob luz UV. O corante AO penetra em todas as células independentemente da sua integridade da membrana celular. O corante EB só pode penetrar nas células que perderam a integridade da membrana celular. Utilizando um filtro azul e luz UV em microscópio de fluorescência, as células são coradas em verde com AO e em laranja com EB. A marcação do EB é mais forte do que a marcação do AO, assim sendo, ao utilizar a marcação com os dois corantes nas células, a coloração verde da AO é suprimida, destacando-se as células mortas ou em processo de morte (em apoptose) exemplificado na Figura 7.

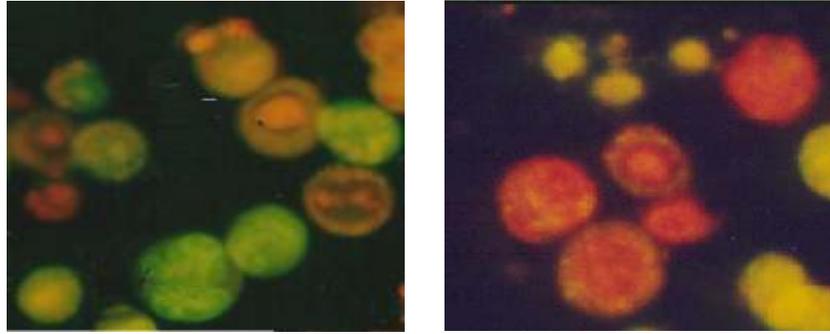


Figura 7. Foto ilustrando células coradas com laranja de acridina e brometo de etídeo. A laranja de acridina cora as células saudáveis, emitindo fluorescência em verde, já o brometo de etídeo cora as células mortas ou em processo de morte, emitindo fluorescência em laranja. Foto de Mendonça, R. Z.

4.4 Procedimentos analíticos

4.4.1 Geração e isolamento dos bacmídeos

O vetor pFastBacTM 1 vazio (sem a presença de nenhum inserto), e pFastBacTM-Gus foram quimiotransformados em *E. coli* DH10Bac Max Efficiency[®] (InvitrogenTM).

Ocorrida a transformação, a transposição ocorre entre o elemento mini-Tn7 no vetor pFastBacTM 1 recombinante ou vazio e o mini-sítio attTn7 alvo do bacmídeo para gerar um bacmídeo recombinante (como visto no esquema da Figura 1). Com a inserção do cassete de expressão do bacmídeo, a sequência gênica do LacZa é interrompida, impedindo com que a bactéria degrade o substrato X-gal presente no meio LB (*Lysogeny broth*, Serva Electrophoresis), uma vez que a síntese da enzima β -galactosidase não mais ocorre. Desta forma, são geradas colônias fenotipicamente brancas. Por outro lado, caso a transposição do cassete de expressão não ocorra, a transcrição do gene não é alterada permitindo assim a clivagem do substrato cromógeno (X-gal), gerando colônias azuis.

Após a análise inicial por fenótipo, foi realizada reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para análise dos bacmídeos. Como o DNA do bacmídeo recombinante possui acima de 135 kb, a confirmação dos bacmídeos transpostos seria difícil por simples análise de restrição enzimática. Desta forma, é indicada a reação de PCR uma vez que o bacmídeo possui sítios para os *primers* pUC/M13 *forward* e *reverse*, flanqueando a região de transposição. Desta forma, é esperada a geração de fragmentos conforme descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Tamanhos dos fragmentos esperados gerados pela reação de PCR com a utilização dos primers pUC/M13 *foward* e *reverse* (Invitrogen™).

Amostra	Tamanho do produto de PCR
Bacmídeo sozinho	~ 300pb
Bacmídeo transposto com pFastBac™ 1 (Bacsprec)	~ 2300 pb
Bacmídeo transposto com pFastBac™ 1-GUS	2300pb (bacmídeo) +1900pb (β–glucuronidase,) = 4200pb

Após o período de incubação de 48 horas, colônias grandes e isoladas de *E. coli* DH10Bac, fenotipicamente azuis ou brancas foram inoculadas em 2 mL de meio líquido LB (Serva) com 50 µg/mL de canamicina, 7 µg/mL de gentamicina e 10 µg/mL de tetraciclina. As culturas foram incubadas a 37°C *overnight*, sob agitação de 250rpm.

Após 16 horas de incubação, 5µL de cada cultura foi analisado por PCR utilizando *primers* pUC/M13 *foward* e *reverse*. Para as reações de PCR foram utilizados 12,5µL de Master Mix (Promega), 1µL de *primer foward* e 1µL de *primer reverse*, e aproximadamente 200ng de DNA e água ultra pura autoclavada para volume final de 25µL. As reações foram realizadas com desnaturação com temperatura inicial de 93°C por 3 minutos, seguidas de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 5 minutos, com extensão final de 7 minutos a 72°C. Eletroforese em gel de agarose (1%) foi realizada para verificar os produtos amplificados.

Após a análise dos bacmídeos, os mesmos foram isolados pelo protocolo descrito por Arthur Laganowsky (adaptado de M. Faller/Guo Lab - <http://www.doe-mbi.ucla.edu/local/protocols/Bacmid%20Preparation>).

As cepas contendo os bacmídeos foram armazenadas em glicerol e meio de cultivo (meio LB com concentração final de glicerol de 15%) a -80°C e os bacmídeos purificados foram armazenados em água ultra pura, a 4°C em geladeira até o momento da transfecção em células Sf-9 e UFLAG.

4.4.2 Transfecção em células de inseto

Para a transfecção dos bacmídeos em células de inseto foram seguidas as instruções do manual Bac-to-Bac[®] *Baculovirus Expression System* (Invitrogen[™]). A transfecção foi realizada com o reagente Cellfectin[®] (Invitrogen[™]), que é constituído de lipídeos catiônicos que formam lipossomas com o DNA tornando possível a permeabilidade através da membrana plasmática da célula, que também possui um carácter lipídico.

Células Sf-9 e UFLAG em fase log de crescimento ($1,5 - 2,5 \times 10^6$ células por mL, viabilidade maior que 95%) foram transfectadas com 500ng de baculovírus recombinante e observadas diariamente até 144 horas após a infecção para a visualização dos sinais de infecção viral.

Depois de transcorridas às 144 horas de transfecção, os cultivos celulares foram centrifugados e estocados a 6°C, servindo como estoque viral tanto para os baculovírus sem inserto (Bac sprec) ou o baculovírus AcMNPV-GUS com o gene repórter β -glucuronidase. Estes sobrenadantes foram utilizados na infecção das células para a obtenção da primeira passagem em células UFLAG e Sf-9. Foi coletada amostra do sobrenadante de todos os cultivos diariamente para determinação do número de células, consumo de nutrientes, titulação do baculovírus e estudos de morfologia celular com fotomicrografia de cada etapa.

4.5. Análises dos cultivos de células infectadas com o bacmídeo recombinante

4.5.1 Amostragem

Amostras dos cultivos infectados foram obtidas diariamente e a quantidade de vírus produzido pelas células foi determinada como descrito abaixo. Amostras também foram coletadas para determinação do número de células, dosagem de aminoácidos e açúcares, determinação das proteínas por eletroforese em SDS-PAGE e acompanhamento morfológico em microscopia óptica e de fluorescência confocal.

4.5.2 Análise dos bacmídeos por PCR após transfecção

Para confirmação da presença dos bacmídeos nos cultivos de células Sf-9 e UFLAG foram realizadas reações de PCR com amostras de extração de DNA destas culturas com os *primers* pUC/M13 *forward e reverse*, que são primers de amplificação que se anelam a seqüências em ambos os lados do sítio mini-att Tn7. Se a transposição ocorrer, o produto de

PCR terá tamanho de 2.300 pb mais o tamanho do gene heterólogo, ou apenas 2.300 pb, caso a transposição ocorra com pFastBacTM 1 vazio. As reações foram conduzidas conforme manual Bac-toBac[®] (InvitrogenTM).

Amostras de cultivos coletadas na sexta passagem, tiveram seu DNA extraído pelo kit *Illustra Tissue and Cells Genomic Prep Mini Spin Kit*, conforme as indicações do fabricante. Após a extração, foi realizado PCR utilizando 12,5µL de Master Mix (Promega), 1µL de *primer forward* e 1µL de *primer reverse*, 200ng de DNA, água ultra pura autoclavada para um volume final de 25µL. As reações foram realizadas com desnaturação inicial a 93°C por 3 minutos, seguidas de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 5 minutos, com extensão final de 7 minutos a 72°C. Eletroforese em gel de agarose (1%) foi realizada para verificar os produtos amplificados.

4.5.3 Titulação viral

Amostras dos cultivos de células Sf-9 infectados foram tituladas em microplacas de 96 poços. O cultivo de células Sf-9 presente nas placas foram infectados com 100µL de diluições seriadas de 2, 3, 5 ou 10 vezes. A placa de cultura foi observada diariamente com a finalidade de se observar o efeito citopático do baculovírus nas células. Após 7 dias o sobrenadante do cultivo infectado foi coletado e o título viral determinado como a maior diluição viral capaz de causar efeito citopático em 50% do tapete celular. O título viral foi calculado como descrito por Reed e Muench (1938) e o resultado expresso como dose infectante 50% (DICT₅₀). Após este procedimento, o meio de cultura foi retirado e adicionado ao cultivo 20µL de uma solução contendo cristal de violeta 0,25% (diluído em água). Após 1 minuto o corante foi retirado e a placa lavada em água corrente, seca e fotografada.

4.5.4 Concentração e viabilidade celular

O crescimento e morfologia celular foram monitorados através de microscópio óptico invertido *Olympus CK2* em aumento máximo de 200x. A concentração celular foi determinada utilizando uma câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi determinada segundo o método de exclusão celular por azul de trypan, que se baseia nas falhas na membrana celular e por isso absorvem o corante, ficando azuis, enquanto que as células vivas impedem sua entrada, permanecendo descoradas (Freshney, 2005). Neste trabalho a concentração e viabilidade celular foram determinadas com 0,01% de azul de trypan.

4.5.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Foram realizadas eletroforeses em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (12%) das amostras coletadas dos diferentes experimentos. Os géis foram revelados com o *Gel Code Blue Stain Reagent* (Pierce). As imagens dos géis foram capturadas em um scanner Epson Perfection 610 e trabalhadas em um software *Paint Brush*. O peso molecular de calibração utilizado foi o *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Fermentas) (10, 15, 25, 35, 40, 55, 70, 100, 130 e 170 kDa).

4.5.6 Determinação de aminoácidos

Durante os cultivos as amostras do sobrenadante foram separadas e congeladas a -20°C para posteriores análises dos aminoácidos.

A análise foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), baseada no método proposto por Henrikson e Meredith (1984). Uma coluna Pico-Tag® (Waters, USA) de 3,9 x 300 mm e detecção por UV, $\lambda = 254$ nm foi utilizada como fase estacionária e como eluente um gradiente constituído por duas fases móveis A e B. A fase A é composta de acetato de sódio tri-hidratado, trietilamina, água ultra pura e acetonitrila. A fase B apenas água e acetonitrila. As condições de operação do cromatógrafo da Waters foram: temperatura de 36°C, tempo de corrida de 45 minutos e gradiente com vazão pré-determinada. Os picos foram detectados no comprimento de onda 254 nm.

As amostras do sobrenadante do cultivo foram preparadas segundo as etapas de filtração, secagem, reidratação, derivatização até sua diluição em tampão antes da injeção no equipamento. Uma curva padrão foi preparada para cada aminoácido a partir de uma solução padrão da Waters. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.5.7 Determinação de proteínas totais

As proteínas totais foram determinadas segundo o método colorimétrico descrito por Bradford, 1976.

Para preparar o reativo de Bradford, 100mg de Comassie Brilliant Blue G-250 foram dissolvidas em 50mL de etanol 95%, e depois adicionado 100mL de ácido fosfórico concentrado

P.A., o volume foi completado com água destilada para 200mL. No momento do uso o reativo foi diluído 5 vezes.

O padrão para a curva de calibração foi a albumina BSA 250 µg/mL.

Para a reação foi adicionado 100µL de amostra, 5 mL do reativo de Bradford e após 5 minutos a leitura foi feita em espectrofotômetro a $\lambda = 595\text{nm}$.

4.5.8 Identificação de células apoptóticas utilizando corantes fluorescentes

O processo de apoptose foi determinado em cada amostra seguindo a técnica descrita por Cohen e Duke (1992), com pequenas modificações. Resumidamente, as amostras de células foram misturadas em volumes iguais com uma solução de 100 µg/mL de laranja de acridina (AO) e 100 µg/mL de brometo de etídio (EB). As células foram contadas sob luz UV em um microscópio de epifluorescência, utilizando um filtro azul com uma ampliação de 20x e 40x.

4.5.9 Efeito do bacmídeo vazio (Bac sprec) no crescimento celular

O efeito do bacmídeo vazio (Bac sprec) no crescimento celular foi realizado em cultivos de células Sf-9. Diferentes quantidades de vírus (1, 0,1 e 0,01 MOI) foram adicionados aos cultivos em diferentes momentos (no início do cultivo, no início e no meio da fase exponencial e na fase estacionária). Amostras dos cultivos foram obtidas diariamente e o número de células viáveis foi determinado.

4.5.10 Ação do bacmídeo vazio (Bac sprec)

A atividade antiapoptótica do bacmídeo vazio (Bac sprec) foi testada em cultivos de células Sf-9. O sobrenadante de cultivos infectados contendo o bacmídeo foi adicionado aos cultivos de células Sf-9 no momento do inóculo, 1 hora antes da adição do agente indutor de apoptose, e o cultivo foi acompanhado até a fase final de morte celular. O número de células viáveis e mortas foi determinado diariamente utilizando azul de trypan 0,01% ou laranja de acridina e brometo de etídio (100 µg/mL) de acordo com o protocolo descrito por Mercille & Massie (1994). As células foram observadas em microscópio de luz visível ou em microscópio de epifluorescência.

Como os sobrenadantes dos cultivos também contêm o baculovírus, e para que este baculovírus não interferisse no resultado, atuando sobre as células, um experimento similar foi realizado filtrando o sobrenadante em membrana esterilizante de 0,22 μm . O baculovírus possui um tamanho próximo do limite desta membrana, a maior parte dos vírus acaba ficando retido neste procedimento.

4.5.11 Microscopia eletrônica

Os sobrenadantes dos cultivos celulares foram processados pela técnica de contração negativa (preparo rápido), segundo metodologia descrita por Brenner & Horne (1959) e Hayat & Miller (1990). Nesta técnica as amostras dos sobrenadantes dos cultivos são suspensas em tampão fosfato 0,1M e pH 7,0 e colocadas em contato com grades metálicas, previamente cobertas com filme de colódio e estabilizadas com carbono. A seguir, as telas são drenadas com papel filtro, contrastadas negativamente com molibdato de amônio a 2%, pH 5,0 e examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão Philips EM 208, sob tensão de 80 kV.

4.5.12 Perfil cromatográfico do sobrenadante de cultivos infectados

Para se determinar o perfil cromatográfico do sobrenadante dos cultivos foram realizadas cromatografias com coluna de gel filtração em um cromatógrafo de alta eficiência Akta Purifier (Amersham Pharmacia Biotech) composto por duas bombas, leitor de luz ultravioleta, programador – software Unicorn 4.0 e coletor de frações Frac 900 (Amersham Pharmacia Biotech) acoplado.

As diferentes amostras analisadas foram: a) meio de cultura TC-100 utilizado nos cultivos de UFLAG (sem suplementação de soro fetal bovino b) meio SF-900, utilizado nos cultivos de células Sf-9 c) sobrenadante de cultivo de células Sf-9 infectado com baculovírus selvagem (AcMNPV) realizado em meio Sf-900; e, d) sobrenadante de cultivos de células Sf-9 infectados com o baculovírus Bac sprec na passagem 3 e 7.

Amostras de 1 mL de meio de cultura ou do sobrenadante de culturas infectadas foram aplicadas no cromatógrafo e coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM NaCl 150 mM pH 8,0, com um fluxo de 0,5 mL/min e a leitura de absorbância feita em 280 nm. Foram coletada amostras de 1 mL para posterior análise.

4.6 Planejamento Experimental

O trabalho seguiu a seguinte ordem de experimentos:

1. Confirmação do bacmídeo transposto sem sequencia para proteína recombinante
2. Quantificação do título viral
3. Confirmação da transfecção em células de inseto
4. Estudo dos perfis cromatográficos dos cultivos
5. Estudo do MOI adequado
6. Estudo do TOI adequado
7. Consumo de nutrientes
8. Investigação da ação antiapoptótica
9. Observação não comum da morfologia de cultivos estáticos

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise e isolamento do bacmídeo

Para verificar a transposição entre o bacmídeo e o vetor pFastBacTM 1 vazio, foi realizada reação de PCR seguida de eletroforese, onde foi possível a detecção da banda do tamanho esperado (2300pb), comprovando que esta construção não contem nenhuma sequência adicional (Figura 8).

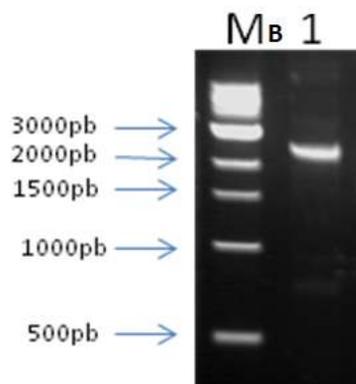


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose (1%) confirmando a amplificação de parte da sequência para o bacmídeo Bac sprec recombinado com pFastBacTM1 (2300 bp). M: marcador de pares de base (1 Kb Ladder - BioLabs New England); 1: clone com recombinação positiva.

5.1.1 Análise do bacmídeo após transfecção

Após a transfecção das células Sf-9 com os bacmídeos que contem o gene da proteína recombinante GUS ou sem gene recombinante (pFastBac™1 vazio), foi coletada uma amostra dos sobrenadantes 144 horas pós infecção. A confirmação da geração do baculovírus transposto com pFastBac™1 vazio foi realizada por PCR seguida de eletroforese. O gel de agarose obtido após o PCR com o sobrenadante dos cultivos de células Sf-9 e UFLAG infectados com o bacmídeo Bac sprec (transposto com pFastBac™1 vazio) e com o bacmídeo sem transposição comprovou que esta construção não contem nenhuma sequência adicional (Figura 9).

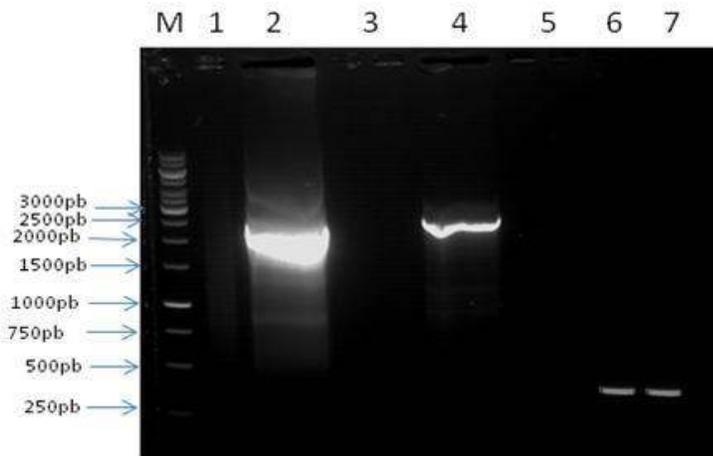


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose (1%) confirmando a presença do DNA do baculovírus recombinado com pFastBac™1 vazio (banda de 2300 pb), em células Sf-9 (2) e UFLAG transfectadas (4). Os controles negativos com todos os reagentes da reação porém sem DNA (1 e 3). Amostras de cultivos de células Sf-9 e UFLAG sem transposição com as bandas de 300 pb (6 e 7, respectivamente). M: marcador de pares de base (1Kb Ladder - BioLabs New England).

5.1.2 Transfecção dos baculovírus em célula de inseto

A partícula viral do baculovírus presente nestas amostras foi detectado por microscopia eletrônica. Na Figura 10 está apresentado uma fotomicrografia em vista superior do vírus representativo deste estudo, comprovando a presença da partícula viral nos cultivos de células infectadas.

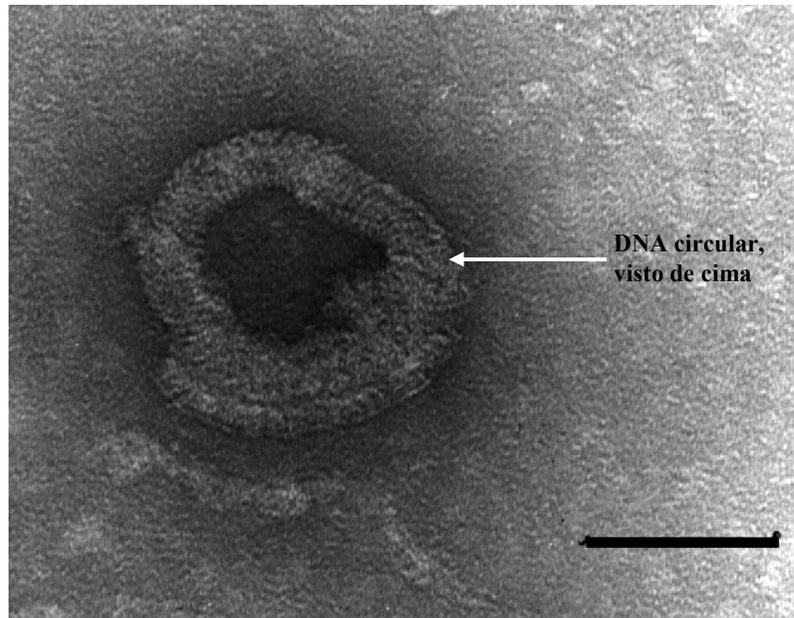


Figura 10. Eletromicrografia mostrando bacmídeo em amostra de cultivo de célula Sf-9 transfectada. Vista superior do DNA circular do bacmídeo. O tamanho aproximado do bacmídeo é de 180nm (barra: 100 nm).

5.2 Determinação do efeito das passagens no título viral

Na Figura 11 é apresentado o título viral nas diferentes passagens do Bac sprec. O título viral é crescente com o aumento do número de passagens do baculovírus em cultivo de células Sf-9. Os cultivos foram infectados com 1 mL do sobrenadante dos cultivos anteriores, 144 horas após a infecção. O vírus se mantém estável nos cultivos, atingindo 4×10^5 DICT₅₀/0,1mL após 7 passagens.

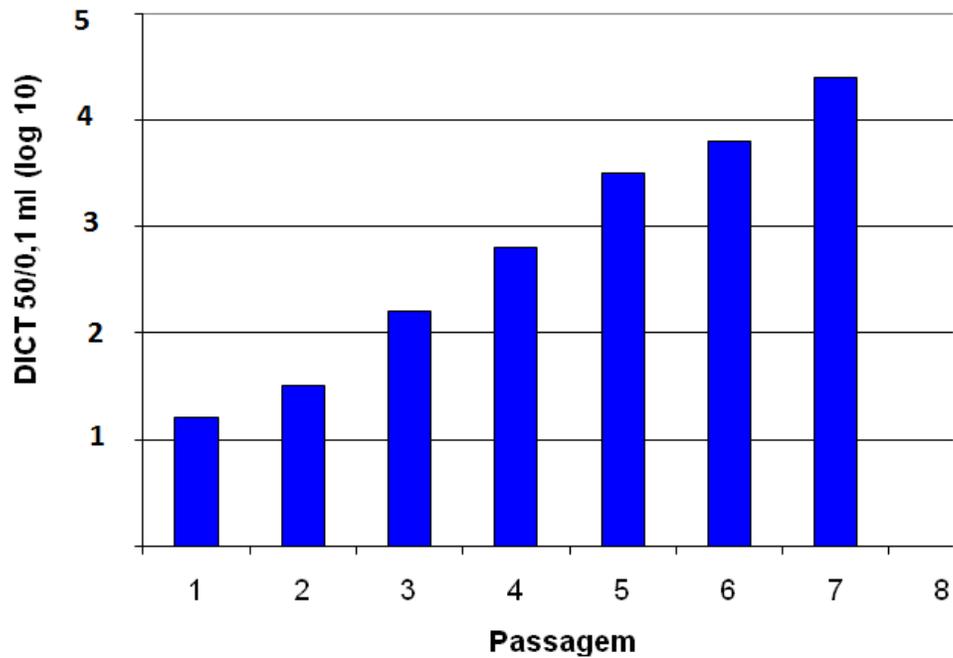


Figura 11. Título do baculovírus (Bac sprec) em diferentes passagens em cultivo de células Sf-9. As células foram infectadas no momento do inoculo e uma amostra foi obtida 144 horas após a infecção. O título viral foi determinado por end point em microplaca de 96 escavações e o resultado foi calculado de acordo com Reed & Muench e expresso como DICT 50/0,1 mL (DICT 50 = dose infectante em cultivo de células capaz de infectar 50% das células).

Também foi estudada a replicação do vírus em células UFLAG, conhecida por permitir uma maior produção de proteína recombinante. No entanto, diferentemente do esperado, pouco ou nenhum efeito citopático foi observado nos cultivos de células UFLAG infectadas, ou seja, as células não apresentaram sinais de apoptose, como contração nuclear, membrana disforme e a formação dos corpos apoptóticos quando comparadas com as células Sf-9.

Como visto na Figura 12, o efeito de morte celular é intenso nas células Sf-9, enquanto pouco efeito é observado nos cultivos de células UFLAG. Este efeito de morte celular por apoptose nos cultivos de células Sf-9 infectados é característico da infecção por baculovírus em estágios mais avançados.

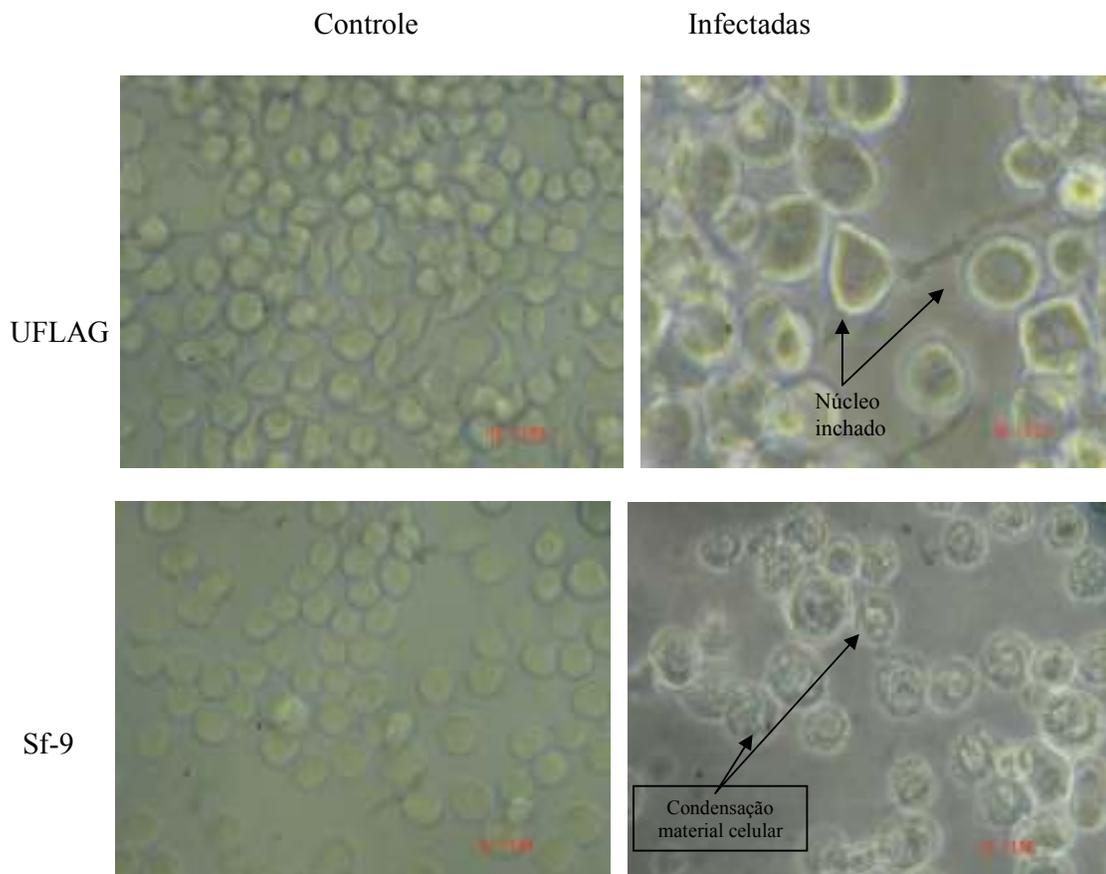


Figura 12. Fotomicrografia de células UFLAG e células Sf-9 normais ou infectadas. Amostras foram retiradas dos cultivos após 6 dias de infecção com o baculovírus Bac sprec - 1 MOI, mantidos em agitação a 100rpm/29°C. As células do controle mantêm sua estrutura intacta enquanto nas infectadas ficam inchadas, o núcleo ocupa praticamente todo espaço celular (UFLAG) e começam a se desintegrar, condensar as organelas e formar corpos apoptóticos (Sf-9). Controle: aumento de 20x e células infectadas 40x.

As células UFLAG são muito promissoras quando pensamos em produção, pois são conhecidas pelo alto rendimento na expressão de proteínas recombinantes, mas ainda são pouco descritas na literatura. Seu comportamento e fisiologia não estão tão bem descritos quanto as células Sf-9. Este estudo inicial com as células UFLAG foi relevante pois observamos que a célula foi infectada, e que consegue prolongar seu ciclo de vida, o que a faria produzir mais proteínas recombinantes, porém, como este estudo é pioneiro em descrever as características do sistema comercial Bac-to-Bac[®], a melhor forma de se comparar e validar resultados é utilizando uma célula bem estudada, conhecida e também recomendada pelo fabricante do sistema de expressão utilizado, para que os resultados obtidos não sofram interferência do comportamento celular desconhecido. Isto não inviabiliza a utilização de células UFLAG para o sistema de expressão estudado, apenas nos mostra que é sim uma

célula muito interessante e que será estudada em fases mais avançadas da pesquisa de nosso grupo de trabalho.

Na Figura 13 é apresentando as fotomicrografias de cultivo de células Sf-9 infectadas com o baculovírus Bac sprec em três momentos. Amostras foram retiradas nos dias 4, 6 e 8 e a morfologia das células foram analisadas em microscopia óptica. Como pode ser observado, após 4 dias de infecção, as células infectadas aumentam de volume e o núcleo se torna visível. Com o passar do tempo o núcleo ocupa quase todo o volume celular, existe uma contração do núcleo da célula com formação de corpos apoptóticos e posterior lise celular. Curiosamente este aspecto morfológico é muito similar ao observado quando as células são infectadas com baculovírus recombinante contendo gene exógeno. O aumento do volume nuclear é devido ao aumento da produção do vírus.

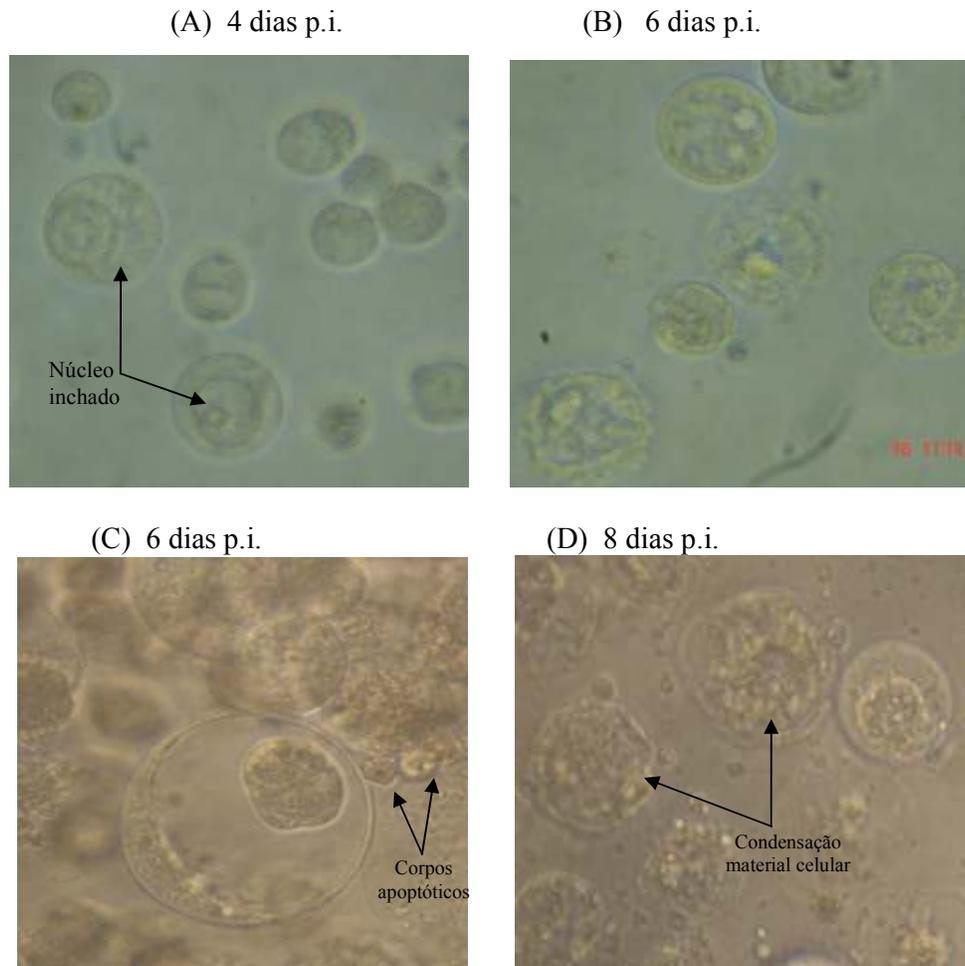


Figura 13. Fotomicrografia de células Sf-9 infectadas apresentando as características morfológicas padrões de infecção por baculovírus em três momentos. Os cultivos foram infectados com 1MOI de baculovírus Bac sprec e mantidos em agitação a 100 rpm/29°C e uma amostra foi obtida nos dias 4, 6 e 8 após a infecção. (A) e (B) Aumento de 20x; (C) e (D) aumento de 40 x (p.i. - pós infecção).

5.3 Perfil cromatográfico do sobrenadante de cultivos infectados

Para se determinar o perfil cromatográfico do sobrenadante dos cultivos foram realizadas cromatografias com coluna de gel filtração em um cromatógrafo de alta eficiência (Akta Purifier). No cromatograma do meio TC-100 considerado um meio básico, utilizado nos cultivos de UFLAG, não foi observado nenhum pico protéico, Figura 14(A). No entanto, quando a cromatografia foi realizada com meio Sf-900, utilizado nos cultivos de células Sf-9, vários picos protéicos foram observados. Este é um meio sintético, e formulado para a produção de proteínas recombinantes, onde teoricamente não deveria conter a presença de proteínas, mas como observado pode haver a presença de alguns fatores de crescimento, Figura 14 (B). O cromatograma do sobrenadante de cultivo realizado em meio Sf-900 e infectado com baculovírus selvagem (AcMNPV – Bac W), é mostrada na Figura 14 (C), sendo que o perfil cromatográfico obtido foi similar ao observado apenas com o meio. Quando a cromatografia foi realizada com o sobrenadante de cultivos infectados com o baculovírus Bac sprec da passagem 3, [Figura 14 (D)] e passagem 7 [Figura 14 (E)] um pico protéico de baixo peso molecular foi observado. Este pico protéico foi mais intenso com o sobrenadante de um cultivo realizado com a 7^a passagem. A quantidade desta proteína aumenta conforme o aumento do número de passagens do vírus, sugerindo que este sistema, mesmo sem a presença de gene recombinante, induz a produção de alguma proteína.

Os pico observados são de baixo peso molecular, baseados em padrões pré estabelecidos no protocolo de análise rotineiro do nosso laboratório.

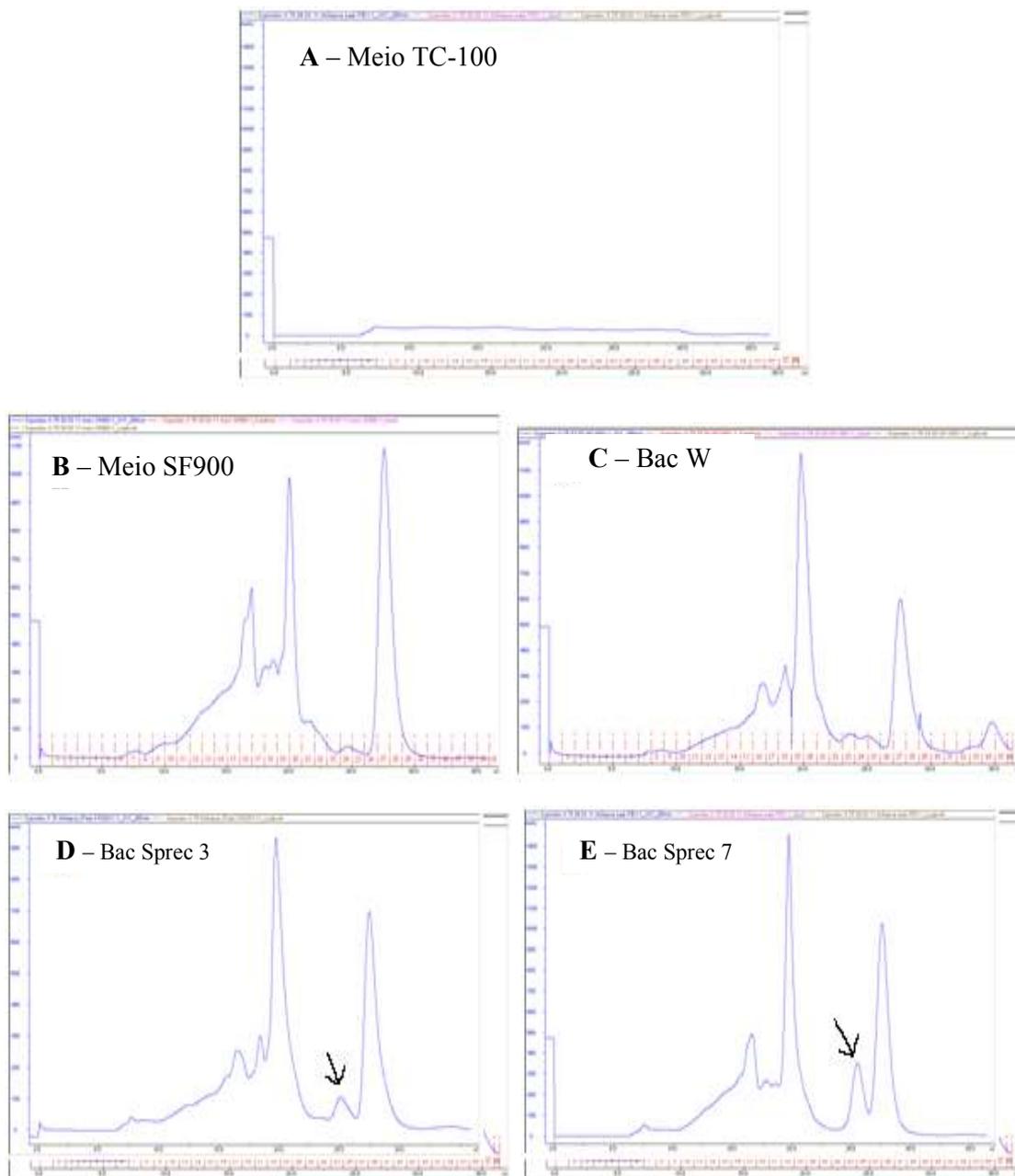


Figura 14. Perfil cromatográfico do sobrenadante de cultivos infectados e controles (somente meio de cultivo) obtidos por cromatografias de alta eficiência com coluna de gel filtração (Akta purifier). A) Meio básico TC-100 utilizado nos cultivos de UFLAG; B) Meio Sf-900, utilizado nos cultivos de células Sf-9; C) sobrenadante de cultivos infectados com o baculovírus selvagem (AcMNPV – Bac W), em Sf-9 e meio SF900; D) sobrenadante de cultivos infectados com o baculovírus Bac sprec da passagem 3; E) Sobrenadante de cultivos infectados com o baculovírus Bac sprec da passagem 7. As setas indicam a proteína produzida pelo Bac sprec.

5.4 Cinética de produção celular e consumo de nutrientes após infecção com o baculovírus vazio (Bac sprec)

Uma das características de cultivos de células infectadas por baculovírus é que o vírus paralisa a divisão celular. O momento de infecção (TOI) e a multiplicidade de infecção (MOI)

afetam diretamente o número de células infectadas tanto com baculovírus selvagem quanto com o recombinante. A densidade celular no momento da infecção e as condições do meio de cultivo também podem alterar a infectividade, segundo relatado por Kioukia, 1994. A infecção na fase estacionária de crescimento celular utilizando o mesmo meio de cultivo (sem trocas de meio no momento da infecção) pode levar a baixos rendimentos quando comparado a infecção na fase exponencial.

Como pode ser observada na Figura 15, a infecção dos cultivos com o baculovírus Bac sprec bloqueia a multiplicação celular. Neste experimento, células Sf-9 foram infectadas no início do cultivo, com 1 mL de sobrenadante de outro cultivo de células Sf-9 (144 horas p.i. e vírus de 3º passagem). Amostras foram obtidas diariamente e o número de células, bem como o consumo de aminoácidos foi determinado.

Os aminoácidos mais consumidos pelas células Sf-9, foram Serina, Glutamina, Cisteína Glicina e Asparagina.

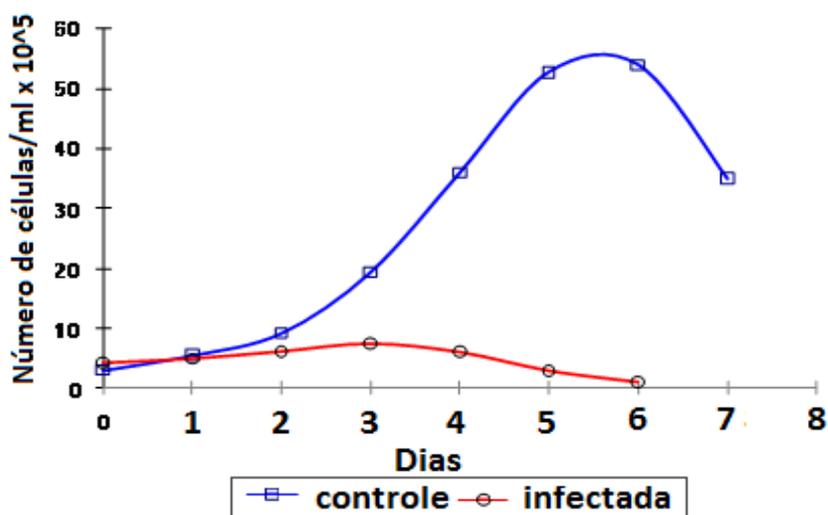


Figura 15. Cultivo de células Sf-9 infectadas ou não, no início do cultivo, com 1 mL de sobrenadante de baculovírus Bac sprec obtido de um cultivo infectado de 3º passagem (144 horas após a infecção). O crescimento da célula infectada com Bac sprec foi totalmente inibido.

5.4.1 Diferentes Multiplicidades de Infecção (MOIs)

Com o objetivo de determinar a quantidade ótima de vírus para infectar os cultivos, células Sf-9 foram infectadas no início do inoculo com 0,01; 0,1 ou 1 MOI de baculovírus.

Era esperado que de acordo com a quantidade de vírus utilizado, ocorreriam diferentes curvas de crescimento celular, sendo que os cultivos deveriam variar desde uma curva similar ao controle (quando infectadas com baixo MOI) até uma curva onde fosse totalmente inibido o crescimento celular (quando utilizado alto MOI).

Quando o baculovírus selvagem foi utilizado para infectar as células Sf-9, diferentes curvas de crescimento celular foram observadas de acordo com o inoculo viral. Nos cultivos infectados com baixo MOI, as células infectadas continuaram a crescer até que fossem infectadas pelo vírus produzido pelas células infectadas no início do cultivo (infecção secundária). Por outro lado, quando as células foram infectadas com alto MOI, praticamente não foi observado nenhum crescimento celular, pois com 10 MOI todas as células foram infectadas (Figura 16).

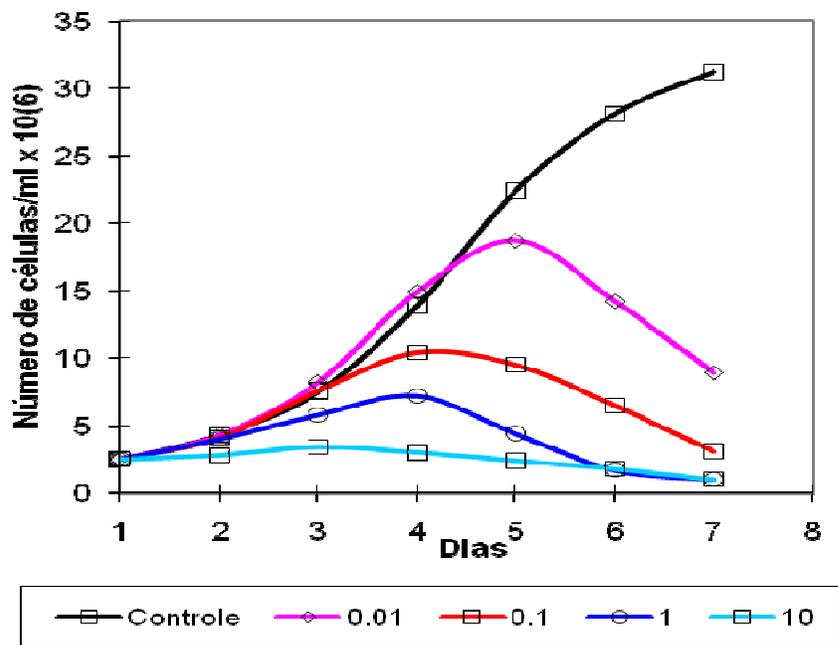


Figura 16. Cultivo de células Sf-9 infectadas no início do cultivo, com 10, 1, 0,1 e 0,01 MOI de baculovírus selvagem (AcMNPV).

Um comportamento não esperado foi observado quando as células Sf-9 foram infectadas com o bacmídeo Bac sprec. Ocorreu a inibição total de crescimento em todos os cultivos infectados, mesmo com baixo MOI (Figura 17). Kioukia, 1994 encontrou um comportamento similar, pois não observou diferenças significativas na infectividade quando utilizou um MOI alto e um MOI 50 vezes mais baixo. Com isso podemos concluir que o bacmídeo Bac sprec possui uma alta infectividade, mesmo com um baixo MOI, não sendo

necessária a adição de um alto MOI nos cultivos. Isto favorece comercialmente uma produção em grande escala, pois há uma economia utilizando menos vírus por célula.

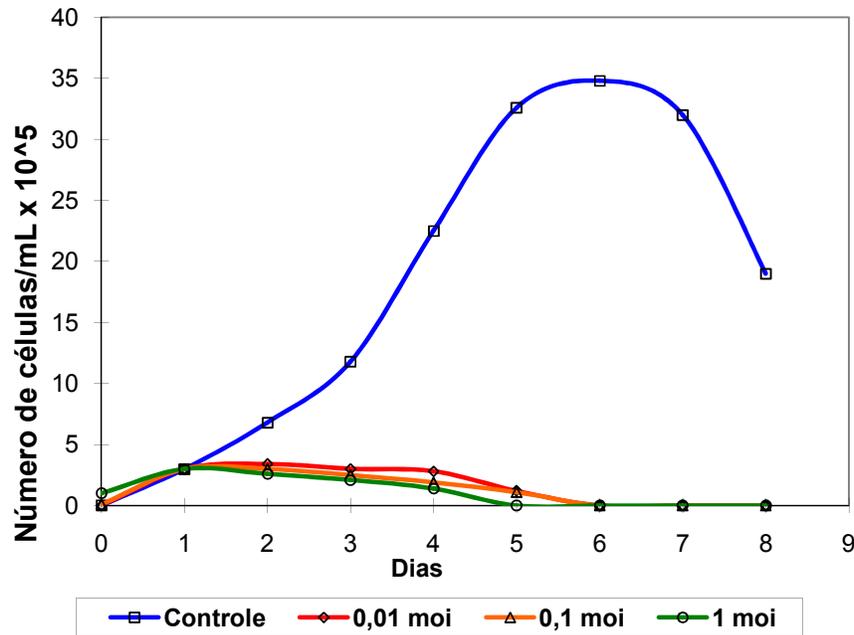


Figura 17. Cultivo de células Sf-9 infectadas ou não, no início do cultivo, com 1, 0,1 e 0,01 MOI de baculovírus Bac sprec. Mesmo com baixo MOI o cultivo de Bac sprec foi novamente totalmente inibido.

5.4.2 Diferentes Tempos de Infecção (TOIs)

Na Figura 18 é observado o efeito do momento de infecção no crescimento celular com baculovírus selvagem. Para isso, células Sf-9 foram infectadas com 1 MOI de baculovírus selvagem AcMNPV no momento do inoculo, na metade da fase exponencial e no final da fase exponencial.

O número de células obtido é dependente do momento da infecção, ou seja, se a infecção ocorrer no momento do inoculo, as células não conseguirão multiplicar-se por causa da infecção iniciada, mas se a infecção ocorrer após um período de grande multiplicação celular, será alcançado grandes densidades celulares no cultivo, podendo assim ocorrer uma maior produção de proteínas e de partículas virais.

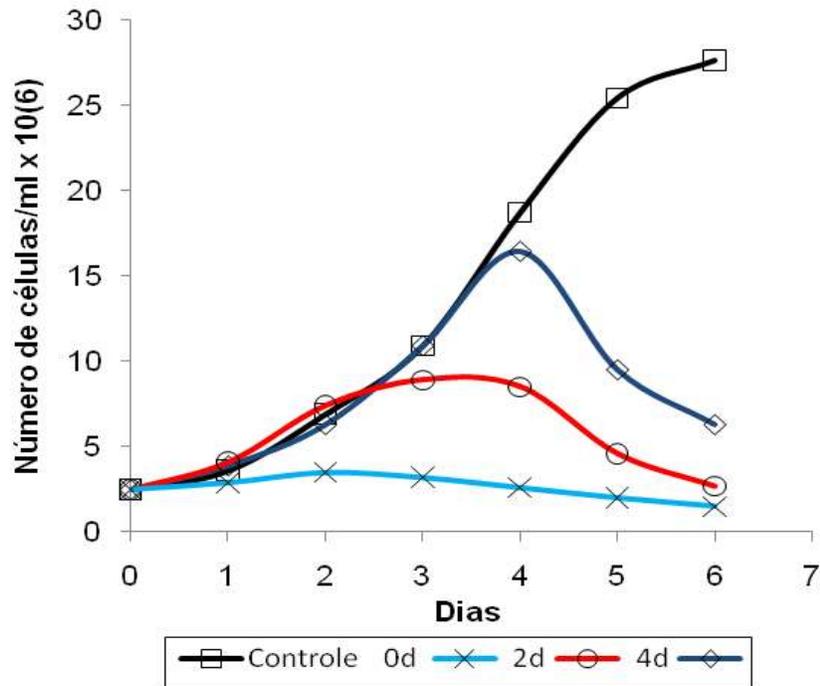


Figura 18. Cultivo de células Sf-9 infectadas com 1 MOI de baculovírus selvagem AcMNPV no início do cultivo, no 2º dia e no 4º dia.

O padrão de crescimento com as células infectadas com Bac sprec foi similar ao observado com o baculovírus selvagem (Figura 19).

Células Sf-9 foram infectadas com 1 MOI baculovírus Bac sprec na metade da fase exponencial (dia 3) e no final da fase exponencial (dia 5). Novamente, o número final de células obtidas é dependente do momento da infecção. Com estes dados confirmou-se que para se obter uma alta quantidade de proteínas recombinantes é necessária uma alta densidade celular. Para atingir este objetivo, é preciso realizar uma das seguintes metodologias: iniciar o cultivo com baixo MOI de infecção, ou iniciar uma cultura com alta densidade celular e com alto MOI de infecção. Mas conforme foi observado para o bacmídeo recombinante da Invitrogen™, a melhor estratégia é utilizar altas densidades celulares, pois mesmo com baixos MOIs o crescimento é inibido.

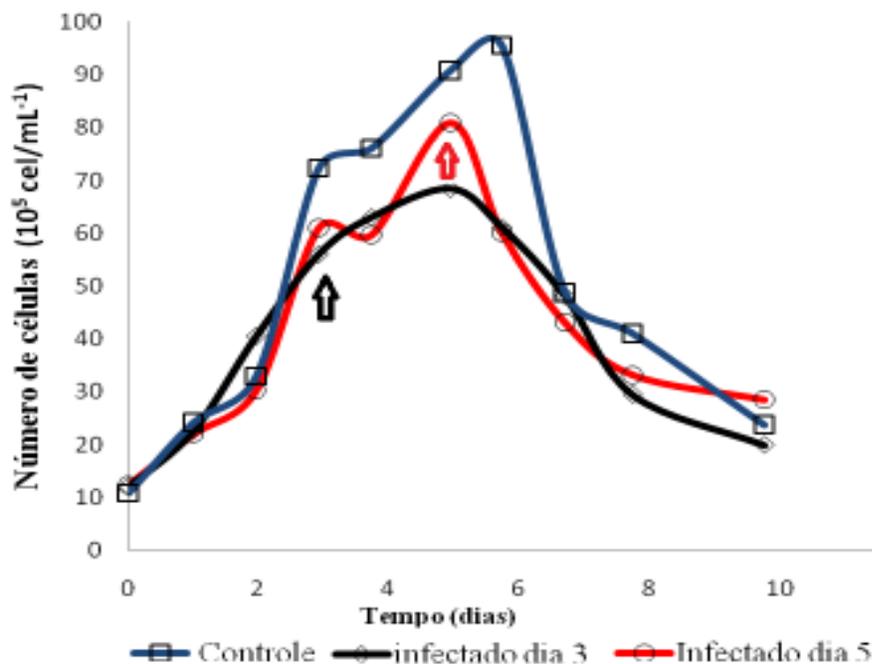


Figura 19. Células Sf-9 infectadas com 1 MOI de baculovírus Bac sprec na metade da fase exponencial (dia 3) e no final da fase exponencial (dia 5). As setas indicam o momento da infecção.

Na Figura 20 está apresentada a viabilidade celular do experimento acima. Como esperado a viabilidade celular diminui logo após a infecção celular, mostrando que o cultivo não apenas para de crescer, mas começa a morrer.

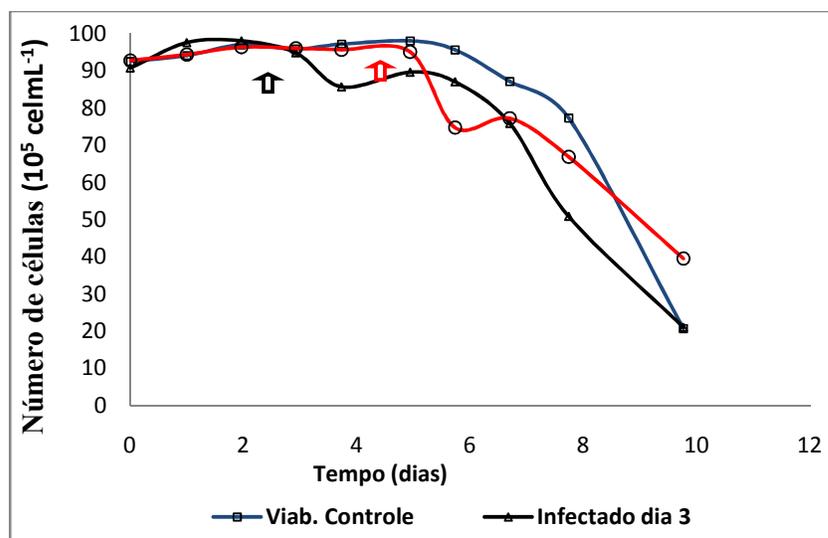


Figura 20. Viabilidade de células Sf-9 infectadas com 1 MOI de baculovírus Bac sprec na metade da fase exponencial (dia 3) e no final da fase exponencial (dia 5). As setas indicam o momento da infecção.

A presença de proteínas no sobrenadante de células Sf-9 infectadas com 1 MOI de baculovírus Bac sprec, na metade da fase exponencial (dia 3) ou no final da fase exponencial (dia 5) foi determinada pelo método descrito por Bradford, 1976 e está apresentada na Figura 21.

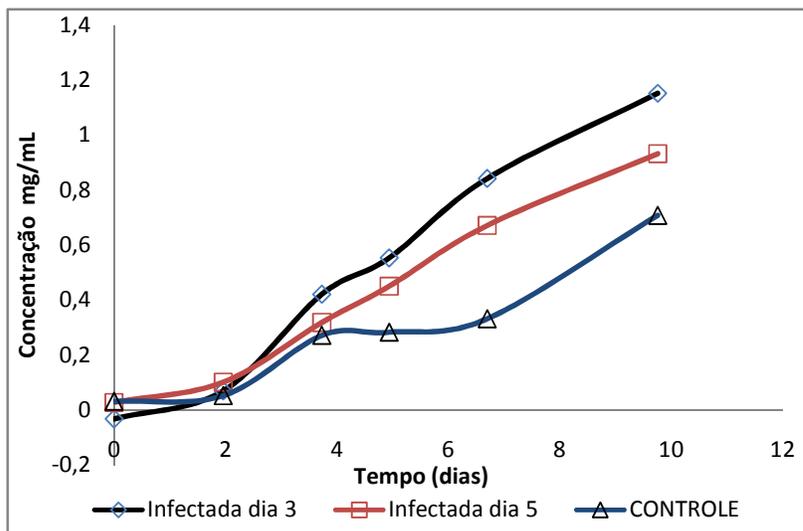


Figura 21. Produção de proteínas totais no sobrenadante de células Sf-9 infectadas com 1 MOI de baculovírus Bac sprec na metade da fase exponencial (dia 3) e no final da fase exponencial (dia 5).

A despeito do menor número de células, a concentração de proteínas totais observada no sobrenadante dos cultivos foi maior naquele infectado no dia 3. Isso sugere que estes cultivos possam produzir alguma proteína que está sendo secretada no sobrenadante.

5.5 Consumo de nutrientes e o efeito da concentração na infectividade viral

Como já foi demonstrado por Mendonça (1999), alguns nutrientes são consumidos, outros produzidos, enquanto outros não sofrem alteração em suas concentrações durante os cultivos de células Sf-9. A verificação do consumo de alguns nutrientes essenciais durante os cultivos infectados se faz necessária para um melhor aproveitamento do cultivo e também investigar o efeito da suplementação destes nutrientes na replicação viral e na produção de proteínas recombinantes. Isso porque, se houver falta de um destes componentes do meio de cultivo, essenciais a replicação do vírus ou na formação da proteína, o rendimento destes produtos serão afetados.

Como pode ser observado na Tabela 3, apenas 3 componentes foram esgotados nos cultivos infectados após 48 horas de cultivo, serina, glutamina e cisteína, sendo que a serina não se esgotou nos cultivos infectados com a proteína recombinante, provavelmente devido ao menor número de células. De todos os aminoácidos, apenas um deles, a alanina, teve aumento em sua concentração, pois é considerado um metabólito do metabolismo celular, e sua concentração muito elevada pode ser prejudicial à célula.

A glicose não foi totalmente consumida, não sendo considerada então limitante. Drews, 1995 observou que na presença de glicose os aminoácidos Asp, Glu, Asn, Ser, Arg e Met foram utilizados para a produção de energia em cultivos de Sf-9. Os grupos amino destes aminoácidos foram transferidos a piruvato e utilizados na síntese de ácidos nucleicos e excretados na forma de alanina.

Tabela 3. Concentração de aminoácidos e açúcares em cultivos de células Sf-9, infectados no início do cultivo com baculovírus com ou sem expressão de proteínas recombinantes.

Aminoácido Em g/L	Controle		Só Virus		Vírus + GUS		Bacsprec	
	Inicial	48h	Inicial	48h	Inicial	48h	Inicial	48h
Asparagina	10,55	8,33	13,92	13,51	11,54	7,25	14,09	7,46
Glutamato	14,44	6,77	17,15	15,49	15,85	9,89	17,1	11,28
Asparagina	12,31	10,65	12,64	14,56	13,85	10,99	14,93	10,64
Serina	4,02	0	4,46	2,52	4,50	1,93	4,71	2,75
Glutamina	4,16	0	4,82	0	4,67	0	4,69	2,02
Glicina	4,91	3,02	5,60	4,89	5,60	4,52	5,65	3,96
Histidina	2,39	1,68	2,44	2,54	2,49	1,87	2,44	1,88
Arginina	5,82	3,94	7,28	6,45	7,07	4,88	7,30	5,25
Treonina	3,05	1,54	3,62	3,03	3,63	2,37	3,71	2,66
Alanina	7,33	15,13	8,83	13,84	8,67	11,72	9,76	10,29
Prolina	6,14	4,56	7,32	6,74	7,07	5,12	7,30	5,47
Tirosina	1,59	0,46	1,81	1,32	1,70	1,00	1,87	1,26
Valina	7,03	4,81	8,23	7,52	7,99	5,63	8,22	6,23
Metionina	7,67	6,93	8,58	8,93	7,07	4,88	8,70	7,15
Cisteína	0,23	0	0,24	0,05	0,25	0,03	0,19	0,07
Isoleucina	8,17	6,44	9,18	8,94	9,20	6,69	9,33	7,31
Leucina	3,89	0,62	4,12	2,74	4,31	2,10	4,29	2,90
Phenilalanina	8,34	7,18	9,41	9,42	9,33	7,13	9,46	7,59
Lisina	6,26	3,93	7,29	6,43	7,03	5,00	7,37	5,18
Maltose	0,29	0,26	0,32	0,33	0,38	0,33	0,35	0,18
Glicose	1,45	0	1,77	1,14	1,64	0,98	1,62	0,83
Glicerol	0,19	0,08	0,25	0,20	0,24	0,22	0,22	0,14
Ác. Láctico	0,0	0,03	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ác. Acético	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ác. Formico	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

A partir destes resultados a averiguação da influencia da adição de aminoácidos no cultivo tornou-se necessária. Na Figura 22, é apresentado os dados obtidos de cultivos de células Sf-9 infectados com o baculovírus Bac sprec sendo dois com inoculo de 6ª passagem e dois com a 7ª passagem. Cada um destes cultivos foi suplementado com serina e glutamina.

A suplementação com os aminoácidos não demonstrou interferência no crescimento celular dos cultivos infectados. Neste caso, a viabilidade celular se manteve por um maior tempo em relação aos cultivos dos experimentos anteriores.

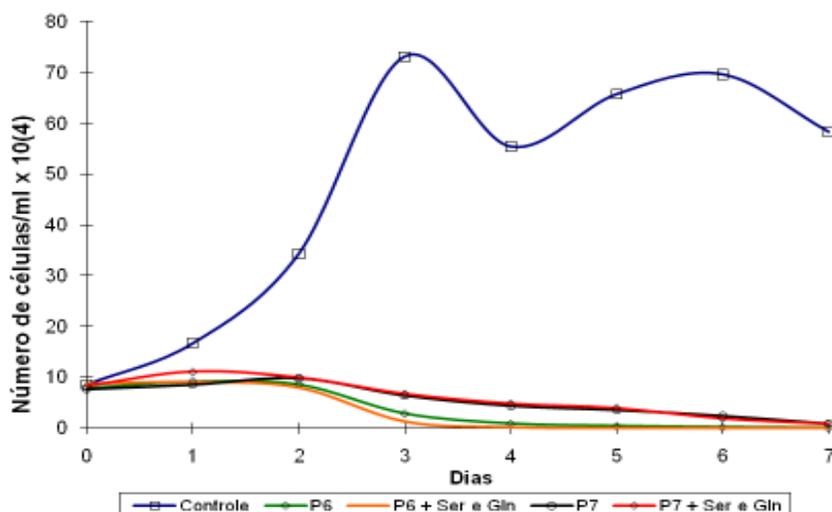


Figura 22. Cultivo de células Sf-9 infectadas ou não, no início do cultivo, com 1MOI de baculovírus Bac sprec de passagem 6 e 7. Em dois dos cultivos foi adicionado 4mM de serina e glutamina. O crescimento celular não sofreu alteração com a adição dos aminoácidos.

No experimento com alta concentração celular, o consumo de aminoácidos foi distinto dos anteriores (com baixa concentração celular no momento da infecção).

Nos cultivos infectados no dia 3 e 5 foi observada uma maior produção de proteínas no sobrenadante que levou a um maior consumo de aminoácidos, onde que no cultivo infectado no 3º dia foi totalmente consumido 4 aminoácidos (Ser, Gln, Cys e Gly), no cultivo infectado no 5º dia, a Ser e Cys foram totalmente consumidos, já no controle somente a serina se esgotou e a cisteína manteve-se em níveis bem baixos (Figura 23) sugerindo que este maior consumo de aminoácidos esteja ligado a maior produção de proteínas pelo cultivo infectado no dia 3.

No cultivo controle os aminoácidos são utilizados para o crescimento de biomassa (aumento no número de células), já nos cultivos infectados, não há aumento no número de células, então a utilização dos aminoácidos estaria desviada para a produção da proteína observada e para a replicação viral. Não foi realizado um balanço de massa para esta análise, mas os dados apresentados sugerem que isso realmente possa estar ocorrendo.

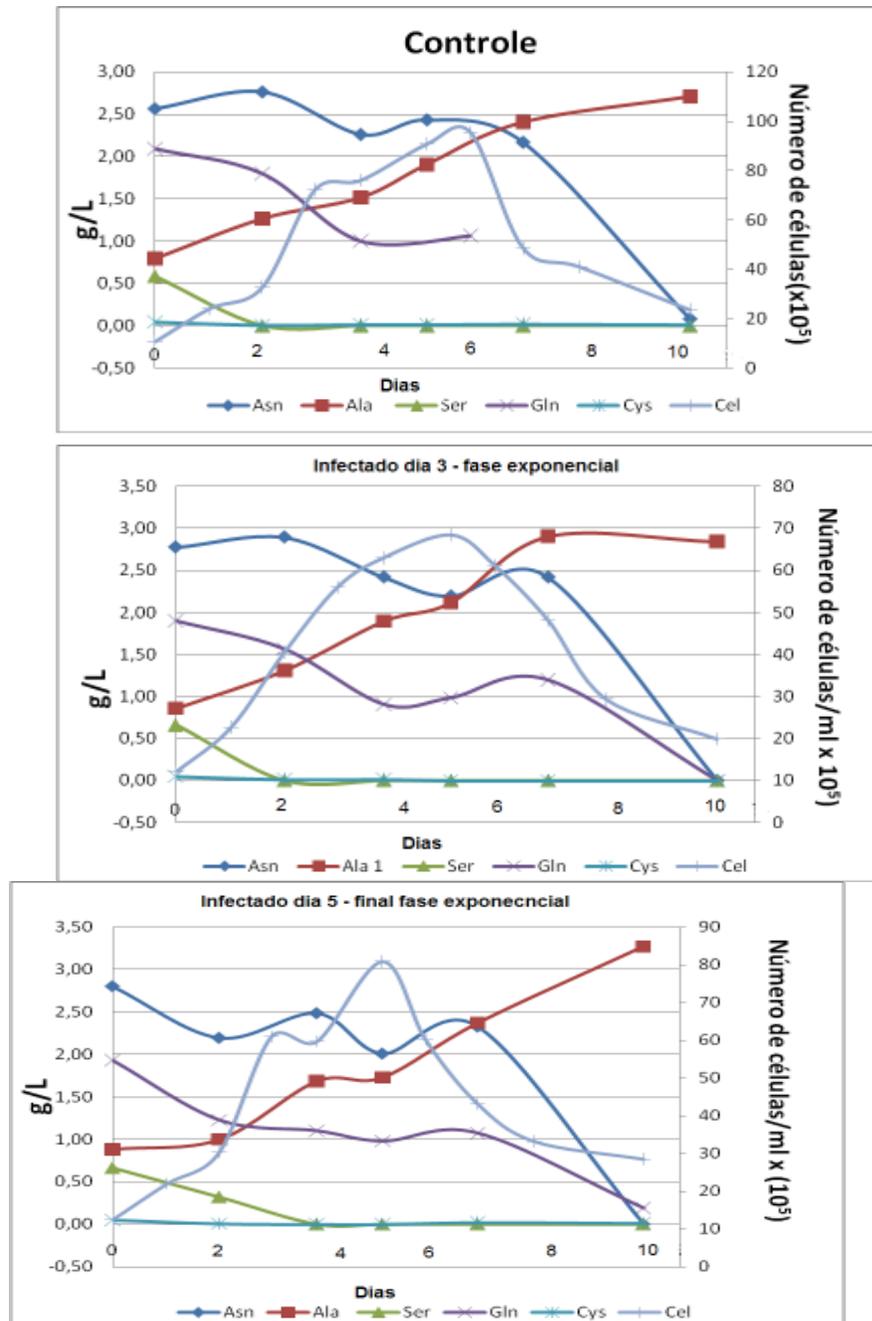


Figura 23. Consumo e produção de aminoácidos em cultivos de células Sf-9 infectadas com 1 MOI de baculovirus Bac sprec infectados na fase exponencial (dia 3), no final da fase exponencial (dia 5) e controle.

5.6 Ação de uma proteína antiapoptótica sobre a replicação do baculovírus

Uma das possíveis explicações para o efeito da alta infectividade, mesmo com um baixo MOI, um pequeno prolongamento da viabilidade celular e o maior consumo de aminoácidos pelos cultivos infectados com Bac sprec, é que alguma proteína poderia estar alterando o crescimento viral, como já foi observado em trabalho anterior quando o cultivo infectado foi tratado com uma proteína antiapoptótica (Mendonça, 2008).

Em trabalho do nosso grupo de pesquisa, citado anteriormente, foi observado que a presença de uma proteína antiapoptótica na hemolinfa da lagarta *Lonomia obliqua* estimulou a produção do baculovírus. O cultivo tratado com a proteína antiapoptótica, obteve o título de $2,7 \times 10^9$ TCID₅₀/mL em comparação com $4,2 \times 10^5$ TCID₅₀/mL de vírus produzido no cultivo controle, um aumento de mais de 3 log (6.428 vezes). Este aumento na produção de vírus poderia estar relacionado, pelo menos em parte, ao efeito antiapoptótico da proteína, permitindo a manutenção da viabilidade celular por um tempo mais prolongado, permitindo uma maior produção de vírus nas primeiras 48 horas.

O efeito sobre o crescimento celular observado quando a cultura foi infectada com o Bac sprec, mesmo com baixos MOI, pode estar relacionado ao efeito de alguma proteína produzida durante a infecção que simule a ação da proteína antiapoptótica descrita acima, aumentando a produção viral e agindo como se o cultivo fosse infectado com um inoculo viral muito maior.

Popham, 2010, estudou a expressão de proteínas celulares e virais durante a infecção de diferentes linhagens de células e baculovírus, observou uma diferença na expressão de proteínas entre as linhagens estudadas em 24hs p.i.. Com isso demonstrou que a infecção por baculovírus altera e modula a expressão de proteínas modificando em até 70% seu perfil de expressão.

Desta forma, podemos suspeitar que o baculovírus comercial da Invitrogen™ contido no sistema Bac-to-Bac® possa conter uma proteína com ação antiapoptótica além do p35, gene este constitutivo do vírus, pois este efeito não foi observado em cultivo de células infectadas com baculovírus selvagem.

Para comprovar este possível efeito, cultivos de células Sf-9 foram infectadas com 0,1 MOI do baculovírus Bac sprec, passagem 6 (P6) e com um baculovírus recombinante expressando a proteína recombinante GUS (Figura 24). Não houve crescimento celular no cultivo infectado com o baculovírus Bac sprec, demonstrando que todas as células foram infectadas, a despeito da quantidade de vírus utilizado na infecção não permitir isso. No

entanto, quando os cultivos foram infectados com o baculovírus recombinante GUS, que é idêntico ao Bac sprec, apenas com a sequência codificante do gene repórter β -glucuronidase a mais, o crescimento celular observado foi coerente com o inicialmente esperado, pois a quantidade de partículas virais utilizadas na infecção foi relativamente baixa, permitindo que células não infectadas continuassem a crescer.

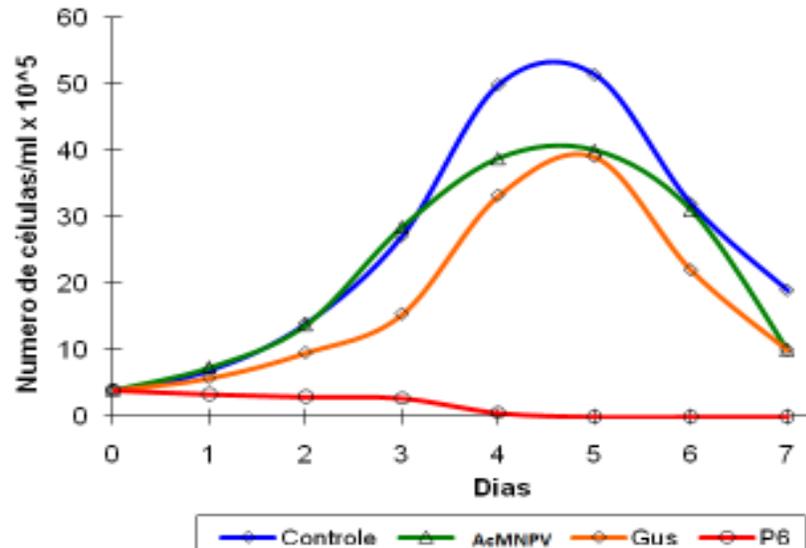


Figura 24. Cultivo de células Sf-9 infectadas ou não, no início do cultivo, com 0,1 MOI de baculovírus Bac sprec (P6), baculovírus expressando a proteína GUS e vírus selvagem (AcMNPV).

Na Figura 25, o título viral de cultivos de células Sf-9 infectadas com baculovírus Bac sprec (P6), baculovírus recombinante expressando a proteína GUS e baculovírus selvagem (W) foi determinado. As células foram infectadas no momento do inóculo e uma amostra foi obtida 144 horas após a infecção.

Apesar do cultivo celular ter seu crescimento bloqueado, as células remanescentes ainda ativas foram capazes de permitir uma alta replicação do baculovírus Bac Sprec (passagem 6). Isto demonstra a alta capacidade de replicação viral do bacmídeo comercial, que mesmo com baixa concentração celular consegue níveis altos de partículas virais, promovendo um alto rendimento na produção da proteína de interesse. Talvez esta maior replicação viral pode estar relacionada a proteína expressa não identificada ainda.

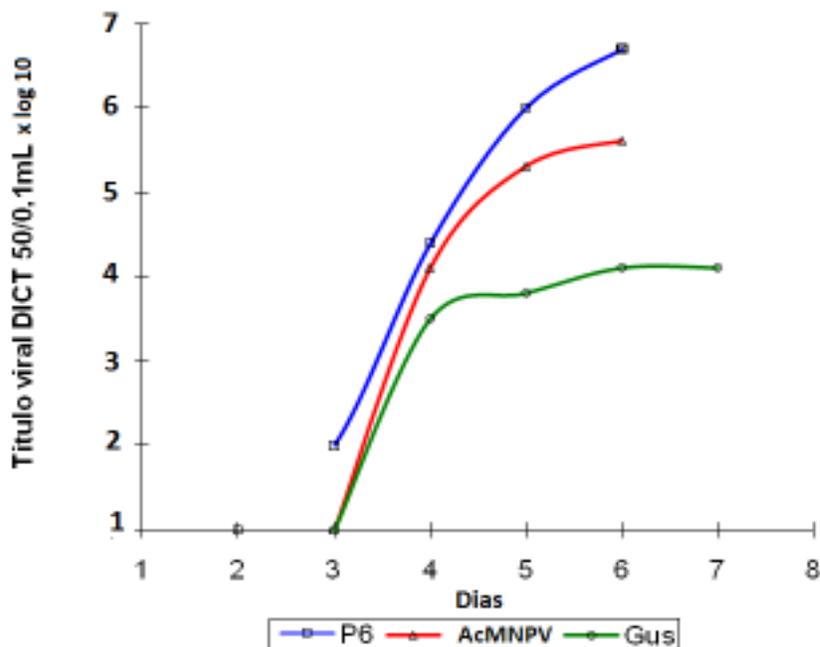


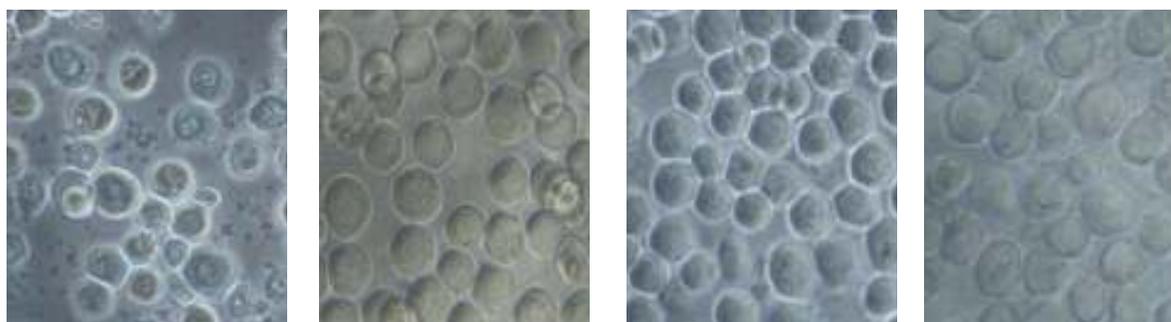
Figura 25. Título de baculovírus Bac sprec (P6), baculovírus recombinante expressando a proteína GUS e baculovírus selvagem AcMNPV. As células foram infectadas no momento do inoculo e uma amostra foi obtida 144 horas após a infecção. DICT₅₀ = dose infectante em cultivo de células capaz de infectar 50% das células.

5.7 Investigação da ação antiapoptótica

Já foi demonstrado que a hemolinfa de *Lonomia obliqua* é capaz de inibir apoptose induzida por vários agentes, sejam eles químicos, físicos ou fisiológicos, como a limitação de nutrientes essenciais (Souza, 2005). Na Figura 26 são apresentadas fotos de cultivos de células Sf-9, tratadas ou não no início do cultivo com hemolinfa total e com baculovírus Bac sprec.

A presença da hemolinfa em cultivo normal foi capaz de manter o cultivo com um aspecto morfológico melhor do que no controle, este efeito é explicado pela presença da proteína antiapoptótica (APLO) na hemolinfa.

No cultivo controle, sem adição de qualquer um dos suplementos é evidente a presença de células com morfologia de apoptose, já nos cultivos suplementados com a hemolinfa e nos cultivos de Bac sprec isso não ocorre, indicando a presença e a ação de uma proteína que induz proteção dos cultivos nas amostras das 3^a e 7^a passagens utilizadas.



Células Sf-9 (controle)

Células Sf9 +
Hemolinfa total

Células Sf9 +
sprec pass. 3

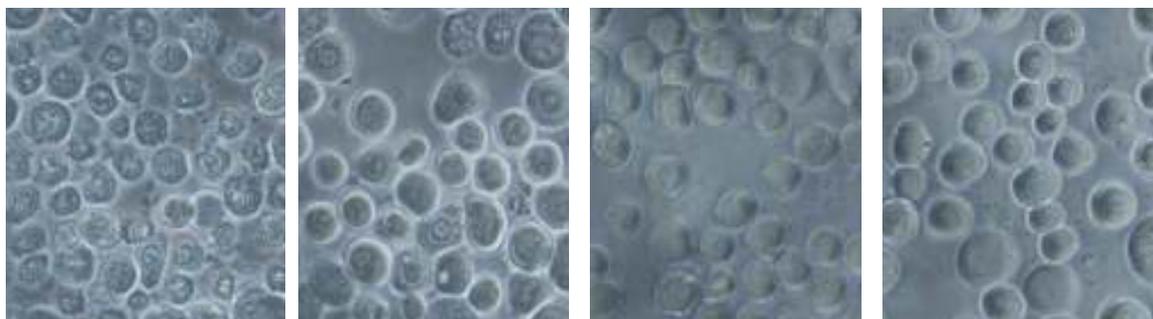
Células Sf9 +
sprec pass. 7

Figura 26. Efeito do baculovírus recombinante em células Sf-9. Células Sf-9 normais com 72 horas de cultivo em presença ou não de hemolinfa total ou com os baculovírus Bac sprec de 3^a e 7^a passagem. As células controle já mostram efeitos de apoptose como contração do núcleo e formação de corpos apoptóticos.

Na Figura 27, observa-se o efeito do terbutil na morfologia das células. Concentrações de 125µM a 1000 µM de terbutil foram adicionados no início do cultivo a fim de determinar a concentração capaz de provocar efeito citopático nas células.

O Terbutil é conhecido como um potente agente de stress oxidativo, atuando sobre o potencial elétrico da membrana das mitocôndrias, levando a indução do processo de apoptose por liberação de alguns fatores, como o citocromo C, no citosol.

A hemolinfa de *Lonomia obliqua* bloqueia esta ação, mantendo a membrana mitocondrial com alto potencial elétrico, evitando desta forma a indução do processo de apoptose. Como pode ser observado, as concentrações de 1000 µM e 500 µM foram suficientes para induzir o efeito esperado em células Sf-9 após 24 horas.



Sf9 + 1000µM TBHP

Sf9 + 500µM TBHP

Sf9 + 250µM TBHP

Sf9 + 125µM TB

Figura 27. Células Sf-9 em presença de diferentes quantidades de indutor de apoptose (terbutil). As concentrações de 1000µM e 500µM foram suficientes para provocar efeitos citopáticos nas células.

Na Figura 28, é possível observar que o sobrenadante obtido de cultivos infectados com Bac sprec da 3^a e 7^a passagem, foi capaz de bloquear a morte por apoptose induzida pelo terbutil, indicando a presença e atividade de uma proteína na proteção contra a apoptose, com capacidade similar a encontrada na hemolinfa da *L. obliqua*.

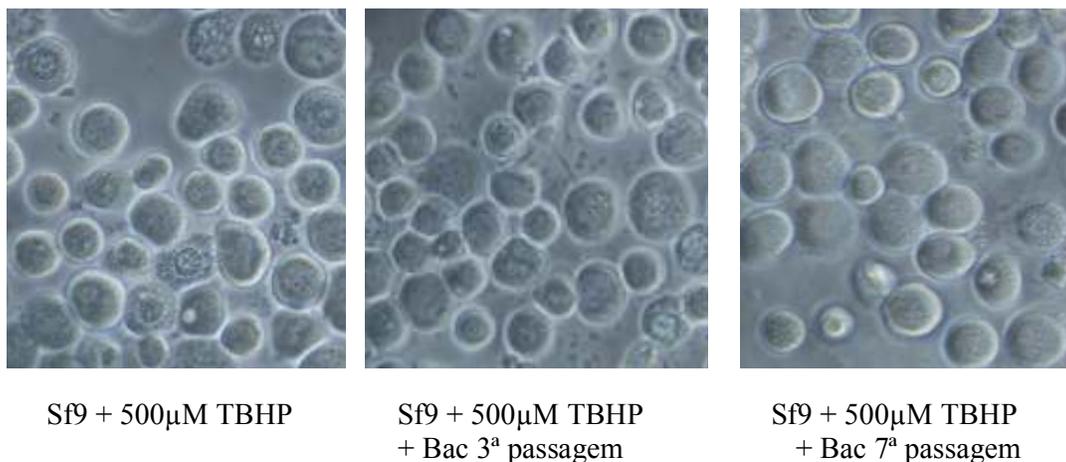


Figura 28. Efeito do baculovírus Bac sprec em células Sf-9 com indução de apoptose por terbutil (TBHP). Células Sf-9 foram tratadas no momento do inoculo com os baculovírus Bac sprec de 3^a e 7^a. Uma hora após a infecção, a morte por apoptose foi induzida nestes cultivos com 500µM de terbutil. Os cultivos foram mantidos em placas de 24 escavações a 29°C. Uma amostra foi obtida 24 horas após o início do experimento (aumento de 20x). Pode ser observado algumas células apoptóticas no cultivo controle e também no Bac sprec 3^a passagem, mas no cultivo Bac sprec 7^a passagem não observa-se a contração nuclear, nem a formação dos corpos apoptóticos.

5.8 Morfologia em cultivos estáticos infectados com Bac sprec

Uma das características observadas nos cultivos infectados com baculovírus Bac sprec em sistema estático, foi o aparecimento de uma estrutura de grandes dimensões contendo em seu interior várias células.

Na Figura 29, apresentamos fotos com a cinética de aparecimento deste fenômeno. Como pode ser observado, esta estrutura contém uma membrana que envolve células inteiras. Não há explicação para este evento, mas uma tentativa seria a modificação da superfície das membranas celulares, o que alteraria sua capacidade de adesão. Este efeito aumentou com o número de passagens do vírus e de acordo com o passar dos dias de cultivo. Este fenômeno foi observado apenas em cultivos estáticos realizados em garrafas. Quando os cultivos foram realizados em suspensão, sob agitação, isso não ocorreu.

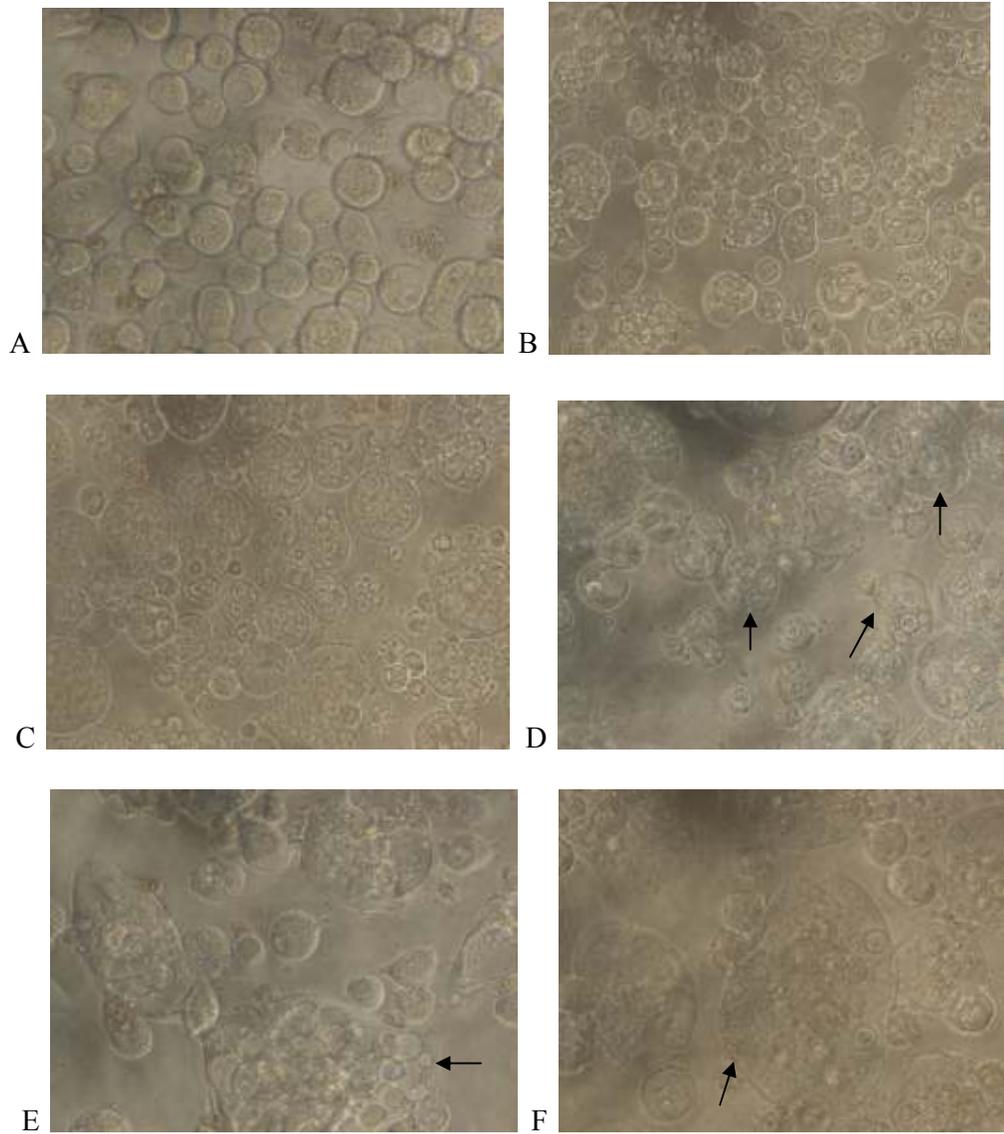


Figura 29. Fotomicrografia de células Sf-9 infectadas apresentando características morfológicas distintas dos padrões de infecção por baculovírus. Ocorre a formação de uma membrana envolvendo várias células. Os cultivos foram infectados com o baculovírus Bac sprec e mantidos de forma estática a 29°C. As fotos apresentadas são dos dias 4 a 9, de (A) a (F) respectivamente (aumento de 20x (A, B, C e D) e 40x (E e F). As setas indicam estas membranas com várias células dentro.

Na Figura 30 observam-se células do mesmo experimento em microscopia confocal, após coloração com laranja de acridina e brometo de etídio. Fica bem claro que as células dentro da estrutura mantêm sua morfologia. Estas células possuem uma morfologia característica de apoptose, com contração do núcleo celular.

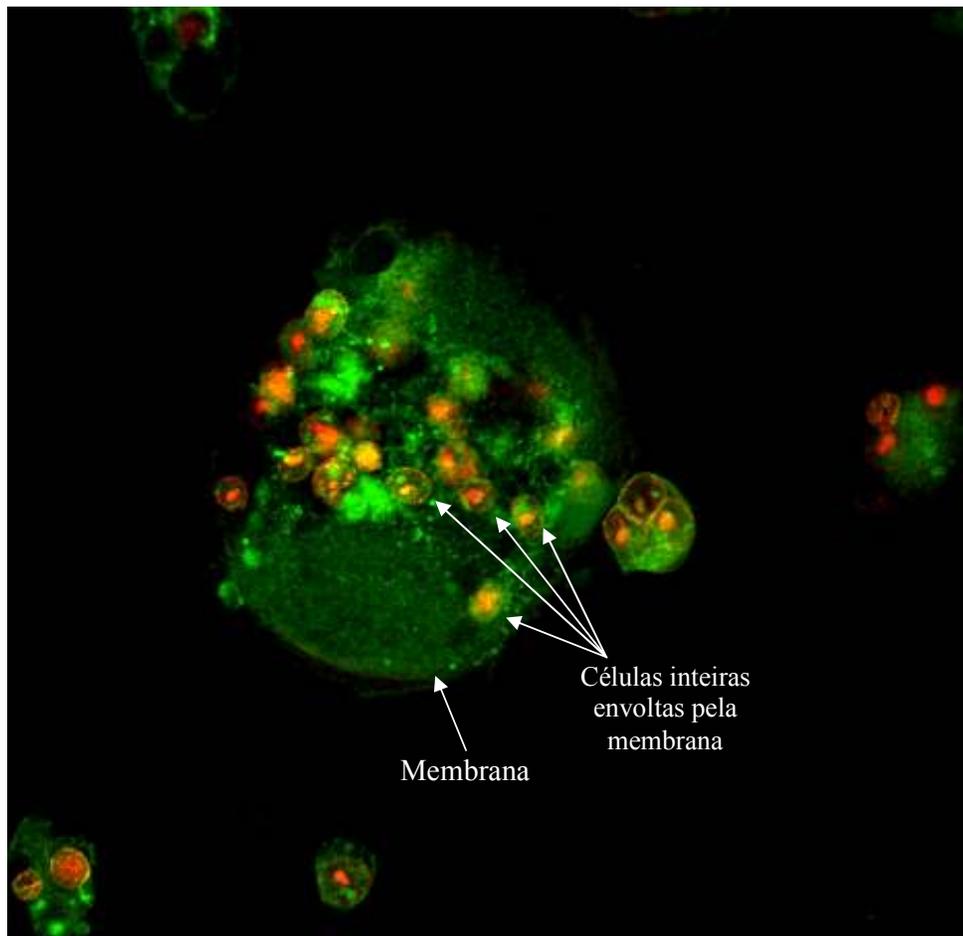
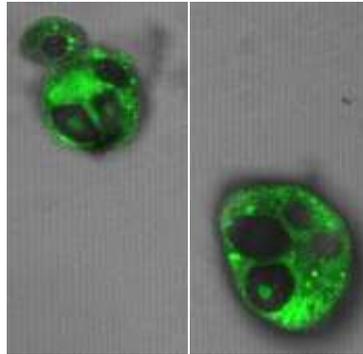


Figura 30. Fotomicrografia CONFOCAL de células Sf-9 infectadas apresentando características morfológicas distintas dos padrões de infecção por baculovírus. Ocorre a formação de uma membrana que envolve várias células inteiras. Os cultivos foram infectados com o baculovírus Bac sprec e mantidos de forma estática a 29°C. A amostra foi obtida no dia 6. Verde – células viáveis e laranja – células mortas.

Também é visível que toda a estrutura é envolta por uma espécie de membrana, que mantém o todo coeso. O ocorrido merece um estudo mais aprofundado, pois esta não é uma ocorrência normal em cultivo de células.

Já foi observado a formação de células gigantes multinucleadas após a infecção de células VERO com o vírus do Sarampo. Mas neste caso, a formação desta célula gigante se dá pela fusão das membranas celulares. No caso em estudo, as células permanecem individuais dentro da estrutura maior, a qual é envolta por uma espécie de membrana.

6. CONCLUSÕES

- 1) Células Sf-9, infectadas com Bac sprec tiveram seu crescimento inibido mesmo com baixa multiplicidade de infecção, o que não ocorre com o baculovírus selvagem (AcMNPV), indicando alguma alteração neste vírus comercial (Sistema Bac-to-Bac[®] - Invitrogen[™]).
- 2) O sobrenadante dos cultivos infectados com o Bac sprec na fase exponencial (dia 3) apresentaram 58% mais proteínas totais do que no cultivo controle. Estas proteínas foram observadas 48 horas após a infecção. O consumo de aminoácidos foi maior nestes cultivos onde houve uma maior produção de proteínas.
- 3) A adição de serina ou glutamina aos cultivos infectados no momento do inóculo não levou a uma maior produção viral.
- 4) Apenas 5 componentes foram esgotados nos cultivos (serina, glutamina, glicina, cisteína e glicose). A glicose esgotou somente no cultivo controle quando a infecção ocorreu no momento do inóculo e em todos os cultivos quando a infecção foi na fase exponencial de crescimento. De todos os aminoácidos, apenas um deles, a alanina, teve aumento em sua concentração não atingindo níveis tóxicos para a célula.
- 5) O sobrenadante de cultivos infectados com o Bac sprec foi capaz de inibir a morte celular em cultivos onde houve indução de apoptose por terbutil, indicando haver neste sobrenadante alguma proteína com atividade antiapoptótica. Este efeito não foi observado com o baculovírus selvagem (AcMNPV).

- 6) Os dados obtidos neste trabalho sugerem o bacmídeo comercial Bac-to-Bac[®], utilizado para expressão de proteínas ative um mecanismo de proteção celular, permitindo uma otimização da produção de proteínas recombinantes.
- 7) Como sugestões para trabalhos futuros temos que há a necessidade de inserção do gene da rAPLO, um aumento na escala de trabalho e um estudo e monitoramento de mais parâmetros como o oxigênio dissolvido e troca do meio no momento da infecção.

7. BIBLIOGRAFIA

ALVES, P.M.; CARRONDO, M.J.T.; CRUZ, P.E. Introdução à tecnologia de cultivo de células animais. Em: Cultivo de Células Animais: de biofármacos a Terapia Gênica. São Paulo. Editora Roca, 2007.

ARANTES, M.K. Construção e caracterização cinética e fisiológica de um sistema células Sf9/baculovírus recombinante para a produção de Canacistatina. 2007. 110 p. Dissertação de Mestrado. UFSCar, São Carlos.

AL-RUBEAI, M.; SINGH, R. P. Apoptosis in cell culture. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 9, n. 2, pág. 152-156, 1998.

BAC-TO-BAC[®] BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM: An efficient site-specific transposition system to generate baculovirus for high-level expression of recombinant proteins. Version E, Invitrogen Corporation, January 2009, 70 p.

BATISTA, F. R. X.; PEREIRA, C. A.; MENDONÇA, R. Z.; MORAES, A. M. Evaluation of concentrated milk whey as a supplement for Sf9 *Spodoptera frugiperda* cells in culture. **Electronic J Biotechnology**, vol. 9, n.5, pág. 522-532, 2006.

BOLLATI-FOGOLIN, M.; COMINI, N.A. Clonagem e expressão de proteínas heterólogas em células animais. Em: Moraes, A.M.; Augusto, E.F.P.; Castilho, L.R. Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica. São Paulo, Editora Roca, 2007

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, vol. 72, n. 1-2, pág. 248-254, 1976.

BRENNER, S.; HORNE, R.W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 34, pág. 103-110, 1959.

BUTLER, M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 68, pág. 283-291, 2005.

CARPENTIER, E.; LEBESGUE, D.; KAMEN, A. A.; HOGUE, M.; BOUVIER, M.; DUROCHER, Y. Increased production of active human β_2 -adrenergic/ gas fusion receptor in Sf-9 cells using nutrient limiting conditions. **Protein Expression and Purification**, vol. 23, pág. 66–74, 2001.

CASTRO, M. E. B; SOUZA, M. L.; SIHLER, W.; RODRIGUES, J. C. M; RIBEIRO, B. M. Biologia molecular de baculovirus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol. 34, n.10, 1999.

CHA, H. J.; SHIN, H. S.; LIM, H. J.; CHO, H. S.; DALAL, N. N.; PHAM, M. Q.; BENTLEY, W. E. Comparative Production Of Human Interleukin-2 Fused With Green Fluorescent Protein In Several Recombinant Expression Systems. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 24, pág. 225–233, 2005.

CLARK, K. B.; LIN, S.; HUMPHREY, C.; FOYTICH, K.; ESONA, M.; WANG, Y.; LIU, M.; JIANG, B. Expression and characterization of human group C rotavirus virus-like particles in insect cells. **Virology**, vol. 387, pág. 267–272, 2009.

CLEM, R.J. Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad, and the Ugly. **Cell Death and Differentiation**, vol. 8, pág. 137 – 143, 2001.

CLEM, R.J.; HARDWICK, J.M.; MILLER, L.K. Anti- apoptotic genes of baculoviruses. **Cell Death and Differentiation**, vol. 3, pág. 9-16, 1996.

COHEN, J.J.; DUKE, R.C. Apoptosis and Programmed Cell Death in Immunity. **Annual Review of Immunology**, vol. 10, pág. 267-293, 1992.

COSTA, M.H.O. Construção de vetor baculoviral modificado capaz de produzir proteínas fusionadas à poliedrina. 2008. 148p. Dissertação de Mestrado. UNB, Brasília.

CHU, L; ROBINSON, D.K. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. **Biotechnology**, vol. 12, pág. 180–187, 2001.

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

ERIC CARPENTIER, E.; LEBESGUE, D.; KAMEN, A.A.; HOGUE, M.; BOUVIER, M.; DUROCHER, Y. Increased Production of Active Human β -Adrenergic/ G Fusion Receptor in Sf-9 cells using nutrient limiting conditions. *Protein Expression and Purification*, vol. 23, pág 66 – 74, 2001.

FERRI, K. F.; JACOTOT, E.; BLANCO, J.; ESTÉ, J. A.; ZAMZAMI, A.; SUSIN, S. A.; BROTHERS, G.; XIE, Z.; REED, J. C.; PENNINGER, J. M.; KROEMER, G. Apoptosis control in Syncytia induced by the HIV type 1-envelope glycoprotein complex: role of mitochondria and caspases. **J. Exp. Med**, vol. 192, n. 8, pág. 1081-1092, 2000.

FRESHNEY, R.I. *Culture of Animal Cells: a manual of basic technique*. 5. ed. New York: Wiley-Liss; 2005.

GLÜCKSMANN, A. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. **Biological Reviews**, vol. 26, n.1, pág 59–86, 1951.

GRANADOS, R. R.; LI, G.; BLISSARD, G. W. Insect cell culture and biotechnology. **Virologica Sinica**, vol. 22, n. 2, pág. 83-93, 2007.

GIORIA, V. V.; BECCARÍA, A. J.; CLAUS, J. D. Crecimiento, metabolismo y producción de baculovirus en cultivos en suspensión de una línea celular del insecto lepidóptero *Anticarsia gemmatilis*. **Química Viva**, n. 1, ano 5, 2006.

GREENFIELD, C.; PATEL, G.; CLARK, S.; JONES, N.; WATERFIELD, M.D. Expression of the human EGF receptor with ligand-stimulatable kinase activity in insect cells using a baculovirus vector. **Embo Journal**, vol. 7, n. 1, pág. 139-146, 1988.

HAYAT, M.A.; MILLER, S.E. Negative Staining. New York, McGraw-Hill, 1990.

HASEMANN, C. A.; CAPRA, J. D. High-Level Production of a functional immunoglobulin heterodimer in a baculovirus expression system. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, vol. 87, pág.3942-3946, 1990.

HENRIKSON R. L.; MEREDITH S. L. Amino acid analysis by reverse-phase high performance liquid chromatography in differentiating mouse astrocytes in primary culture. **Dev. Neurosci.**, vol. 1, pág. 226–237, 1984.

HERSHBERGER, P.A.; LA COUNT, D.J.; FRIESEN, P.D. The apoptotic suppressor P35 is required early during baculovirus replication and is targeted to the cytosol of infected cells. **Journal of Virology**, vol. 68, pág.3467-3477, 1994.

HILLAR, A.; OTULAKOWSKI, G.; O'BRODOVICH, H. Purification and characterization of a recombinant rat pro-haptoglobin expressed in baculovirus-infected Sf9 insect cells. **Protein Expression and Purification**, vol. 55, pág. 246–256, 2007.

HITCHMAN, R. B.; POSSEE, R. D.; KING, L.A. Baculovirus expression systems for recombinant protein production in insect cells. **Recent Patents on Biotechnology**, vol. 3, pág. 46-54, 2009.

HORTA, M.F. Apoptose, quando a célula programa a própria morte. **Ciência Hoje**, vol. 25, n. 150, pág. 38-45, 1999.

JARVIS, D. L.; FLEMING, J. G. W.; KOVACS, J. R.; SUMMERS, M. D.; GUARINO, L. A. Use of early baculovirus promoters for continuous expression and efficient processing of foreign gene products in stably transformed Lepidopteran cells. **Nature Biotechnology**, vol. 8, pág. 950 – 955, 1990.

KAMITA, S.G.; MAJIMA, K.; MAEDA, S. Identification and characterization of the p35 gene of Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus that prevents virus-induced apoptosis. **Journal Of Virology**, vol.67, n. 1, pág. 455-463, 1993.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, vol. 26, pág. 239–257, 1972.

KIOUKIA, N.; NIENOW, A.W.; EMERY, A.N.; AL-RUBEAI M. Physiological and environmental factors affecting the insect cells and infection with baculovirus. **Journal of Biotechnology**, vol. 38, pág. 243-251, 1995.

KLASSEN, C. H. W.; BOVEE-GEURTS, P. H.; DECALUWÉ, G. L.; DEGRIP, W. J. Large-scale production and purification of functional bovine rhodopsin with the use of baculovirus expression system. **Biochemical Journal**, vol. 342, pág. 293-300, 1999.

KOST, T.A.; CONDREAY, J.P.; JARVIS, D.L. Baculovirus as a versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. **Nature Biotechnology**, vol. 23, n. 5, 2005.

KRETZMER, G. Industrial processes with animal cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 59, pág. 135-142, 2002.

KROEMER, G.; REED, J.C. Mitochondrial control of cell death. **Nature Medicine**, vol. 6, pág. 513-519, 2000.

LI, X.; WANG, D.; ZHOU, F.; YANG, H.; BHASKAR, R.; HU, J.; SUN, C.; MIAO, Y. cloning and expression of a cellulase gene in the silkworm Bombyx mori by improved Bac-

To-Bac/Bmnpv baculovirus expression system. **Mol Biol Rep**, vol. 37, pág. 3721–3728, 2010.

LI, X.; WANG, X.; XIONG, S.; ZHANG, J.; CAI, L.; YANG, Y. Expression and purification of recombinant nattokinase in *Spodoptera frugiperda* cells. **Biotechnology Letters**, vol. 29, pág. 1459–1464, 2007.

LIN, G.; LI, G.; GRANADOS, R.R.; BLISSARD, G.W. Stable cell lines expressing baculovirus P35: resistance to apoptosis and nutrient stress, and increased glycoprotein secretion. **In Vitro Cell. Dev. Biol.—Animal**, vol. 37, pág. 293–302, 2001.

LUCKOW, V. A.; LEE, S.C.; BARRY, G. F.; OLINS, P. O. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. **J Virology**, vol. 67, n.8, pág. 4566-4579, 1993.

LUCKOW, V.M. Cloning and expression of heterologous genes in insect cells with baculovirus vectors. Em: *Recombinant DNA Technology and Applications*. McGraw-Hill, Inc, NY, 97-153, 1991.

LUQUE, T.; O'REILLY, D.R. Generation of baculovirus expression vectors. **Molecular Biotechnology**, vol.13, pág. 153-163, 1999.

MARANGA, L.; MENDONÇA, R. Z.; BENGALA, A.; PEIXOTO, C. C.; MORAES, R. H. P.; PEREIRA, C. A.; CARRONDO, M. J. T. Enhancement of Sf9 cells growth and longevity through supplementation of culture medium with hemolymph. **Biotechnol Prog**, vol. 19, pág. 58-63, 2003.

MARZO, L.; BRENNER, C.; ZAMZAMI, N.; JÜRGENSMEIER, J.; SUSIN, S. A.; VIEIRA, H. L. A.; PRÉVOST, M-C.; XIE, Z.; MUTSIYAMA, S.; REED, J. C.; KROEMER, G. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. **Science**, vol. 281, pág. 2027-2031, 1998.

MASROORI, N.; HALABIAN, R.; MOHAMMADIPOUR, M.; ROUSHANDEH, A.M.; ROUHBAKHSH, M.; NAJAFABADI, A.J.; FATHABAD, M.E.; SALIMI, M.; SHOKRGOZAR, M.A.; ROUDKENAR, M.H. High-level expression of functional recombinant human coagulation factor VII in insect cells. **Biotechnology Letters**, vol. 32, pág. 803–809, 2010.

MENDES, D.N. Construção de baculovirus recombinantes contendo o gene da pró-renina humana. 2006. 121p. Dissertação de Mestrado (Patologia Molecular). Universidade de Brasília. Brasília, DF.

MENDONÇA, R.Z.; ARRÓZIO, S.J.; ANTONIAZZI, M. M.; FERREIRA JR., J.M.C.; PEREIRA, C.A. Metabolic active-high density Vero cell cultures on microcarriers following apoptosis prevention by galactose/glutamine feeding. *Journal of Biotechnology*, vol. 97, n.1, pág. 13-22, 2002.

MENDONÇA, R.Z.; GRECO, K.N.; SOUZA, A.P.B.; MORAES, R.H.P.; ASTRAY, R.M.; PEREIRA, C.A. Enhance effect of a protein obtained from *Lonomia obliqua* hemolymph in the recombinant protein production. **Cytotechnology**, vol. 57,n.1, pág. 83-91, 2008.

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

MENESES-ACOSTA, A.; MENDONÇA, R.Z.; MERCHANT, H.; COVARRUBIAS, L.; RAMÍREZ, O.T. Comparative characterization of cell death between Sf9 insect cells and hybridoma cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 72, n. 4, pág. 441-457, 2001.

MERCILLE, S.; MASSIE, B. Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells. **Biotechnol Bioeng**, vol. 44, pág 1140–115, 1994.

MIRZAEI, M.; JARDIN, B.; ELIAS, C.B.; PRAKASH, S. Expression and production of human interleukin-7 in insect cells using baculovirus expression vector system (BEVS). **Applied Biochemistry And Biotechnology**, vol. 151, n. 1, pág. 93-103, 2008.

MORAES, A.M. AUGUSTO, E.F.P.; CASTILHO, L.R. Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica. São Paulo, Editora Roca, 2007.

MORAIS, V. A.; SERPA, J.; PALMA, A. S.; COSTA, T.; MARANGA, L. COSTA, J. Expression and characterization of recombinant human α -3/4-fucosyltransferase III from *Spodoptera frugiperda* (Sf9) and *Trichoplusia ni* (Tn) cells using the baculovirus expression system. **Biochemical Journal**, vol. 353, pág. 719–725, 2001.

MORISHIMA, N.; OKANO, O.; SHIBATA, T.; MAEDA, S. Homologous p35 proteins of baculoviruses show distinctive anti-apoptotic activities which correlate with the apoptosis-inducing activity of each virus. **FEBS Letters**, vol. 427, pág. 144-148, 1998.

PEDRINI, M. R. S.; MENDONÇA, R. Z. Bioinseticidas. Em Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica. São Paulo, Editora Roca, 2007.

POPHAM, H. J. R.; GRASELA, J. J.; GOODMAN, C. L.; MCINTOSH, A. H. Baculovirus infection influences host protein expression in two established insect cell lines. **Journal of Insect Physiology**, vol. 56, pág. 1237–1245, 2010.

RABIZADEH, S.; LACOUNT, D.J.; FRIESEN, P.D.; BREDESEN, D.E. Expression of the baculovirus p35 gene inhibits mammalian neural cell death. **Journal of Neurochemistry**, vol. 61, n. 6, pág. 2318–2321, 1993.

RAFFOUL, T.; SWIECH, K.; ARANTES, M. K. Performance evaluation of CHO-K1 cell in culture medium supplemented with hemolymph. **Braz Arch Biol Technol**, vol. 48, pág. 85-95, 2005.

REED, L. J. & MUENCH, H. Simple method of estimating fifty per cent endpoints. **Am. J. Epidemiology**, vol. 27, n. 3, pág. 493-497, 1938.

SHIMIZU, S.; MATSOKA, Y.; SHINOHARA, Y.; YONEDA, Y.; TSUJIMOTO, Y. Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells. **Cell Biol**, vol. 152, n. 2, pág. 237-50, 2001.

SHIMIZU, S.; NARITA, M.; TSUJIMOTO, Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. **Nature**, vol. 399, pág. 483-487, 1999.

SMITH^a, G.E.; FRASER, M.J.; SUMMERS, M.D. Molecular engineering of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome: deletion mutations within the polyhedrin gene. **Journal of Virology**, vol. 46, pág. 584-593, 1983.

SMITH, G. E.; SUMMERS, M.D.; FRASER, M. J. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. **Molecular and Cellular Biology**, pág. 2156-2165, Dezembro, 1983.

SMITH, G.E.; JU, G.; ERICSON, B.L.; MOSCHERA, J.; LAHM, H.W.; CHIZZONITE, R.; SUMMERS, M.D. Modification and secretion of human interleukin 2 produced in insect cells by a baculovirus expression vector. **Proc Natl Acad Sci USA**, vol. 82, n. 24, pág. 8404-8408, 1985.

SOUZA, A. P. B.; PEIXOTO, C. C.; MARANGA, L. Purification and characterization of an anti-apoptotic protein isolated from *Lonomia obliqua* hemolymph. **Biotechnology Progress**, vol. 21, pág. 99-105, 2005.

STEINER, H.; POHL, G.; GUNNE, H.; HELLERS, M.; ELHAMMER, A.; HANSSON, L. Human tissue-type plasminogen activator synthesized by using a baculovirus vector in insect cells compared with human plasminogen activator produced in mouse cells. **Gene**, vol. 73, n. 2, pág. 449-57, 1998.

TAYLOR, A. L.; HAZE-FILDERMAN, A.; BLUMENFELD, A.; SHAY, B.; DAFNI, L.; ROSENFELD, E.; LEISER, Y.; FERMON, E.; GRUENBAUM-COHEN, Y.; DEUTSCH, D. High yield of biologically active recombinant human amelogenin using the baculovirus expression system. **Protein Expression and Purification**, vol. 45, pág. 43-53, 2006.

UREN, A.G.; VAUX, D. L. Viral inhibitors of apoptosis. **Vitamins And Hormones**, vol. 53, pág. 175-193, 1997.

WICKHAM, T.J.; DAVIS, T.; GRANADOS, R.R.; SHULER, M.L.; WOOD, H.A. Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus expression system. **Biotechnol Prog**, vol. 8, n. 5, pág. 391-396, 1992.

WOJCHOWSKI, D.M.; ORKIN, S.H.; SYTKOWSK, A.J. Active human erythropoietin expressed in insect cells using a baculovirus vector: a role for N-linked oligosaccharide. **Biochem Biophys Acta**, vol. 910, pág. 224-232, 1987.

ZHANGJ, J.; KalogerakisJ, N.; Behie, L.A.; Iatrod, K. Optimum infection conditions for recombinant protein production in insect cell (Bm5) suspension Culture. **Biotechnology Prog.**, vol. 10, pág. 636-643, 1994.