

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Estudo do Efeito da Densidade Celular na Interação  
Baculovírus – Célula de Insecto:  
Perspectiva Metabólica**

Francisca Sarreira Simões Horta Monteiro

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2009

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Estudo do Efeito da Densidade Celular na Interação  
Baculovírus – Célula de Insecto:  
Perspectiva Metabólica**

Dissertação de mestrado sob a orientação de:

Professora Doutora Filomena Caeiro

Doutora Paula Alves

Francisca Sarreira Simões Horta Monteiro

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2009

Tese de mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, realizada no Laboratório de Tecnologia de Células Animais do Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica/Instituto de Tecnologia Química e Biológica (IBET/ITQB), sob a orientação da Doutora Paula Alves e do Doutor Vicente Bernal.

## **Agradecimentos**

À Doutora Paula Alves, pela oportunidade de realizar este estágio de mestrado no Laboratório de Tecnologia de Células Animais, pelo exemplo de liderança, pelas excelentes condições e ambiente proporcionados, e pelo financiamento atribuído durante a realização do mesmo.

Ao Professor Manuel Carrondo, pelo seu exemplo em Ciência de rigor e exigência.

À Professora Doutora Maria Filomena Caeiro, por aceitar ser a minha orientadora interna, pela simpatia, disponibilidade e interesse demonstrados ao longo da minha tese, e pela revisão da mesma.

Ao corpo docente do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, pelos conhecimentos transmitidos. Em particular, ao Professor Rogério Tenreiro por toda a atenção e conhecimentos disponibilizados.

Ao Doutor Vicente Bernal, com quem é um privilégio trabalhar. Por todo o conhecimento transmitido, pelo exemplo de cientista e pessoa que é. Por toda a confiança que depositou em mim, pela paciência e compreensão nos momentos difíceis, pelo companheirismo e amizade.

Ao Nuno Carinhas, pelos ensinamentos, boa disposição e motivação transmitidos. Acima de tudo, por mostrar que a inteligência, rigor científico e boa disposição podem coexistir harmoniosamente.

A todos os colegas do TCA, sem exceção, pelo bom ambiente de trabalho. Um agradecimento particular às Eng.<sup>as</sup> Maria Cândida Mellado e Ivette Pacheco pela disponibilidade, discussões proveitosas de trabalho, e acima de tudo pela enorme força, carinho e amizade.

Ao Paulo, por este percurso de estagiários, por ser um amigo e companheiro de luta.

À minha colega e amiga Filipa, por ser quem é. Pela cumplicidade partilhada, pelo apoio nos momentos mais difíceis, por estar sempre presente.

A todos os meus amigos de faculdade e de curso. Em particular, à Ana Maria e às Catarina por todos os bons momentos, espírito de equipa e amizade.

Aos meus amigos de sempre. À Guida, por ser a amiga de sempre e para sempre. À Filipa e à Rita pela alegria e energia constantes.

A toda a minha família e, claro, aos meus pais e irmãos, que são as pessoas mais importantes da minha vida. Por me transmitirem valores tão importantes como a perseverança, sensatez e honestidade. Por acreditarem sempre em mim, pelo apoio incondicional, e por serem um exemplo de vida.

**A todos, o meu sincero obrigado!**

# Índice

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Prefácio</b> .....  | <b>3</b>  |
| <b>Resumo</b> .....  | <b>4</b>  |
| <b>Abstract</b> .....  | <b>5</b>  |
| <b>Lista de Abreviaturas</b> .....   | <b>6</b>  |
| <b>Introdução</b> .....  | <b>7</b>  |
| <b>1. Os Baculovírus</b> .....   | <b>7</b>  |
| 1.1 Viriões característicos .....  | <b>7</b>  |
| 1.2 Ciclo de replicação viral.....   | <b>8</b>  |
| 1.3 Aplicações .....   | <b>9</b>  |
| <b>2. Sistema BEVS-IC: Perspectiva metabólica</b> .....  | <b>10</b> |
| <b>3. Ferramentas para estudos metabólicos</b> .....   | <b>11</b> |
| <b>Materiais e Métodos</b> .....   | <b>14</b> |
| <b>1. Linha celular e Condições de Cultura</b> .....   | <b>14</b> |
| <b>2. Vírus, Propagação Viral e Estratégias de Infecção</b> .....                                    | <b>14</b> |
| <b>3. Bioreacção de células de insecto</b> .....   | <b>14</b> |
| <b>4. Titulação Viral</b> .....  | <b>15</b> |
| <b>5. Procedimentos analíticos</b> .....   | <b>15</b> |
| <b>6. Obtenção dos extractos proteicos e determinação do conteúdo de proteína total</b><br><b>16</b> |           |
| <b>7. Ensaio enzimáticos</b> .....   | <b>16</b> |
| <b>8. Análise dos Fluxos Metabólicos</b> .....   | <b>19</b> |
| <b>9. Cálculo das taxas celulares específicas</b> .....  | <b>19</b> |
| <b>Resultados</b> .....  | <b>21</b> |
| <b>1. Consistência da rede metabólica</b> .....  | <b>21</b> |
| <b>2. Efeito da densidade celular no metabolismo de células de insecto Sf9</b> .....                 | <b>21</b> |
| <b>2.1 Metabolismo energético</b> .....  | <b>21</b> |
| 2.1.1 Glicólise e Via dos Fosfatos de Pentose .....  | <b>23</b> |
| 2.1.2 Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (ATCs).....   | <b>23</b> |
| 2.1.3 Partição Metabólica ao nível do Piruvato .....   | <b>24</b> |
| 2.1.4 Metabolismo do azoto .....   | <b>25</b> |
| 2.1.5 Reacções anapleróticas .....   | <b>25</b> |
| 2.1.6 Síntese de Macromoléculas .....  | <b>26</b> |
| 2.1.7 Capacidade celular oxidativa (redox) e <i>status</i> energético .....                          | <b>26</b> |
| <b>2.2 Perfil de actividade enzimática</b> .....   | <b>27</b> |
| 2.2.1 Glicólise e Via dos Fosfatos de Pentose .....  | <b>27</b> |
| 2.2.2 Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (ATCs).....   | <b>28</b> |
| 2.2.3 <i>Shuttle</i> Malato-Aspartato.....   | <b>28</b> |
| 2.2.4 Metabolismo do azoto .....   | <b>28</b> |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 2.3       | Relação entre os fluxos metabólicos estimados ( <i>in vivo</i> ) e as actividades enzimáticas medidas ( <i>in vitro</i> )..... | 30        |
| <b>3.</b> | <b>Efeito da infecção com Baculovirus no metabolismo de células Sf9.....</b>   | <b>31</b> |
| 3.1       | Metabolismo energético .....   | 31        |
| 3.1.1     | Glicólise e Via dos Fosfatos de Pentose .....  | 32        |
| 3.1.2     | Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (ATCs).....   | 33        |
| 3.1.3     | Partição Metabólica ao nível do Piruvato .....   | 33        |
| 3.1.4     | Metabolismo do Azoto.....  | 34        |
| 3.1.5     | Reacções anapleróticas .....   | 34        |
| 3.1.6     | Síntese de Macromoléculas .....  | 35        |
| 3.1.7     | Capacidade celular oxidativa (redox) e <i>status</i> energético .....  | 36        |
| 3.2       | Perfil de actividade enzimática .....  | 36        |
| 3.2.1     | Glicólise e Via dos Fosfatos de Pentose .....  | 36        |
| 3.2.2     | Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (ATCs).....   | 37        |
| 3.2.3     | <i>Shuttle</i> Malato-Aspartato.....   | 37        |
| 3.2.4     | Metabolismo do Azoto.....  | 39        |
|           | <b>Discussão.....</b>  | <b>40</b> |
|           | <b>Conclusões e Perspectivas de Trabalho Futuro .....</b>  | <b>46</b> |
|           | <b>Referências Bibliográficas.....</b>   | <b>47</b> |
|           | <b>Anexos.....</b>   | <b>51</b> |

## Prefácio

Este trabalho decorreu no âmbito do projecto da Comissão Europeia (EC) Baculogenes (FP6LHSB-CT-2006-037541) cujos objectivos visam o estudo e desenvolvimento de vectores de baculovírus para terapia génica. O grupo de Tecnologia de Células Animais do ITQB/IBET contribui com i) o desenvolvimento de um modelo metabólico de células de insecto Sf9, elucidativo do metabolismo celular antes e após infecção, ii) com a optimização do processo de bioreacção e produção de baculovírus a alta densidade celular, e iii) com o desenvolvimento de um processo em larga escala altamente eficiente de purificação e concentração de vectores de baculovírus, de acordo com as boas práticas de produção (GMP).

Esta tese de mestrado insere-se na primeira parte (i) do projecto, pretendendo-se estudar como se processa a interacção Baculovírus-Célula de Insecto e como esta interacção pode ser modificada para a melhoria dos bioprocessos. Neste contexto, procedeu-se à caracterização metabólica de células de insecto Sf9, antes e durante a infecção com baculovírus, através da:

- Quantificação, utilizando a técnica de MFA, dos fluxos metabólicos que ocorrem *in vivo*, de modo a traçar um panorama geral do metabolismo celular em células não infectadas, e em células sujeitas a diferentes estratégias de infecção (variação da CCI e MOI);

- Análise do perfil de actividades das principais enzimas representativas do metabolismo celular nas diferentes estratégias acima descritas, para:

- Estudar quais os pontos de controlo do metabolismo celular, que podem ser encarados como alvos de optimização do bioprocessos;
- Identificar o efeito do vírus no metabolismo da célula e o modo como o manipula para proveito próprio.

No decorrer do presente trabalho, foi publicado pelo grupo de Tecnologia de Células Animais o artigo:

**“Improving baculovirus production at high cell density through manipulation of energy metabolism”.**

Carinhas N, Bernal V, Monteiro F, Carrondo MJ, Oliveira R, Alves PM. *Metab. Eng. (in press)*.

Aguarda publicação o seguinte artigo:

**“Metabolic burden in baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* Sf-9 cells”.**

Bernal V, Monteiro F, Carinhas N, Ambrósio R, Carrondo MJ, Alves PM. (em preparação).

## Resumo

O Sistema de Expressão Baculovírus-Célula de Insecto (BEVS-IC) apresenta um grande potencial na indústria biotecnológica e farmacêutica. As suas aplicações são vastas passando pela produção de proteínas recombinantes, vacinas e VLPs e, mais recentemente, vectores para terapia génica. Não obstante, o nível de conhecimento fundamental sobre este sistema é ainda reduzido. Neste trabalho, propusemo-nos a potenciar a capacidade produtiva do sistema BEVS-IC, explorando as alterações metabólicas que decorrem da interacção vírus-célula no cenário pós-infecção. Foram investigados os passos limitantes do metabolismo celular e respectivas enzimas reguladoras. Os resultados obtidos foram complementados com dados de análise de fluxo metabólico, numa abordagem integrativa de Biologia de Sistemas. Dois pontos-chave no controlo do metabolismo oxidativo foram identificados: a regulação do fluxo glicolítico é exercida pela hexokinase, enquanto que a isocitrato desidrogenase é responsável pela actividade do ciclo dos ATCs. Estas enzimas foram portanto identificadas como alvos promissores para engenharia metabólica. A infecção com baculovírus provocou um aumento na actividade da enzima glutamato desidrogenase, estando associado à manutenção do *status* energético celular e assegurando assim melhores condições para a replicação viral. Este resultado evidencia a capacidade de manipulação da maquinaria celular e utilização o metabolismo celular por parte do vírus. Este trabalho permitiu-nos identificar os pontos-chave de controlo do metabolismo de células Sf9. De um ponto de vista fundamental, foram estudados e racionalizados os cenários metabólicos mais marcantes que se estabelecem no período pós-infecção, decorrentes da interacção vírus-célula. De um ponto de vista tecnológico, os resultados obtidos servem agora de plataforma para o desenvolvimento de novas estratégias biomoleculares e de bioprocessos em vista à optimização da produtividade do sistema.

**Palavras-chave:** interacção baculovírus-célula de insecto, metabolismo, análise de fluxos metabólicos (MFA), actividades enzimáticas, terapia génica.



## **Abstract**

The Insect Cells-Baculovirus Vector Expression System (IC-BEVS) has a great potential in the biotechnological and pharmaceutical industry. It has been recognized regarding its numerous applications, such as the production of heterologous proteins, vaccines and virus like particles (VLPs) and, more recently, vectors for gene therapy. Nevertheless, a more fundamental understanding of this system is still needed. In the work herein presented we intended to improve the productivity of the IC-BEVS, by exploiting the major metabolic alterations that take place during the post-infection scenario as the result of the interactions between the host cell and the virus itself. Within this scope, the main metabolic pathways and the flux controlling enzymes involved were investigated. The results obtained were complemented with metabolic flux analysis data, with the main aim of integrating them in a Systems Biology perspective. Two key-points regarding the oxidative metabolism were identified: hexokinase is responsible for the regulation of the glycolytic flux, and isocitrate dehydrogenase limits the flux through the TCA cycle. Therefore both enzymes were selected as promising targets for metabolic engineering. The activities of glutamate dehydrogenases increased after infection with baculovirus, and this happened within the maintenance of the cellular energetic state to guarantee better conditions for viral replication. This result demonstrates the capacity of the virus to manipulate the cellular metabolism for its own profit, providing better conditions for viral replication. This work allowed us to unveil the metabolic regulatory key-points of Sf9 cells. From a fundamental point of view, the most important metabolic scenarios that occur during the post-infection period were addressed. From a technological point of view, the results herein presented can be exploited for further development of new strategies in terms of bioprocess engineering to attain the ultimate goal: improvement of systems productivity.

**Key words:** baculovirus–insect cell interaction, metabolism, metabolic flux analysis (MFA), enzyme activities, gene therapy.

## Lista de Abreviaturas

|   |  |
|---|--|
| <b>ACoA</b> – acetil-coenzima A   | <b>MDH</b> – malato desidrogenase  |
| <b>ADP</b> – adenosina di-fosfato   | <b>EM</b> – enzima málica  |
| <b>AlaAT</b> – alanina aminotransferase   | <b>Met</b> - metionina   |
| <b>Amm</b> – amónia   | <b>NAD<sup>+</sup>/NADH</b> – nicotinamida adenina dinucleótido forma oxidada/reduzida           |
| <b>Arg</b> - arginina   | <b>NADP<sup>+</sup>/NADPH</b> – nicotinamida adenina dinucleótido fosfato forma oxidada/reduzida |
| <b>Asn</b> - asparagina   | <b>OAA</b> - oxaloacetato  |
| <b>Asp</b> – aspartato  | <b>PDH</b> – piruvato desidrogenase  |
| <b>AspAT</b> – aspartato aminotransferase   | <b>PEP</b> – fosfo-enol-piruvato   |
| <b>ATP</b> – adenosina tri-fosfato  | <b>PGI</b> – fosfo -glucose isomerase  |
| <b>Cit</b> - citrato  | <b>Phe</b> – Fenilalanina  |
| <b>CS</b> – citrato sintase   | <b>PK</b> – piruvato cinase  |
| <b>Cis</b> - cisteína   | <b>Pro</b> - prolina   |
| <b>DNA</b> – Ácido desoxirribonucleico  | <b>Pyr</b> – piruvato  |
| <b>F6P</b> – fructose-6-fosfato   | <b>R5P</b> – ribose-5-fosfato  |
| <b>FA</b> – Ácidos gordos   | <b>RNA</b> – Ácido ribonucleico  |
| <b>FAD/FADH<sub>2</sub></b> – flavina adenina dinucleótido forma oxidada/reduzida | <b>Ser</b> - serina  |
| <b>Fum</b> – fumarato/fumarase  | <b>Suc</b> - succinato   |
| <b>G6P</b> – glucose-6-fosfato  | <b>SucDH</b> – succinato desidrogenase   |
| <b>GAP</b> – gliceraldeído-3-fosfato  | <b>SuCoA</b> – succinil-coenzima A   |
| <b>GDH</b> – glutamato desidrogenase  | <b>SuCoAS</b> - succinil-coenzima A sintase  |
| <b>Glc</b> – glucose  | <b>Sucr</b> – sacarose   |
| <b>Gln</b> – glutamina  | <b>Thr</b> - treonina  |
| <b>Glu</b> – glutamato  | <b>transH</b> – transhidrogenase   |
| <b>Gly</b> - glicina  | <b>Tyr</b> - tirosina  |
| <b>GOGAT</b> – glutamato sintase (NADH-dependente)                                | <b>Val</b> - valina  |
| <b>His</b> - histidina  | <b>αKG</b> – α-cetoglutarato   |
| <b>HK</b> - hexokinase  | <b>αKGDH</b> – α-cetoglutarato desidrogenase   |
| <b>ICDH</b> – isocitrato desidrogenase  |  |
| <b>Ile</b> – isoleucina   |  |
| <b>Isocit</b> – isocitrato  |  |
| <b>Lac</b> – lactato  |  |
| <b>LDH</b> – lactato desidrogenase  |  |
| <b>Leu</b> - leucina  |  |
| <b>Lys</b> - lisina   |  |
| <b>Mal</b> - malato   |  |
| <b>Malt</b> – maltose   |  |

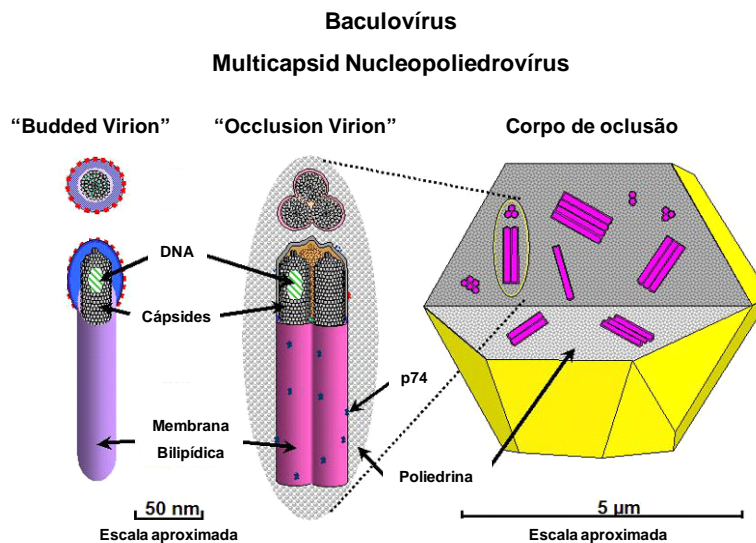
## Introdução

### 1. Os Baculovírus

Os Baculovírus pertencem à família Baculoviridae, que compreende vírus de envelope cujas nucleocápsides apresentam a forma característica semelhante a bastonete. O seu genoma é complexo, constituído por DNA circular de cadeia dupla que pode variar entre os 80 e os 180 Kpb. Dividem-se em dois Géneros, os Nucleopoliedrovirus (NPVs) e os Granulovirus (GVs), sendo infecciosos apenas para artrópodes, cuja vasta maioria de espécies permissivas está incluída na Ordem Lepidoptera da Classe Insecta<sup>[64]</sup>.

#### 1.1 Viriões característicos

Uma das principais características dos Baculovírus é a produção de dois fenótipos de viriões, os “*budded virions*” (BVs) e os “*occlusion derived virions*” (ODVs) (Fig. 1). Estes são formados em diferentes compartimentos celulares, e em intervalos de tempo distintos, durante o ciclo de infecção.



**Figura 1.** Morfologia e estrutura dos viriões e corpos de oclusão de Baculovírus. “BV”- “*budded virions*” e “ODV”-“*occlusion derived virions*”.

Os BVs são produzidos na fase tardia do ciclo, quando as nucleocápsides surgem na superfície das células infectadas, pelo que o seu envelope deriva da membrana plasmática da célula hospedeira. Na fase mais tardia de infecção, as nucleocápsides passam a adquirir o envelope no interior do núcleo celular, dando origem aos ODVs. Finalmente, são envolvidos por uma matriz proteica de oclusão, de poliedrina no caso dos NPVs, ou granulina nos GVs. Uma vez que as nucleocápsides de ambos os viriões são produzidas no núcleo, a constituição e o conteúdo em DNA entre eles é idêntica. Enquanto os GVs contêm apenas uma nucleocápside por partícula, os NPVs

podem conter uma (“*Single-NPV*”) ou múltiplas (“*Multiple-NPV*”), nos quais se engloba a espécie *Autographa californica* MNPV, uma das mais utilizadas nas aplicações biotecnológicas dos baculovírus. Para além disso, os GVs possuem apenas um virião por corpo de oclusão, enquanto que os NPVs possuem vários<sup>[4]</sup>. A principal diferença entre os BVs e ODVs é a composição dos envelopes e estruturas associadas, que é responsável pelos papéis distintos que desempenham ao longo do ciclo de infecção viral.

## 1.2 Ciclo de replicação viral

Devido às dificuldades encontradas no desenvolvimento de sistemas de cultura apropriados para a propagação dos GVs, a grande maioria dos estudos genéticos, moleculares e bioquímicos têm como foco os NPVs. Mais concretamente, a espécie *Autographa californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) tem recebido grande interesse pela comunidade científica, pelo que o seu ciclo de replicação se encontra amplamente estudado<sup>[71]</sup>.

Brevemente, a infecção inicia-se quando o insecto se alimenta de material contaminado com os corpos de oclusão do vírus. Estes são extremamente resistentes a agressões externas, mas quando em contacto com o pH alcalino do sistema digestivo do hospedeiro (pH 9,5-11,5) a matriz de poliedrina dissolve-se, libertando os ODVs. Estes infectam as células do epitélio colunar da mucosa, e a sua entrada nas células ocorre por fusão entre as membranas do envelope e plasmática das microvilosidades<sup>[19, 20]</sup>. As nucleocápsides atravessam o citoplasma em direcção ao núcleo, libertando aí por fim o DNA viral que é exposto à maquinaria celular de transcrição<sup>[17, 18]</sup>. Não são necessárias quaisquer proteínas virais associadas para que ocorra a iniciação da transcrição do DNA viral, uma vez que os genes virais *early* são reconhecidos pelos componentes celulares<sup>[12, 28]</sup>. A formação da nucleocápside ocorre através da condensação do genoma viral a um complexo nucleoproteico mediado por proteínas de ligação ao DNA. Após a sua formação, as nucleocápsides atravessam a membrana nuclear, cruzam o citoplasma e chegam por fim a membrana plasmática<sup>[26]</sup>. Deste processo resultam os BVs, que são responsáveis pela disseminação da infecção ao nível sistémico<sup>[27]</sup>. Assim, o ciclo prossegue com a infecção de novas células por endocitose mediada por receptor. Uma vez aderidos aos seus receptores na superfície celular, os vírus são internalizados em vesículas de clatrina e, após a fusão do envelope do vírus com a membrana do endossoma, as nucleocápsides acedem ao citoplasma<sup>[68]</sup>. A partir deste momento, o processo de infecção ocorre de igual modo em relação aos ODVs.

Mais tarde, a síntese de ODVs passa a ser favorecida face à de BVs, e um elevado número de nucleocápsides começa a acumular-se intranuclearmente, onde adquirem o envelope<sup>[4]</sup>. A síntese de poliedrina também aumenta e é transportada para o núcleo, onde começa a cristalizar. Concomitantemente, uma segunda proteína, p10, é produzida em abundância e condensa sob a forma de estruturas fibrilares<sup>[70]</sup>. É, por fim, durante a condensação da poliedrina que os ODVs são envolvidos pela matriz. A sua maturação termina quando envelopados num cálice poliédrico, composto principalmente por açúcares e fosfoproteínas<sup>[67]</sup>. Surgem assim os corpos de oclusão,

responsáveis pela disseminação ambiental e persistência do vírus em populações de insectos que possuam ciclos de alimentação sazonais.

Uma característica importante deste vírus é o impacto que tem no ciclo celular da célula hospedeira. Após infecção, ocorre a paragem do ciclo e posterior sincronização na fase G<sub>2</sub>/M ao mesmo tempo que o vírus toma o controlo da maquinaria celular, causando o bloqueio da expressão dos genes celulares<sup>[6, 42]</sup>.

Deste modo, as interações do baculovírus com a célula hospedeira passam por uma relação física que ocorre durante a adesão e entrada do vírus na célula, até mecanismos subtis e complexos que regulam a expressão génica da célula, ao mesmo tempo que modificam a sua fisiologia.

### 1.3 Aplicações

Desde cedo, os baculovírus têm vindo a emergir como uma tecnologia eficiente e versátil para as mais diversas aplicações industriais, científicas e biofarmacêuticas.

Inicialmente, foram usados como biopesticidas no controlo de pragas em práticas agrícolas<sup>[50]</sup>. No entanto, foi o seu enorme potencial como sistema de expressão de proteínas que despertou o grande interesse da indústria biotecnológica, e que tem vindo a fomentar o crescente investimento da investigação científica. As vantagens do sistema de expressão Baculovírus-Célula de insecto (BEVS-IC) fazem deste um dos sistemas eucarióticos mais populares na prática laboratorial. As células de insecto são fáceis de manter em cultura, comparativamente com as células de mamífero, são capazes de realizar modificações pós-tradução e são capazes de produzir grandes quantidades de proteína<sup>[22, 37, 43, 58]</sup>. Por outro lado, estas células podem ser cultivadas na ausência de soro, o que do ponto de vista da segurança do bioprocessamento é importante, pois diminui a hipótese de transmissão de contaminantes, como vírus e príões, entre outros. O sistema é seguro, já que os baculovírus são apenas infecciosos para artrópodes e o vírus é incapaz de replicar em células de mamífero. Esta é uma grande vantagem que a utilização deste sistema tem relativamente aos que utilizam vírus de mamíferos.

Deste modo, o BEVS-IC tem sido utilizado na expressão de um vasto conjunto de proteínas heterólogas de interesse biomédico e económico<sup>[9, 58]</sup>. Para além da sua utilização como plataforma de produção de proteínas recombinantes, as suas aplicações estendem-se à produção de partículas semelhantes a vírus (*Virus Like Particles*-VLPs) e vírus adeno-associados<sup>[13, 40, 48, 61, 63]</sup>. Um passo importante relativamente à utilização do sistema BEVS foi a aprovação, pela FDA, da vacina contra o HPV (Cervarix<sup>R</sup>, GlaxoSmithKline Biologicals), que se baseia na VLP produzida em larga escala neste sistema<sup>[38]</sup>. Nos últimos anos ganharam terreno com a técnica de “*baculovirus surface display*” e apresentam como vantagem, relativamente aos sistemas que utilizam bacteriófagos, a possibilidade de apresentarem proteínas mais complexas<sup>[46]</sup>. Por último, as suas aplicações mais recentes são na área da terapia génica, tendo sido utilizados como vectores para transdução de células de mamífero. As vantagens da utilização destes vírus residem no facto de possuírem baixa citotoxicidade para células de mamífero, mesmo quando presentes em títulos elevados, e a capacidade de transduzirem células diferenciadas<sup>[10, 23, 29, 36]</sup>.

## 2. Sistema BEVS-IC: Perspectiva metabólica

Apesar das vastas aplicações do sistema BEVS-IC, o conhecimento acerca da fisiologia das células de insecto, e em particular de células Sf9 de *S. frugiperda*, durante as fases pré e pós-infecção é ainda muito limitado. A necessidade desse conhecimento urge, em vista ao delineamento de estratégias para optimização de bioprocessos.

As Sf9 utilizam glucose como principal fonte de carbono, e em menores quantidades consomem também sacarose e maltose<sup>[24]</sup>. Possuem a via glicolítica funcional e, contrariamente às células de mamífero, não acumulam lactato em quantidades citotóxicas, o que se deve a um ciclo dos ácidos tricarbóxicos mais activo<sup>[24, 44]</sup>. A acumulação de amónia e alanina, produtos secundários do metabolismo, não está relacionada com inibição do crescimento celular, contrariamente ao que acontece em células de mamífero<sup>[15]</sup>. Isto acontece pois as células de insecto possuem um mecanismo eficiente para a destoxificação da amónia produzida, que se baseia na actividade de duas enzimas, a alanina aminotransferase e a glutamato sintase (GOGAT)<sup>[14]</sup>. O consumo de aminoácidos é elevado e superior ao necessário para a síntese de proteínas, sendo incorporados no ciclo dos ácidos tricarbóxicos<sup>[14, 15]</sup>. Deste modo, as características fisiológicas e metabólicas que as células de insecto possuem tornam-nas, em muitos casos, vantajosas como plataforma de produção face às células de mamífero.

A maioria dos estudos de bioprocessos é focada na dinâmica do sistema BEVS-IC durante a produção de proteínas recombinantes e não do vector viral<sup>[24]</sup>. Em termos de produtividade do processo, parece lógico ser preferível infectar as células em fase mais avançada de cultura, quando densidades mais elevadas podem gerar maiores títulos ou concentração de produto. No entanto, desde cedo, os investigadores chegaram à conclusão que o rendimento na produção de proteína recombinante diminui em culturas infectadas a alta densidade celular. Este efeito é conhecido como “efeito da densidade celular” e é um fenómeno comum aos bioprocessos que utilizam células animais e vírus<sup>[10, 11, 49]</sup>. Apesar da literatura no que diz respeito à produção dos vectores de baculovírus ser escassa, alguns trabalhos iniciais demonstraram a ocorrência de um efeito de densidade celular nos títulos finais do vírus *wild-type* numa linha celular de *Trichoplusia ni*<sup>[72]</sup>. Do mesmo modo, Klöppinger *et al.* chegaram à conclusão que a produção do vírus *Autographa californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) utilizando uma linha celular derivada de *S. frugiperda*, era inibida a uma densidade celular de  $1,5 \times 10^6$  células/mL<sup>[33]</sup>. Recentemente, foi demonstrado que o efeito de densidade celular ocorre em células Sf9, sendo dependente da multiplicidade de infecção escolhida, ficando a produtividade das células comprometida no que diz respeito à produção do vector viral utilizado<sup>[10]</sup>.

Tem-se especulado acerca das razões que possam estar por trás deste efeito causado pela densidade celular (limitação de nutrientes e/ou precursores, acumulação de compostos tóxicos, inibição por contacto célula-a-célula, factores de crescimento autócrinos), no entanto continua por explicar<sup>[15, 60]</sup>. A hipótese mais atractiva é que possa ocorrer a acumulação de factores condicionais que vão regular negativamente a actividade metabólica das células a elevadas densidades celulares, actuando provavelmente como um mecanismo protector de modo a impedir a exaustão de nutrientes

do meio e consequente morte celular<sup>[3, 15]</sup>. Neste sentido, várias estratégias têm sido desenvolvidas e testadas de modo a melhorar a produção, passando pelo melhoramento na composição dos meios de cultura, mudança total ou parcial do meio no momento da infecção, adição de suplementos nutritivos à cultura e culturas operadas em semi-contínuo e perfusão<sup>[24]</sup>. A suplementação do meio de cultura com glucose e glutamina, *yeastolate* ou a mudança parcial do meio de cultura no momento de infecção levam a um aumento no rendimento de produção de proteína<sup>[24, 47]</sup>. Mais ainda, foi recentemente demonstrado que a adição de piruvato e  $\alpha$ -cetoglutarato à cultura no momento de infecção aumenta significativamente a produtividade específica das células, conduzindo a um aumento evidente no título viral<sup>[9]</sup>.

O estudo do metabolismo de células Sf9 após infecção com baculovírus é um território ainda por explorar, e constitui o ponto de partida fundamental para uma melhor compreensão das alterações fisiológicas que ocorrem durante o processo de infecção. A bibliografia existente acerca deste tema é limitada, já que poucos são os estudos que se debruçam sobre a complexa interação baculovírus-célula. Sabe-se que, após a infecção com AcMNPV, ocorre a paragem do ciclo celular na fase G<sub>2</sub>/M em células Sf9, e que a sincronização das células é provocada por proteínas codificadas pelo próprio vírus<sup>[6]</sup>. Para além disso, outros factores extracelulares têm efeito na sincronização do ciclo celular, como foi demonstrado em células Sf9 e High-Five<sup>[7, 8]</sup>. Por outro lado, após a infecção com baculovírus ocorre uma alteração do metabolismo e um aumento no consumo de oxigénio pelas células<sup>[3, 9, 13, 47]</sup>. Assim, é necessário um estudo mais aprofundado do sistema BEVS-IC, que permita correlacionar a produtividade celular com as alterações metabólicas que ocorrem durante o bioprocessamento.

### 3. Ferramentas para estudos metabólicos

O desenvolvimento de modelos matemáticos para descrever sistemas biológicos tem-se vindo a revelar uma estratégia atractiva, permitindo não só a compreensão dos processos celulares a um nível mais abrangente, mas também a identificação de alvos específicos para engenharia metabólica<sup>[30, 31, 69]</sup>. A construção destes modelos tendo em consideração a topologia da rede metabólica e vias constituintes, e até mesmo da sua localização subcelular, oferece a possibilidade de estudar o metabolismo sob uma perspectiva quantitativa<sup>[5, 52, 53]</sup>

Uma rede metabólica é definida como o conjunto de todos os processos metabólicos e físicos que determinam as propriedades fisiológicas e bioquímicas da célula. Engloba, por isso, todas as reacções do metabolismo e também os mecanismos que as regulam.

Um fluxo é definido como a velocidade a que, numa determinada via metabólica, ocorre a conversão (*turnover*) dos metabolitos. A regulação dos fluxos é feita pelas enzimas envolvidas nas respectivas vias, bem como pela disponibilidade de substratos e coenzimas, e é um processo vital na adaptação do metabolismo celular às alterações do meio envolvente.

A análise de fluxos metabólicos (MFA) é a quantificação de fluxos do metabolismo de um dado organismo de interesse, sob condições definidas. O resultado desta análise fornece um mapa de distribuição de fluxos para uma dada rede metabólica. A análise é feita com base numa rede ou

modelo metabólico, e consiste em encontrar soluções para um sistema linear de equações algébricas que está baseado na estequiometria das reacções metabólicas consideradas<sup>[31]</sup>. O primeiro passo é a construção da rede metabólica, contendo as principais reacções ( $q$ ) e metabolitos ( $m$ ) envolvidos. Matematicamente, a denotação da rede é feita através da construção de uma matriz com dimensão  $m \times q$ , em que o elemento  $n_{ij}$  é o coeficiente estequiométrico do metabolito  $i$  na reacção  $j$ . De modo a ser possível a resolução do sistema de equações, é assumida a hipótese de estado pseudo-estacionário, ou seja, a cinética da actividade das enzimas que regulam as vias metabólicas não é considerada<sup>[9, 31]</sup>. Este pressuposto é considerado válido na medida em que, embora o tempo de meia vida do universo de metabolitos intracelulares seja muito curto, nas condições certas, pode-se considerar que os seus níveis se mantêm constantes. O resultado é a transformação de um sistema de  $m$  equações diferenciais num sistema de  $m$  equações lineares.

A aplicação da técnica de MFA ao sistema BEVS-IC já provou ser muito útil na análise do estado metabólico celular durante o bioprocessamento, permitindo aceder às adaptações metabólicas resultantes do efeito da densidade celular e da infecção com baculovírus<sup>[3]</sup>. Como já foi referido, na análise de fluxos metabólicos, a cinética enzimática das reacções não é considerada. Assim, não é possível determinar com precisão quais as etapas das vias que compõem a rede metabólica que estão sob um efeito controlador e/ou limitante. O MFA oferece a hipótese do estudo quantitativo dos fluxos numa rede metabólica, mas negligencia o grau de regulação a que cada etapa está sujeita. Esta é uma limitação intrínseca da técnica, e pode ser ultrapassada com o estudo da cinética das enzimas envolvidas nas vias que compreendem a rede e também com a análise dos metabolitos e cofactores correspondentes.

Existem dois conceitos que são importantes para a compreensão da forma como são reguladas as vias metabólicas: em primeiro lugar, a **regulação** de uma enzima numa via refere-se ao aumento ou diminuição da sua actividade em resposta a estímulos; o segundo conceito é o **controlo** exercido por esta enzima na velocidade total da via por sofrer variações na sua actividade, ou seja, o controlo do fluxo da via metabólica. Por exemplo, uma enzima pode sofrer grandes alterações na sua actividade (ou seja, ser muito regulada) mas se estas mudanças não tiverem um efeito significativo no fluxo da via metabólica, então esta enzima não está envolvida no controlo da via. Neermann e Wagner estudaram o metabolismo da glucose e glutamina em células de mamífero e de insecto durante a fase exponencial de crescimento, comparando as taxas de consumo/produção de metabolitos com as actividades das enzimas pertencentes à glicólise e glutaminólise, respectivamente<sup>[44]</sup>. O interesse desta abordagem reside no facto da actividade catalítica máxima de uma enzima ser um indicador quantitativo do fluxo máximo possível de ocorrer na respectiva via metabólica. Vriezen e Van Dijken compararam os níveis de actividade enzimática com os fluxos medidos *in vivo*. Este estudo foi realizado em células de mieloma de mamífero cultivadas em quimiostato, ou seja, mantendo a taxa específica de crescimento celular constante, sob limitação, ou não, de oxigénio<sup>[65]</sup>. Esta estratégia é muito útil, pois a comparação entre as actividades das enzimas com a magnitude dos fluxos que regulam indica quais as etapas limitantes no metabolismo celular.

Com a realização deste trabalho pretende-se perceber a relação entre as alterações que se registam no perfil metabólico das células Sf9, sob o efeito da densidade celular e durante a infecção



com baculovírus, e as variações nos níveis de actividade das enzimas que regulam as principais vias metabólicas. Se sim, qual ou quais são as etapas limitantes e enzimas reguladoras que estão a comprometer a actividade metabólica celular. Esta ou estas etapas serão identificadas como alvos para engenharia metabólica. Até aos dias de hoje, e de acordo com o conhecimento que temos, esta é a primeira tentativa de analisar o perfil de actividade enzimática em células animais ao longo das diferentes fases da cultura. Esta é uma abordagem completamente nova no estudo do metabolismo de células de insecto, sendo a primeira vez que se analisa o perfil enzimático em células Sf9, antes e durante a infecção com baculovírus.

Para além do interesse aplicado na procura de alvos de optimização de bioprocessos, este trabalho possui também uma vertente mais fundamental. Não só vai ajudar a perceber como se processa a interacção entre o vírus e a células hospedeira, mas também a forma como o vírus manipula e utiliza o metabolismo celular para seu próprio interesse.

## **Materiais e Métodos**

### **1. Linha celular e Condições de Cultura**

Neste trabalho foi utilizada a linha celular Sf9 de *Spodoptera frugiperda* proveniente da Colecção Europeia de Culturas Celulares (ECACC 89070101).

A manutenção das células foi feita em cultura em suspensão em Erlenmeyers de 500 mL (Corning Inc, Corning, NY, USA) de 500 mL, com volume de trabalho de 50 mL. As células foram sub-cultivadas em meio fresco a cada 3-4 dias quando atingida a densidade de  $4-5 \times 10^6$  células/mL. As culturas foram mantidas em condições de esterilidade, em meio sem soro SF900II (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA), numa incubadora húmida a 27°C e com agitação orbital de 90 rpm. Estas foram mantidas em cultura até uma passagem máxima de 35, que uma vez alcançada se procedeu ao descongelamento de novas células.

Para efeitos de propagação e amplificação viral, procedeu-se à infecção de células Sf9 em *spinners* de 250 mL (Wheaton, Millville, USA), com volume de cultura de 125 mL, numa incubadora húmida a 27°C e com agitação de 150 rpm.

A determinação da concentração celular foi feita por contagem das células num hemacitómetro do tipo *Fuchs-Rosenthal* (Brand, Wertheim, Germany), e a viabilidade celular através do método de exclusão por azul de tripano (Merck, Darmstadt, Germany).

### **2. Vírus, Propagação Viral e Estratégias de Infecção**

Neste trabalho foi utilizado o baculovírus recombinante vp39EGFP. Este codifica para a proteína maioritária da cápside, vp39, em fusão N-terminal com a proteína repórter GFP (Kukkonen *et al.*, 2003). O baculovírus foi cedido pelo Dr. Kari Airene da Universidade de Kuopio (Finlandia).

Quando atingida a densidade de  $1 \times 10^6$  células/mL, as células foram infectadas com uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1 PI/célula (PI: partículas infecciosas). As culturas foram mantidas até atingir 50% de viabilidade celular (equivalente a 4-5 dias de cultura), altura em que se procedeu à recolha dos vírus. Para tal, recolheu-se o volume total da cultura e centrifugou-se a 1700xg durante 10 minutos. O sobrenadante contendo os vírus foi armazenado a 4°C e protegido da luz. Este stock de vírus foi utilizado para as restantes experiências.

### **3. Bioreacção de células de insecto**

As culturas utilizadas para os estudos metabólicos (com e sem infecção) foram realizadas num bioreactor de 2 L (B-DCU B-Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Germany), com controlo de temperatura, pH, agitação e O<sub>2</sub> dissolvido. O volume de trabalho foi de 1 – 1,2 L. O reactor foi inoculado a uma densidade celular de  $0,3-0,5 \times 10^6$  células/mL com uma pré-cultura proveniente de um *spinner*. A concentração de O<sub>2</sub> foi mantida a 30% para controlar e assegurar o correcto funcionamento do metabolismo oxidativo das células.

Nas experiências de infecção foram estudadas três condições, fazendo variar a multiplicidade de infecção (MOI) e a concentração celular no momento de infecção (CCI). As infecções foram feitas a alta MOI (5) e CCI de  $1 \times 10^6$  células/mL e baixa MOI (0,1) a CCI de  $1 \times 10^6$  e  $3 \times 10^6$  células/mL, respectivamente. Os resultados foram comparados com os de uma cultura sem infecção (controlo). Todas as experiências foram realizadas em duplicado.

Foram recolhidas amostras das culturas em intervalos de 12 horas, seguindo-se à sua centrifugação a 1700xg durante 10 minutos. O sobrenadante foi armazenado a 4°C para posterior titulação do vírus, ou a -20°C para medição das concentrações de metabolitos.

#### 4. Titulação Viral

A titulação dos vírus foi feita através do método da diluição limitante<sup>[1, 51]</sup> O ensaio inicia-se com a inoculação de placas de 96 poços (Sardstedt, Newton, USA) com células Sf9, a uma densidade de  $0,5 \times 10^6$  células/poço. Estas foram incubadas uma hora a 27°C para permitir a sua adesão à superfície de plástico. As amostras foram diluídas em meio sem soro SF900II (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA). A infecção foi realizada substituindo o meio de cultura por 100 µl de diluição viral (com diluições de  $10^{-4}$  até  $10^{-11}$ ). Foram realizados 10 replicados para cada diluição por placa, utilizando-se a diluição  $10^{-2}$  e meio SF900II como controlos positivo e negativo, respectivamente. Seguiu-se um período de incubação de 7 dias a 27°C em atmosfera húmida, após o qual foi feito um *screening* ao sinal da GFP utilizando um microscópio invertido de fluorescência (Leica DM IRB, Wetzlar, Germany). A diluição necessária para infectar metade das células (*50% tissue-culture infectious dose-TCID<sub>50</sub>*) foi calculada utilizando as equações descritas na literatura<sup>[1, 51]</sup>. Este valor foi convertido para número de partículas infecciosas através da equação 1:

$$\text{N}^\circ \text{ Partículas Infecciosas (PI)} = 0,69 \times \text{TCID}_{50} \quad (\text{eq.1})$$

**Equação 1** – Determinação do número de partículas infecciosas (PI).

Cada amostra foi titulada, no mínimo, 2 vezes.

#### 5. Procedimentos analíticos

A determinação da concentração de glucose e lactato foi feita recorrendo ao analisador automático YSI 7100 Multiparameter Bioanalytical System (Dayton, Ohio, USA).

Relativamente à quantificação de maltose e sucrose, primeiramente foi realizada a hidrólise enzimática aos seus açúcares constituintes. Utilizou-se  $\alpha$ -glucosidase (Sigma, St. Louis, USA) numa concentração final de 2,5 mg/mL, e invertase (Sigma, St. Louis, USA) numa concentração de 10mg/mL, ambas em PBS. Para a hidrólise ser completa, as amostras foram incubadas a 37°C durante 3 horas, após as quais se procedeu à determinação da concentração de glucose final nas amostras com o analisador YSI 7100 previamente referenciado. De modo a verificar a hidrólise completa de sucrose e maltose pelas respectivas enzimas, utilizaram-se como controlo de actividade

hidrolítica padrões de sucrose e maltose de concentração 5 mM em PBS, sujeitos ao mesmo procedimento das amostras. A concentração de sucrose e maltose é calculada a partir da concentração de glucose nas amostras tratadas e não tratadas.

A determinação da concentração de amónia foi feita recorrendo ao método enzimático baseado na enzima glutamato desidrogenase, utilizando um teste UV comercial (No. 1112732035; Boehringer Mannheim, R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany).

A quantificação dos aminoácidos foi feita através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com recurso prévio à derivatização das amostras a analisar (Waters AccQ.Tag Amino Acid Analysis, Waters, cidade, país). Primeiramente, procedeu-se à precipitação das proteínas com a adição de igual volume de acetonitrilo às amostras, seguindo-se a sua remoção por centrifugação a 12400xg durante 15 minutos e posterior filtração. Foi então adicionado um *standard* interno (ácido  $\alpha$ -aminobutírico) de modo a minimizar os erros experimentais gerados durante a derivatização das amostras e nas corridas cromatográficas. Por fim, os derivados primários e secundários dos aminoácidos foram obtidos através do tratamento com *6-aminoquinolyl N-hydroxysuccinimidyl-carbamate*, de modo a permitir a sua detecção a 395 nm através da excitação a 250 nm. A derivatização das amostras e a preparação das fases móveis foi feita de acordo com as instruções do fabricante. As soluções foram filtradas e sonicadas antes de serem utilizadas.

## **6. Obtenção dos extractos proteicos e determinação do conteúdo de proteína total**

As actividades enzimáticas estudadas no decorrer deste trabalho foram quantificadas em extractos proteicos livres de células nas amostras recolhidas durante as culturas realizadas. As amostras foram recolhidas em intervalos de 24 horas. As células ( $1 - 5 \times 10^6$  células /mL) foram centrifugadas a 1880xg durante 10 minutos a 4°C. O *pellet* obtido foi lavado duas vezes com tampão PBS frio e, por fim, ressuspenso em 500  $\mu$ l de tampão de sonicação frio (4 mM MgCl<sub>2</sub>. 2 mM 2-mercaptoetanol, 0,2 mM PBS; pH 7,5). Para obtenção dos extractos, procedeu-se à sonicação da suspensão a uma amplitude de 10% durante 4 ciclos de 15 segundos (Branson 102C, Danbury, USA) num banho de gelo para evitar o sobreaquecimento da amostra. Os extractos sonicados foram centrifugados a 1880xg durante 15 minutos e o sobrenadante recolhido para posteriores análises, sendo este o extracto proteico livre de células. Todas as actividades enzimáticas foram determinadas no próprio dia e os extractos não foram congelados

A quantificação de proteína total nos extractos foi realizada pelo ensaio do ácido bicinconínico (Pierce, Rockford, USA) utilizando albumina de soro bovino (BSA) como *standard*.

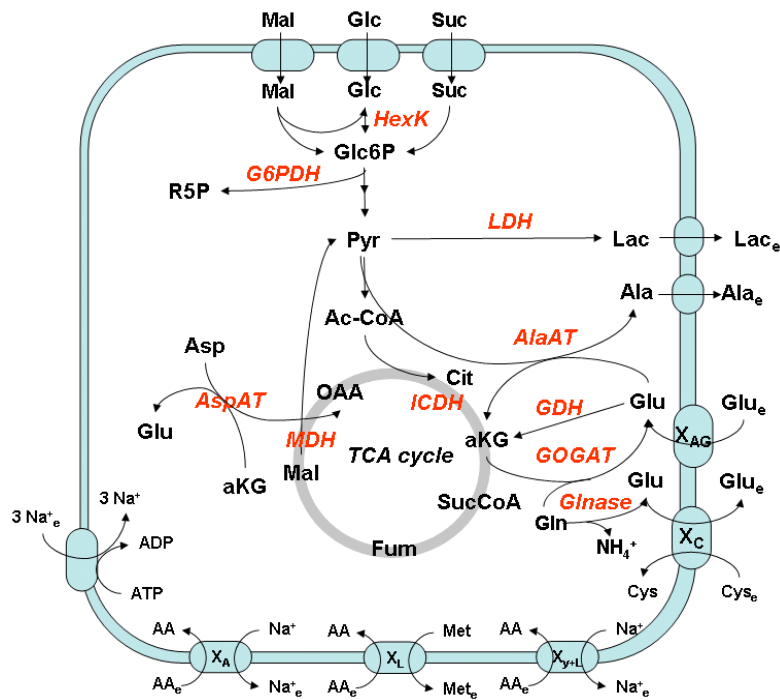
## **7. Ensaio enzimáticos**

Os ensaios enzimáticos foram realizados recorrendo a um espectrofotómetro de placas (SPECTRAMax™340, Sunnyvale, CA, USA). Para todos os casos, o volume de reacção foi de 200  $\mu$ l. Os extractos proteicos, enzimas e substratos utilizados foram sempre mantidos em gelo no

decorrer dos ensaios. Cada reacção enzimática foi iniciada pela adição do substrato (ou o extracto celular), e monitorizada durante 2 minutos a 27°C.

Todos os métodos de medição da actividade enzimática foram adaptados da bibliografia. O pH dos meios de reacção e as concentrações dos diferentes reagentes foram optimizados utilizando extractos de células Sf9. Todas as reacções foram monitorizadas a 340 nm e pelo envolvimento directo do NAD(P)/NAD(P)H na reacção, ou pela utilização de reacções acopladas. As enzimas analisadas e a composição dos meios de reacção optimizados respectivos a cada uma delas encontram-se enumerados na Tabela I.

A concentração dos cofactores reduzidos NADH/NADPH foi monitorizada a 340 nm ( $\epsilon_{340\text{nm}} = 6,3 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). As actividades enzimáticas foram determinadas em duplicado e com duas concentrações diferentes de extracto por ensaio. Todas as actividades enzimáticas mostraram-se linearmente proporcionais à concentração do extracto utilizado. Os extractos celulares foram diluídos em tampão de sonicação quando necessário. Os resultados de actividades enzimáticas foram normalizados pela quantidade de proteína no extracto ou pelo número de células (actividade específica). Uma unidade de actividade enzimática representa a quantidade de enzima que é capaz de transformar uma micromole ( $\mu\text{mol}$ ) de substrato por minuto.



**Figura 2.** Principais vias metabólicas e respectivas enzimas do metabolismo de células Sf9. As reacções consideradas encontram-se descritas no Anexo II.

| <b>Enzima</b>   | <b>Master Mix</b>  | <b>Substrato/Iniciador da Reacção</b> | <b>Referência</b>                           |
|---|--|---------------------------------------|---|
| Hexokinase (HK)   | Tris-HCl 50 mM pH 8; MgCl <sub>2</sub> 1 mM; NADP <sup>+</sup> 1 mM; ATP 6 mM; Glucose-6-P Desidrogenase 0,35U                     | Glucose 10mM                          | Adaptado de Postma <i>et al.</i> , (1989b). |
| Glucose-6P-Desidrogenase (G6P-DH)                             | Tris-HCl 50 mM pH 8; MgCl <sub>2</sub> 1 mM; NADP <sup>+</sup> 0,4 mM  | Glucose-6-P 5 mM                      | Adaptado de Postma <i>et al.</i> , (1989a). |
| Lactato Desidrogenase (LDH)                                   | Tampão fosfato-potássio 50 mM pH 7,5; NADH 0,15 mM   | Piruvato 5 mM                         | Adaptado de Vassault, (1983).               |
| Isocitrato Desidrogenase NADP <sup>+</sup> -dependente (ICDH) | Tris-HCl 50 mM pH 7,5; MgCl <sub>2</sub> 2,5 mM; NADP <sup>+</sup> 0,4 mM  | D-L-Isocitrato 0,5 mM                 | Adaptado de Alp <i>et al.</i> , (1976).     |
| Malato Desidrogenase (MDH)                                    | Tampão fosfato-potássio 50 mM pH 7,5; NADH 0,15 mM   | Ácido oxaloacético 0,5 mM             | Adaptado de Bergmeyer, (1983).              |
| Aspartato Aminotransferase (AspAT)                            | Tampão fosfato-potássio 50 mM pH 8; NADH 0,15 mM; Fosfato de piridoxal 0,02 mM; α-cetogluturato 10 mM; malato desidrogenase 12U/mL | L-Aspartato 50 mM                     | Adaptado de Sudgen e Newsholme (1975).      |
| Glutamato Desidrogenase NADH-dependente (NADH-GDH)            | Tris-HCl 50 mM pH 8,5; EDTA 1 mM; Acetato de amónia 250 mM; NADH 0,15 mM; ADP 1 mM   | α-cetogluturato 0,4 mM                | Adaptado de Schmidt, (1974).                |
| Glutamato Desidrogenase NADPH-dependente (NADPH-GDH)          | Tris-HCl 50 mM pH 8; EDTA 1 mM; Acetato de amónia 250mM; NADPH 0,15mM; ADP 1mM   | α-cetogluturato 0,4 mM                | Adaptado de Schmidt, (1983).                |
| Alanina Aminotransferase (AlaAT)                              | Tampão fosfato-potássio 50 mM pH7,5; NADH 0,15mM; Fosfato de piridoxal 0,02 mM; α-cetogluturato 10mM; lactato desidrogenase 17U/mL | L-Alanina 200mM                       | Adaptado de Sudgen e Newsholme, (1975).     |
| Glutamato Sintase (GOGAT)                                     | Tampão fosfato-potássio 50mM pH 7,5; NADH 0,8 mM; α-cetogluturato 10 mM; Glutamina 10 mM   | Extracto celular                      | Este trabalho.                              |
| Glutaminase (Glnase)  | Tris-HCl 100mM pH8; α-cetogluturato 5 mM; EDTA 0,2 mM; NADH 0,15 mM; Glutamato desidrogenase 20U/mL                                | Glutamina 10 mM                       | Adaptado de Kvamme <i>et al.</i> , (1985).  |

## 8. Análise dos Fluxos Metabólicos

Para o cálculo dos fluxos metabólicos foi utilizada a rede metabólica do metabolismo de células de insecto Sf9, desenvolvida previamente pelo Laboratório de Tecnologia de Células Animais<sup>[3]</sup>. A rede é constituída pelas principais reacções do metabolismo central das células animais: glicólise, via dos fosfatos de pentose, ciclo dos ácidos tricarboxílicos, metabolismo e transporte de aminoácidos, vias de respiração e produção de energia e formação de biomassa. Foram também tidas em conta algumas particularidades do metabolismo do azoto em células de insecto, como a presença da actividade glutamato sintase NADH dependente (GOGAT)<sup>[16]</sup> (Fig. 2).

O modelo metabólico engloba 73 reacções, 52 metabolitos internos balanceados (aos quais foram aplicadas equações de balanço de massa) e quatro metabolitos externos não balanceados: ATP, ADP, ureia e mevalonato (Anexo II). De modo a simplificar a solução do sistema, não são consideradas quaisquer reacções paralelas. Todos os fluxos calculados pelo modelo foram diferentes de zero. A dimensão da matriz estequiométrica resultante é 49, pelo que há 3 relações conservadas independentes (correspondendo aos balanços dos cofactores  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ,  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  e  $\text{FAD}/\text{FADH}_2$ ), e os graus de liberdade são 24. A partir dos dados experimentais obtidos, foram determinadas 28 taxas (25 extracelulares e 3 intracelulares), valor superior ao número de graus de liberdade, pelo que o sistema ficou sobre-determinado. A solução do modelo foi calculada recorrendo ao método dos mínimos quadrados<sup>[56]</sup>.

O índice de consistência  $h$  foi calculado com base nas taxas balanceadas<sup>[66]</sup>. A comparação de  $h$  com o correspondente valor de  $\chi^2$  permite avaliar a consistência dos dados experimentais tendo em consideração a rede bioquímica assumida e a hipótese de estado pseudo-estacionário. As tarefas computacionais foram realizadas recorrendo ao *software* FluxAnalyzer<sup>[32]</sup>.

## 9. Cálculo das taxas celulares específicas

As taxas específicas de crescimento celular e de produção e consumo de metabolitos (glucose, sucrose, maltose, lactato, amónia e aminoácidos) utilizadas para o cálculo dos fluxos metabólicos foram determinadas nos estudos realizados em bioreactor. A taxa específica de crescimento,  $\mu$ , é definida pela equação 2:

$$\mu = (1/X) (dX/dt) \text{ (eq.2)}$$

**Equação 2** – Definição da taxa específica de crescimento celular.

Onde  $X$  é o número de células num instante de tempo. Se a equação 2 for integrada num intervalo de tempo  $t_0$  (tempo inicial) a  $t$ , obtém-se a equação 3:

$$X = X_0 \cdot e^{\mu \cdot t} \text{ (eq.3)}$$

**Equação 3** – Determinação da concentração celular no intervalo de tempo  $dt$ .

A equação anterior pode ser reescrita de forma linear como a equação 4:

$$\ln X = \mu \cdot t + \ln X_0 \text{ (eq. 4)}$$

**Equação 4** – Linearização da Equação 3.

As taxas específicas,  $q_s$ , de consumo de glucose, sucrose, maltose, lactato, aminoácidos, e produção de amónia e aminoácidos foram calculadas, à semelhança da taxa específica de crescimento, pela equação 5:

$$q_s = (1/X) (dS/dt) \text{ (eq.5)}$$

**Equação 5** – Definição da taxa específica de consumo/produção de metabolitos.

Onde  $dS/dt$  representa a variação da concentração do metabolito S no intervalo de tempo  $dt$  e X é a concentração média de células viáveis nesse intervalo.



## Resultados

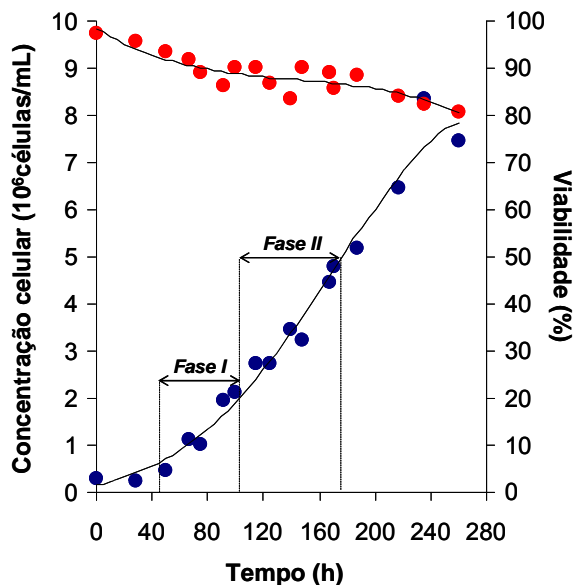
### 1. Consistência da rede metabólica

O modelo metabólico utilizado está descrito na secção de Matérias e Métodos. Os valores calculados do índice de consistência  $h$ , para todas as fases consideradas, foram menores que o correspondente valor de  $\chi^2$  num intervalo de confiança de 95%. Tal facto revelou que os dados experimentais são consistentes com a rede bioquímica assumida e a hipótese de estado pseudo-estacionário, e que não houve registo de erros sistemáticos e relevantes nas medições efectuadas.

### 2. Efeito da densidade celular no metabolismo de células de insecto Sf9

#### 2.1 Metabolismo energético

Para determinar as alterações que ocorrem no metabolismo energético de *S. frugiperda* durante as diferentes fases de crescimento celular, foram mantidas em cultura células Sf9 em meio sem soro SF900II (Fig.2).



**Figura 2.** Cinética de crescimento de células Sf9 em meio sem soro SF900II: Concentração (●) e Viabilidade celular (●).

No que diz respeito aos metabolitos intracelulares, para cada fase foi considerada válida a hipótese de estado pseudo-estacionário, ou seja, a concentração dos metabolitos intracelulares pode-se considerar constante para cada fase, o que permite simplificar o sistema de equações de balanço de massa para cada um destes metabolitos e a resolução deste mediante MFA.

A análise preliminar dos dados revelou que a aplicação do MFA às fases inicial (*lag*) e de morte celular não é fiável, uma vez que o índice de consistência  $h$  é superior ao valor de  $\chi^2$ , provavelmente devido ao elevado erro experimental associado à determinação de baixas taxas de produção/consumo (na fase *lag*) e/ou à libertação de compostos intracelulares para o sobrenadante como consequência da lise celular (na fase de morte celular). Deste modo, foram apenas consideradas duas fases: exponencial inicial (Fase I) e exponencial média/tardia (Fase II) ( $0,5 - 2 \times 10^6$  células/mL, 48-96 h;  $2 - 4,5 \times 10^6$  células/mL, 96-168 h, respectivamente).

Os fluxos extracelulares (taxas de produção e consumo) foram determinados a partir das concentrações de açúcares, aminoácidos e principais produtos secundários do metabolismo celular (alanina, lactato e amónia) presentes no sobrenadante da cultura. Os resultados encontram-se resumidos na Tabela II.

**Tabela II.** Taxas específicas de produção/consumo (fluxos extracelulares) dos principais metabolitos de células Sf9 de *S. frugiperda*.

| <b>Fase</b>                          | <b>I</b>           | <b>II</b>          |
|--------------------------------------|--------------------|--------------------|
| Intervalo de tempo (h)               | <b>48-96</b>       | <b>96-168</b>      |
| Densidade celular média (células/mL) | $1,17 \times 10^6$ | $3,13 \times 10^6$ |
| Glucose                              | -70,11             | -32,90             |
| Lactato                              | -0,11              | -0,05              |
| Sucrose                              | -10,44             | -3,90              |
| Maltose                              | -9,53              | -3,56              |
| Amónia                               | -3,35              | -1,25              |
| Aspartato                            | -16,85             | -9,12              |
| Glutamato                            | -15,57             | -8,21              |
| Serina                               | -12,24             | -4,03              |
| Asparagina                           | -20,20             | -5,11              |
| Glicina                              | -6,59              | -0,34              |
| Glutamina                            | -52,64             | -13,33             |
| Treonina                             | -6,05              | -1,60              |
| Alanina                              | 14,08              | 8,67               |
| Prolina                              | -9,49              | -0,98              |
| Tirosina                             | -3,32              | -0,12              |
| Valina                               | -9,97              | -1,93              |
| Metionina                            | -10,36             | -0,91              |
| Isoleucina                           | -10,41             | -1,52              |
| Leucina                              | -7,11              | -1,73              |
| Fenilalanina                         | -10,38             | -1,40              |
| Histidina                            | -2,79              | -0,25              |
| Arginina                             | -10,10             | -2,36              |
| Lisina                               | -9,38              | -3,48              |
| $\mu$ ( $h^{-1}$ )                   | 0,027              | 0,010              |

As células Sf9 foram mantidas em cultura como referido na secção de Materiais e Métodos. Foram consideradas duas fases (I e II) de crescimento (exponencial inicial e exponencial média/tardia). As taxas estão expressas em  $nmol \cdot (10^6 \text{ células} \cdot h)^{-1}$ .

A principal fonte de carbono consumida pelas células Sf9 foi a glucose, enquanto que o consumo de fontes alternativas (maltose e sacarose) ocorre a taxas menores. O principal produto secundário do metabolismo destas células é a alanina, e a sua produção foi contínua ao longo de toda a cultura, atingindo o valor mais alto quando a taxa de crescimento ( $\mu$ ) é máxima. Por outro lado, a produção de lactato foi residual, bem como os níveis de acumulação de amónia, que variam entre 1 e 4 mM. Relativamente aos aminoácidos presentes no meio de cultura, aqueles que apresentaram um maior consumo foram a asparagina, o aspartato, a glutamina e o glutamato, uma vez que entram nas vias anapleróticas, e também são aqueles que estão presentes em concentrações mais elevadas (cerca de 10 mM). É importante salientar que nenhum nutriente atingiu concentrações limitantes, uma vez que no final da cultura todos os aminoácidos e fontes de carbono se encontravam ainda em concentrações relevantes no meio. A estimação dos fluxos intracelulares para células Sf9 foi feita utilizando os fluxos extracelulares calculados e recorrendo ao modelo previamente descrito (Fig. 3).

### **2.1.1 Glicólise e Via dos Fosfatos de Pentose**

Os fluxos da glicólise e via dos fosfatos de pentose foram máximos quando a taxa de crescimento celular ( $\mu$ ) foi máxima, e caíram para metade do seu valor inicial com o aumento da densidade celular (Fig.3 A). A proporção de glucose canalizada, na fase inicial, para a via das pentoses fosfato face à glicólise foi de 3,6%, o que está de acordo com os valores reportados anteriormente para células Sf9<sup>[3]</sup>.

A produção de lactato foi residual, mesmo a elevadas densidades celulares, como demonstram os baixos fluxos através da enzima lactato-desidrogenase (LDH).

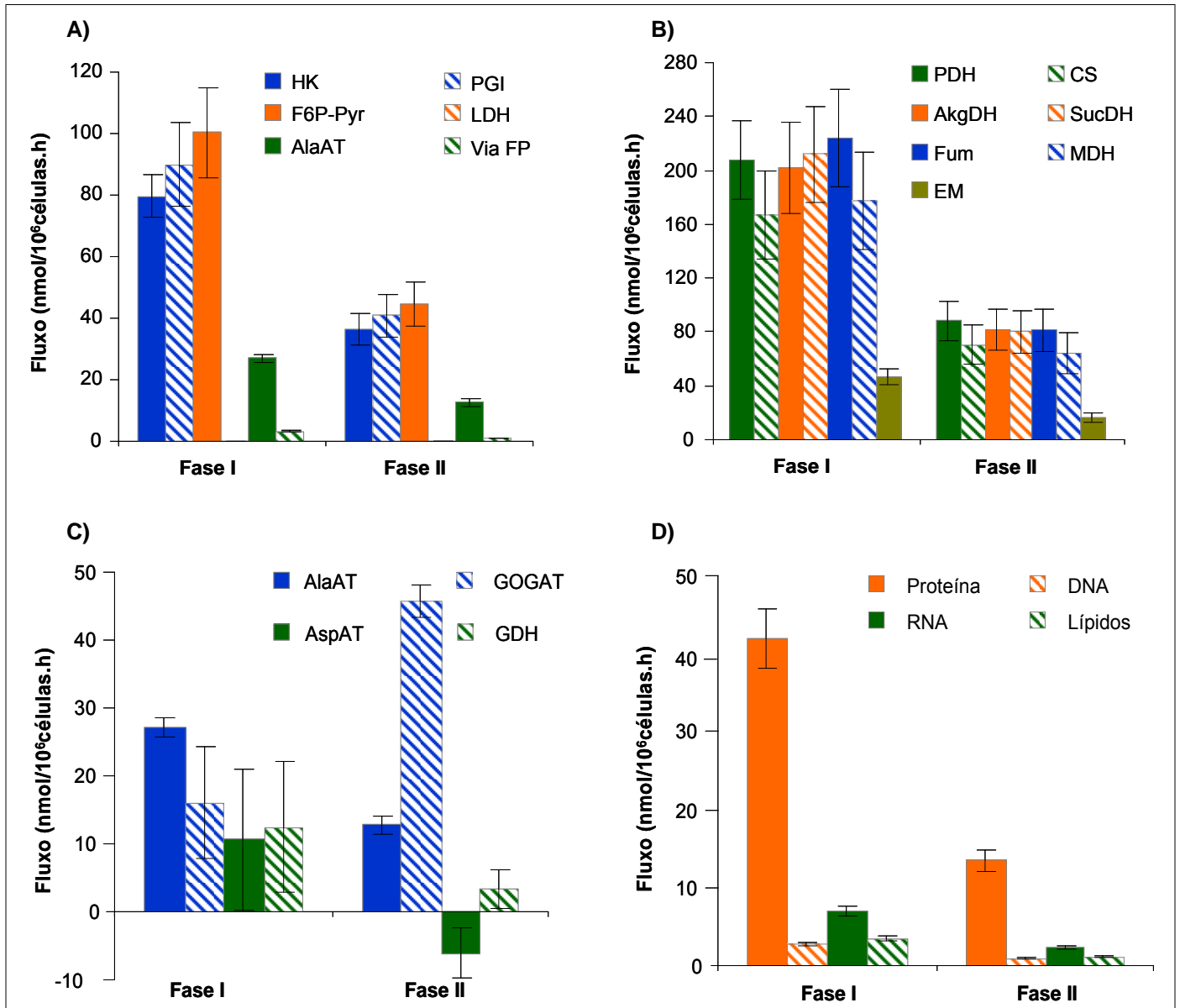
### **2.1.2 Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (ATCs)**

As células Sf9 possuem o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ATCs) totalmente activo (Fig. 3B). Observou-se uma diminuição nos fluxos do ciclo dos ATCs de 50% entre a fase exponencial inicial e a tardia (fase I e II, respectivamente) (Fig. 3B). No entanto, o ciclo manteve-se activo de modo a assegurar a oxidação das fontes de carbono em ambas as fases da cultura, já que a razão entre os fluxos da citrato sintase (primeira etapa do ciclo dos ATCs) e da glicólise se manteve entre 0,79 e 0,83.

Durante o início da fase exponencial de crescimento, quando a taxa de crescimento é máxima, observou-se um maior consumo de aminoácidos (Tabela II). Tal facto contribui também para a elevada actividade metabólica registada no ciclo dos ATCs já que a sua grande maioria são convertidos a glutamato de modo a entrarem no ciclo como  $\alpha$ -cetoglutarato (Fig. 3B e C). Isto também se traduziu numa maior produção de alanina, como se observou pelo valor mais elevado do fluxo da alanina aminotransferase nesta fase (Fig. 3A).

### 2.1.3 Partição Metabólica ao nível do Piruvato

Para elucidar uma possível relação entre as alterações observadas nos fluxos metabólicos e no estado metabólico das células foram calculados os coeficientes de partição metabólica. Estes coeficientes são definidos como o fluxo de carbono canalizado por uma ramificação pertencente a um “nó” (*node*) metabólico, sendo o seu valor normalizado tendo em conta o total de fluxos compreendidos nesse mesmo nó<sup>[62]</sup>. Da análise dos coeficientes, foi possível verificar que 76 a 81% do total de piruvato provém da glicólise, com uma contribuição muito menor (15 a 80%) da



**Figura 3.** Principais fluxos metabólicos para células Sf9. **(A)** Glicólise e fluxos relacionados, **(B)** Ciclo dos ATCs e reacções anapleróticas, **(C)** Metabolismo de aminoácidos, **(D)** Síntese de macromoléculas. As barras de erro correspondem aos desvios padrão calculados com o *software* FluxAnalyzer.

oxidação de aminoácidos (canalizados até piruvato pelas reacções/vias anapleróticas) (Tabela III). Praticamente todo o piruvato formado (cerca de 90%) foi transformado em acetil-CoA e canalizado para o ciclo dos ATCs ou para a síntese de ácidos gordos durante as diferentes fases. Apenas uma pequena (12 a 13%) foi utilizada na via de destoxificação da amónia através da actividade da alanina aminotransferase (Fig. 3A). Durante as fases consideradas, o fluxo da produção de lactato é residual, demonstrando a elevada capacidade oxidativa das células e que a concentração de oxigénio na cultura (que foi mantida constante a 30% pelo controlador do bioreactor) não foi um factor limitante.

**Tabela III.** Coeficientes de partição metabólica do Piruvato para células Sf9 de *S. frugiperda*.

| Fase              |                      | I           | II          |
|-------------------|----------------------|-------------|-------------|
| Fluxos de entrada | <b>Glicólise</b>     | <b>0,76</b> | <b>0,81</b> |
|                   | <b>Enzima málica</b> | <b>0,18</b> | <b>0,15</b> |
|                   | Outros <sup>a</sup>  | 0,07        | 0,04        |
| Fluxos de saída   | <b>AcCoA</b>         | <b>0,88</b> | <b>0,87</b> |
|                   | <b>Alanina</b>       | <b>0,12</b> | <b>0,13</b> |
|                   | Outros <sup>b</sup>  | 0           | 0           |

Foram consideradas duas fases (*I* e *II*) de crescimento (exponencial inicial e exponencial média/tardia). Os coeficientes de partição metabólica foram calculados como descrito no Anexo I, utilizando os fluxos obtidos para cada fase calculados com o *software* FluxAnalyzer. Outros<sup>a, b</sup> dizem respeito aos fluxos de reacções de contribuição minoritária, e encontram-se listadas no Anexo I.

#### 2.1.4 Metabolismo do azoto

Os aminoácidos com taxas de consumo mais elevadas foram a asparagina, o aspartato, a glutamina e o glutamato (Tabela II), já que para além de ser utilizados na síntese de proteínas, entram nas vias anapleróticas do metabolismo celular, gerando oxaloacetato e  $\alpha$ -cetoglutarato.

Os fluxos mais relevantes do metabolismo dos aminoácidos estão representados na Figura 3C. A produção contínua de alanina ao longo da cultura limitou a acumulação de amónia, daí o elevado fluxo através da enzima alanina aminotransferase (Fig. 3C). A actividade da glutamato sintase (GOGAT) foi maior durante a fase inicial do crescimento exponencial, assim como as da aspartato aminotransferase e da glutamato desidrogenase, pois estas duas enzimas são responsáveis pela síntese de  $\alpha$ -cetoglutarato a partir de glutamato e de oxaloacetato a partir de aspartato. A diminuição do fluxo da aspartato aminotransferase com o aumento da densidade celular é consequência do já mencionado *metabolic switch*, em que o fluxo através do ciclo dos ATCs assim como o consumo de aminoácidos (neste caso, glutamina, glutamato e aspartato).

#### 2.1.5 Reacções anapleróticas

Registou-se uma diminuição do fluxo das reacções anapleróticas com o aumento da densidade celular, como se observa pelos valores relativos à enzima málica, o que revela uma alteração metabólica resultante da diminuição do consumo e incorporação dos aminoácidos no ciclo dos ATCs (Fig. 3B).

### 2.1.6 Síntese de Macromoléculas

Os fluxos representativos da síntese de proteínas e lípidos celulares, bem como de ácidos nucleicos (DNA e RNA) estão representados na Figura 3D. Estes diminuíram ao longo da cultura, acompanhando o decréscimo da taxa de crescimento celular e, por conseguinte, a diminuição geral da actividade metabólica registada.

### 2.1.7 Capacidade celular oxidativa (redox) e *status* energético

Os níveis de produção de ATP desceram para cerca de metade do seu valor inicial como resultado da diminuição do nível de actividade metabólica que acompanha o aumento da densidade celular (Fig. 4). Apesar do decréscimo acentuado dos níveis de produção de ATP, estes permanecem elevados demonstrando a necessidade de energia na manutenção celular.

A transferência dos electrões do NADH e FADH<sub>2</sub> para o O<sub>2</sub> originando H<sub>2</sub>O é fundamental para a manutenção dos níveis de cofactores oxidados (NAD<sup>+</sup>) e assim permitir que os fluxos através do metabolismo oxidativo se mantenham. Logo, os valores de respiração estão directamente correlacionados com o decréscimo dos fluxos das reacções do metabolismo oxidativo celular (glicólise e ciclo dos ATCs, fundamentalmente).

O fluxo através da reacção catalisada pela enzima transidrogenase manteve-se praticamente nulo (dados não expostos). O fluxo da transidrogenase é uma medida da transformação do NADH em NADPH, e o facto de ser praticamente nulo significa que os fluxos determinados de produção de NADPH na via dos fosfatos de pentose são suficientes para manter a síntese de nucleótidos e lípidos, que são as únicas reacções que consomem NADPH.

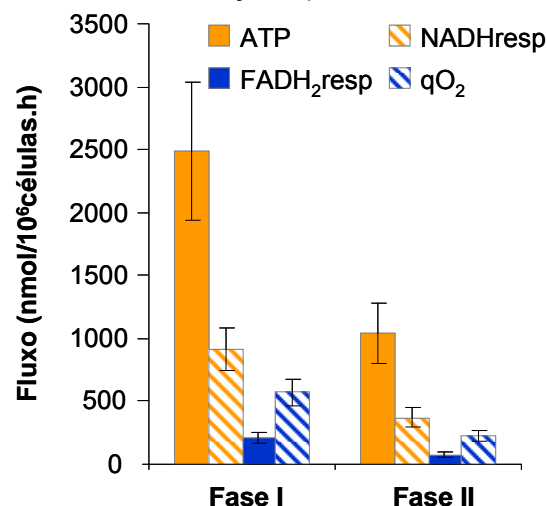


Figura 4. Fluxos da respiração e estimação da produção de ATP para células Sf9.

A taxa específica de consumo de oxigénio foi calculada com base nos fluxos de *uptake* de oxigénio modelados, e diminuiu durante a cultura, o que é consistente com a diminuição do nível de actividade do metabolismo central celular registado entre as fases consideradas.

## 2.2 Perfil de actividade enzimática

Com o objectivo de investigar se as alterações estimadas dos fluxos metabólicos durante as diferentes fases da cultura estão relacionadas com possíveis alterações nos níveis de actividade das enzimas presentes, foi traçado um perfil de actividades enzimáticas durante o crescimento de células Sf9. Foram determinadas as actividades das enzimas que catalisam as reacções das principais vias do metabolismo (glicólise, via dos fosfatos de pentose, ciclo dos ATCs, metabolismo do azoto e metabolismo do piruvato). As medições foram efectuadas em extractos obtidos a partir de amostras de biomassa recolhidas em intervalos de 24 horas directamente do bioreactor, como referido na secção de materiais e métodos. A determinação das actividades enzimáticas foi realizada em condições saturantes de substrato, pelo que dizem respeito à capacidade catalítica máxima das respectivas enzimas nas condições de amostragem. Devido à baixa densidade celular no início da cultura, só foi possível determinar a actividade das enzimas acima descritas uma vez atingida uma densidade de  $2 \times 10^6$  células/mL, aproximadamente.

Para evidenciar o efeito da densidade celular no perfil enzimático da cultura, as actividades foram comparadas de acordo com as fases do crescimento acima descritas, baixa e alta densidade celular (fases I e II, respectivamente). As fases da cultura foram seleccionadas com base em estudos anteriores que reportam a partir de que valor de densidade celular o metabolismo sofre as alterações mais marcantes ( $3 \times 10^6$  células/mL, correspondente a metade da fase exponencial de crescimento), e estão inseridos em cada uma das fases consideradas (Fig. 5)<sup>[3, 10]</sup>.

### 2.2.1 Glicólise e Via dos Fosfatos de Pentose

A tendência registada nos fluxos durante o crescimento celular foi também observada nos valores de capacidade catalítica máxima das enzimas da glicólise. Observou-se um decréscimo na actividade enzimática da hexokinase com o aumento da densidade celular (Fig. 5A). As diferenças entre os valores dos fluxos nas duas fases consideradas foram maiores relativamente àquelas observadas no decréscimo das actividades, já que os valores dos fluxos entre fases diminuíram 50%, enquanto que a hexokinase apresentou um decréscimo de 25% no seu nível de actividade máxima.

Por outro lado, os perfis de actividade enzimática da glucose-6-fosfato desidrogenase e da alanina aminotransferase não acompanharam a tendência registada nos respectivos fluxos (Fig. 5E e 5G). No primeiro caso, os níveis de actividade mantiveram-se constantes ao longo da grande maioria do tempo de cultura, enquanto se observou um aumento de cerca de 15% na

actividade da alanina aminotransferase que coincidiu com o aumento de densidade celular. Contrariamente ao observado durante a análise dos fluxos metabólicos, a enzima lactato desidrogenase apresentou níveis de actividade muito superiores (Fig. 5B).

### 2.2.2 Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (ATCs)

Duas enzimas do ciclo dos ATCs foram estudadas em células Sf9: isocitrato desidrogenase e malato desidrogenase. Em células de mamífero têm sido reportadas duas actividades da isocitrato desidrogenase: uma dependente de  $\text{NAD}^+$  (mitocondrial, a maioritária, que faz parte do ciclo dos ATCs) e outra dependente de  $\text{NADP}^+$  (fundamentalmente citosólica e envolvida na síntese de NADPH). Só foi possível detectar actividade da isocitrato desidrogenase dependente de  $\text{NADP}^+$  em extractos de células de insecto, apesar de ter sido reportado que a actividade maioritária em células de mamífero é dependente de  $\text{NAD}^+$ <sup>[54]</sup>.

Contrariamente ao registado pela análise dos fluxos metabólicos, o efeito da densidade celular no metabolismo de células Sf9 não se traduziu numa relação directa entre a actividade de algumas enzimas que regulam as vias do ciclo dos ATCs. A capacidade catalítica da enzima isocitrato desidrogenase manteve-se, não acompanhando a tendência registada no fluxo da citrato sintase (Fig. 5E e Fig. 3B, respectivamente). Estas duas enzimas podem ser comparadas directamente, uma vez que todo o citrato gerado pela CS é convertido a isocitrato, que posteriormente é transformado a  $\alpha$ -cetoglutarato pela ICDH. Mais ainda, por definição, os fluxos da CS e da ICDH são iguais uma vez que os produtos da primeira reacção são os substratos da segunda e não há reacções secundárias. O mesmo se observa no caso da malato desidrogenase, cujos níveis de actividade também se mantêm constantes ao longo de toda a cultura (Fig. 5D). É importante sublinhar que os níveis de actividade da ICDH são cerca de 20 vezes menores face aos da MDH, o que concorda com o seu papel regulador no ciclo dos ATCs.

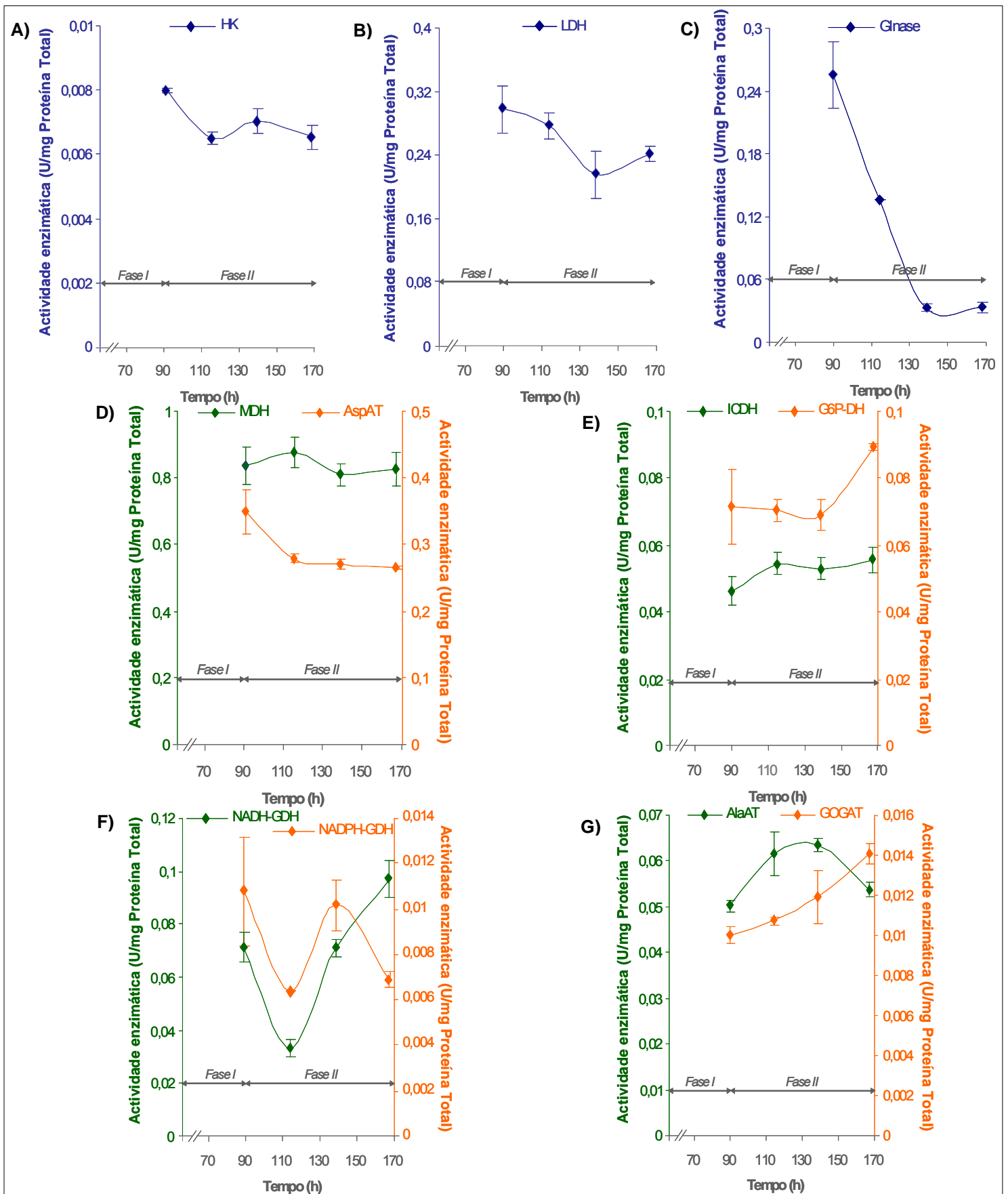
### 2.2.3 Shuttle Malato-Aspartato

Os níveis de actividade da malato desidrogenase e da aspartato aminotransferase mantiveram-se constantes ao longo do tempo de cultura (Fig. 5D). Estas duas enzimas constituem o *shuttle* malato-aspartato, logo os perfis de actividade entre elas foram idênticos pois a função de uma está directamente dependente do funcionamento da outra, e vice-versa. A malato desidrogenase apresentou uma capacidade catalítica global ligeiramente superior à aspartato aminotransferase, já que também se encontra envolvida no ciclo dos ATCs.

### 2.2.4 Metabolismo do azoto

Como já foi descrito, o consumo de aminoácidos e sua incorporação ao nível do  $\alpha$ -cetoglutarato é importante na manutenção da actividade do ciclo dos ATCs em células Sf9.





**Figura 5.** Efeito de densidade celular nas actividades das enzimas que regulam as principais vias do metabolismo em células Sf9 (Glicólise, Via dos Fosfatos de Pentose, Ciclo dos ATCs, Metabolismo do azoto e do piruvato). As médias e desvios padrão foram calculados a partir de quatro medições simultâneas utilizando duas concentrações de extracto diferentes.

As enzimas envolvidas no metabolismo são muito importantes, já que permitem a conversão dos respectivos aminoácidos a  $\alpha$ -cetoglutarato, que pode ser canalizado directamente à via oxidativa. A aspartato aminotransferase (AspAT) apresentou um nível de actividade elevado e constante (Fig. 5D). O nível de actividade da glutaminase, a enzima responsável pela conversão de glutamina a glutamato, a baixa densidade celular, foi quatro vezes superior à actividade máxima da glutamato desidrogenase (NADH-dependente) (Fig. 5C e F). A GDH actua no metabolismo imediatamente a *downstream* da glutaminase e, nesta fase do crescimento de células Sf9, é responsável por regular o metabolismo destes aminoácidos. Pelo contrário, com o aumento da densidade celular este efeito reverte, ou seja, o nível de actividade máxima da glutaminase passou a ser muito inferior relativamente ao da GDH. Observou-se assim uma reversão no esquema de regulação do metabolismo da glutamina/glutamato. Importante de registar são os perfis de actividade da alanina aminotransferase (AlaAT) e da glutamato sintase (GOGAT), que se podem considerar bastante semelhantes (Fig. 5G). Ambas as enzimas actuam em conjunto no processo de destoxificação da amónia em células Sf9.

### 2.3 Relação entre os fluxos metabólicos estimados (*in vivo*) e as actividades enzimáticas medidas (*in vitro*)

De modo a compreender até que ponto a regulação das vias metabólicas está dependente dos níveis de actividade das enzimas correspondentes, foi calculada a razão entre os fluxos estimados e as actividades máximas determinadas (Tabela IV).

**Tabela IV.** Razão entre as actividades enzimáticas máximas medidas *in vitro* e respectivos fluxos metabólicos calculados *in vivo* em células Sf9.

| <b>RAZÃO</b>            | <b>Baixa Densidade Celular</b> | <b>Alta Densidade Celular</b> |
|-------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| <b>Glicólise</b>        |                                |                               |
| HK                      | ~1                             | 1                             |
| LDH                     | 7570                           | 15295                         |
| <b>Via PF</b>           |                                |                               |
| G6P-DH                  | 63                             | 221                           |
| <b>Ciclo dos ATCs</b>   |                                |                               |
| ICDH                    | 1                              | 2                             |
| MDH                     | 14                             | 39                            |
| <b>Metabolismo A.A.</b> |                                |                               |
| Glutaminase             | 26                             | 21                            |
| NADH-GDH                | 16                             | 61                            |
| NADPH-GDH               | 2                              | 7                             |
| GOGAT                   | 2                              | 8                             |
| AlaAT                   | 5                              | 14                            |
| AspAT                   | 95                             | 134                           |

De modo a serem comparáveis, os valores de actividade enzimática utilizados nos cálculos estão compreendidos nos intervalos de tempo da cultura considerados na definição das fases para estimação dos fluxos (fases I e II).

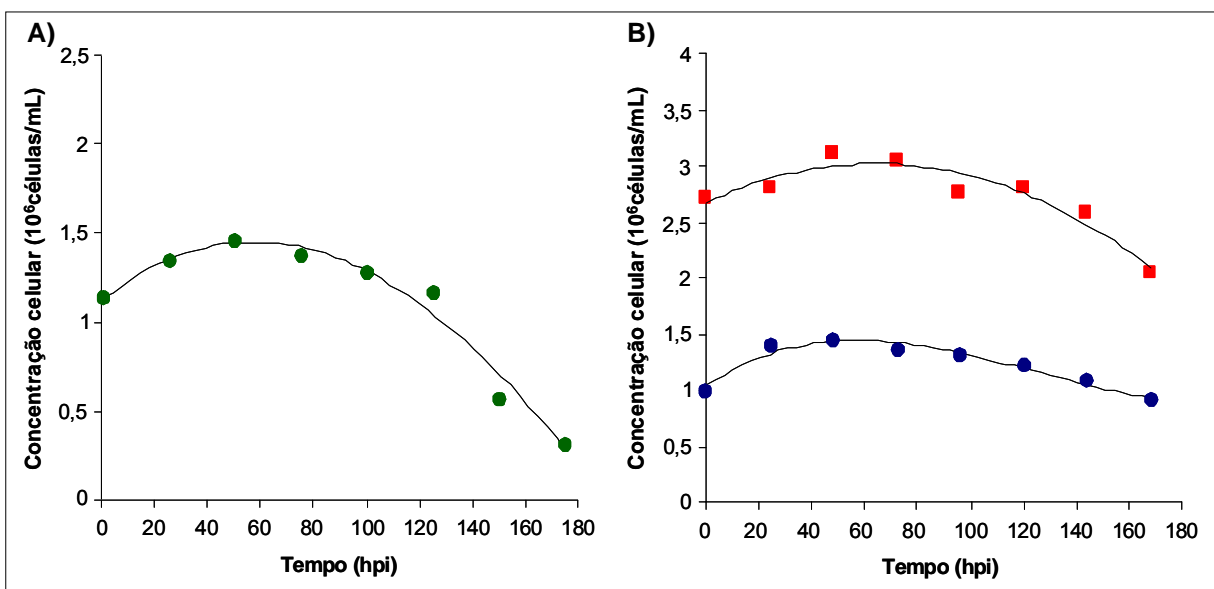
Para a maioria das enzimas a razão fluxo/actividade foi elevada., existindo apenas duas excepções: a hexokinase e a isocitrato desidrogenase. A canalização da glucose consumida pelas células Sf9 na via glicolítica é realizada pela hexokinase. Esta enzima apresenta valores da actividade e fluxos muito semelhantes, logo a razão entre eles ser 1. Esta relação, em células Sf9, é independente da densidade celular. A isocitrato desidrogenase, contrariamente à malato desidrogenase, apresenta uma capacidade catalítica *in vitro* próxima à dos respectivos fluxos *in vivo*, no entanto passou a ser o dobro quando as células atingem elevada densidade em cultura.

Em células infectadas com baculovírus as razões calculadas foram semelhantes (dados não expostos). No entanto, apenas a hexokinase possui valores de actividade catalítica máxima próximos dos respectivos fluxos, independentemente da estratégia de infecção utilizada.

### 3. Efeito da infecção com Baculovírus no metabolismo de células Sf9

#### 3.1 Metabolismo energético

As células Sf9 de *S. frugiperda* foram infectadas em diferentes intervalos de tempo da cultura (correspondentes a concentrações celulares no momento da infecção, CCI, de 1 e 3 x 10<sup>6</sup> células/mL) e com duas multiplicidades de infecção (MOI) distintas (Fig. 7A e B). Uma MOI elevada (neste caso, 5) assegura a infecção sincronizada da cultura juntamente com a paragem da divisão celular, permitindo assim distinguir com maior facilidade os efeitos gerados pelo crescimento e pela infecção. Por outro lado, numa infecção assíncrona com baixa MOI (0,1), as células continuam a dividir-se durante um certo intervalo de tempo, e a relação entre os dois factores (crescimento e infecção) tem que ser considerada na análise dos dados.



**Figura 7.** Cinética de crescimento de células Sf9 após infecção com baculovírus a A) Elevada MOI e CCI 1 (●), e Baixa MOI a baixa CCI (●) e alta CCI (■)

A escolha da CCI teve repercussões em termos de produção viral, já que os níveis de produtividade das células Sf9 foram diferentes consoante o esquema de infecção (Tabela V).

O efeito da densidade celular na produtividade específica das células foi facilmente identificável, já que para baixas MOIs esta diferiu num factor de 3 comparando a infecção a baixa e alta CCI. O factor de amplificação é calculado através da razão entre o título final de vírus produzido e a concentração de vírus inicial com a qual as células foram infectadas. Deste modo, está inversamente correlacionado com a MOI escolhida.

**Tabela V.** Efeito da concentração celular no momento da infecção (CCI) na produção de baculovirus por células Sf9 de *S. frugiperda* infectadas a baixa (0,1) e alta (5) MOI.

| MOI   | CCI<br>(células/mL) | Título Bv<br>(10 <sup>7</sup> pfu/ml) | Productividade específica<br>(pfu/célula) | Factor<br>Amplificação <sup>a</sup> |
|-------|---------------------|---------------------------------------|---|-------------------------------------|
| Baixa | 1 x 10 <sup>6</sup> | 2,9                                   | 29,02                                     | 290                                 |
|       | 3 x 10 <sup>6</sup> | 2,5                                   | 8,33                                      | 83                                  |
| Alta  | 1 x 10 <sup>6</sup> | 6,08                                  | 60,80                                     | 12                                  |

As experiências foram realizadas como referido na secção de Material e Métodos. <sup>a</sup> Razão entre vírus produzidos e vírus utilizados na infecção.

Durante a determinação dos fluxos metabólicos foi considerada uma só fase pós-infecção (Tabela VI). Assim, apenas os dados relativos às primeiras setenta e duas horas após a infecção foram utilizados, já que após este intervalo de tempo começa a ocorrer a acumulação de compostos intracelulares no sobrenadante da cultura como consequência da lise celular.

Observou-se uma correlação directa entre o momento de infecção e o perfil metabólico de consumo em células infectadas, resultante do efeito da densidade celular. De um modo geral, as taxas de consumo diminuíram com o aumento da CCI. Por outro lado, ocorreu também um maior consumo pós-infecção dos principais metabolitos a alta MOI, relativamente a células infectadas a baixa MOI. Os fluxos extracelulares calculados foram utilizados na estimação dos fluxos metabólicos intracelulares em células infectadas, utilizando o modelo já descrito (Fig. 8).

### 3.1.1 Glicólise e Via dos Fosfatos de Pentose

Os fluxos da glicólise e das enzimas alanina aminotransferase e lactato desidrogenase estão de acordo com as taxas extracelulares de consumo/produção dos respectivos metabolitos, e foram condicionados pela MOI e pela CCI no momento da infecção (Fig. 8A).

Os fluxos glicolíticos durante a infecção a alta MOI foram da mesma ordem de grandeza que em células Sf9 não infectadas. No caso da infecção a baixa MOI e CCI 1 registou-se uma diminuição de 30% no fluxo através da glicólise em relação a células não infectadas para o mesmo valor de densidade celular, enquanto que a CCI 3 o fluxo foi semelhante (Fig. 3A e 8A, respectivamente).

### 3.1.2 Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (ATCs)

Os fluxos registados ao longo do ciclo dos ATCs apresentaram-se mais elevados no caso da infecção a alta MOI, relativamente àqueles registados para células não infectadas com semelhante densidade celular (Fig. 4B). No caso da infecção a CCI 3 e baixa MOI, os valores dos fluxos foram equiparáveis aos da cultura não infectada para a mesma concentração celular, no entanto a CCI 1 os valores dos fluxos foram cerca de 30% menores. O efeito da densidade celular no momento da infecção é claro, observando-se um decréscimo no valor dos fluxos entre os perfis das células infectadas a uma concentração de 1 versus  $3 \times 10^6$  células/mL (Fig. 8B).

**Tabela VI.** Taxas específicas de produção/consumo (fluxos extracelulares) dos principais metabolitos para células Sf9 de *S. frugiperda* infectadas com baculovírus.

|                    | Alta MOI |        | Baixa MOI |       |
|--------------------|----------|--------|-----------|-------|
|                    | CCI 1    | CCI 1  | CCI 1     | CCI 3 |
| Glucose            | -79,20   | -39,51 | -26,84    |       |
| Lactato            | 1,66     | 0,11   | -0,61     |       |
| Sucrose            | -10,20   | -0,71  | -3,65     |       |
| Maltose            | -4,78    | -18,02 | -8,12     |       |
| Amónia             | 2,88     | 5,55   | 0,49      |       |
| Aspartato          | -7,85    | -5,32  | -6,14     |       |
| Glutamato          | -1,80    | -7,66  | -2,59     |       |
| Serina             | -13,02   | -7,78  | -5,00     |       |
| Asparagina         | -24,34   | -40,68 | -14,37    |       |
| Glicina            | -8,28    | -2,38  | -1,28     |       |
| Glutamina          | -77,63   | -18,29 | -14,21    |       |
| Treonina           | -0,33    | -1,35  | -1,72     |       |
| Alanina            | 31,28    | 16,44  | 17,32     |       |
| Prolina            | -9,77    | -1,63  | -0,88     |       |
| Tirosina           | -6,16    | -2,43  | -0,97     |       |
| Valina             | -9,58    | -1,61  | -2,07     |       |
| Metionina          | -16,40   | -2,10  | -2,58     |       |
| Isoleucina         | -11,18   | -1,93  | -2,29     |       |
| Leucina            | -7,77    | -3,87  | -2,20     |       |
| Fenilalanina       | -19,34   | -3,68  | -3,59     |       |
| Histidina          | -4,16    | -0,96  | -0,67     |       |
| Arginina           | -3,60    | -3,37  | -2,66     |       |
| Lisina             | -1,19    | -5,80  | -1,58     |       |
| $\mu$ ( $h^{-1}$ ) | 0,01     | 0,009  | 0,006     |       |

As células Sf9 foram infectadas e mantidas em cultura como referido na secção de Materiais e Métodos. Foi considerada uma fase pós-infecção. As taxas estão expressas em  $nmol.(10^6células.h)^{-1}$ .

### 3.1.3 Partição Metabólica ao nível do Piruvato

A taxa mais alta de produção de lactato ocorreu no caso das células infectadas a elevada MOI. Ainda assim, o coeficiente de partição do lactato foi muito baixo em todas as condições, o que indica que não houve limitação de oxigénio nas culturas analisadas (Tabela VIII), uma vez que o

arejamento foi controlado para manter a percentagem de oxigénio dissolvido a 30%. No caso da alanina, os coeficientes de partição foram semelhantes àqueles observados em células não infectadas, oscilando entre 0,14 e 0,18.

O mesmo ocorreu para o caso das reacções anapleróticas, em que os valores dos coeficientes são comparáveis aos calculados para células não infectadas. O coeficiente de partição relativo à produção de acetil-CoA foi elevado nas diferentes estratégias de infecção realizadas. Este atingiu o valor máximo no caso da infecção a baixa CCI e MOI (0,86), revelando uma elevada eficiência na produção de energia das células no período pós-infecção.

**Tabela VIII.** Coeficientes de partição metabólica do Piruvato para células Sf9 de *S. frugiperda* infectadas com baculovírus.

|                   |                      | Alta MOI    | Baixa MOI    |               |
|-------------------|----------------------|-------------|--------------|---------------|
|                   |                      | CCI 1       | CCI 1        | CCI 3         |
| Fluxos de entrada | <b>Glicólise</b>     | <b>0,79</b> | <b>0,84</b>  | <b>0,82</b>   |
|                   | <b>Enzima málica</b> | <b>0,18</b> | <b>0,13</b>  | <b>0,16</b>   |
|                   | Outros <sup>a</sup>  | 0,03        | 0,03         | 0,02          |
| Fluxos de saída   | <b>AcCoA</b>         | <b>0,85</b> | <b>0,86</b>  | <b>0,81</b>   |
|                   | <b>Alanina</b>       | <b>0,14</b> | <b>0,14</b>  | <b>0,18</b>   |
|                   | Lactato              | <b>0,01</b> | <b>0,001</b> | <b>-0,005</b> |

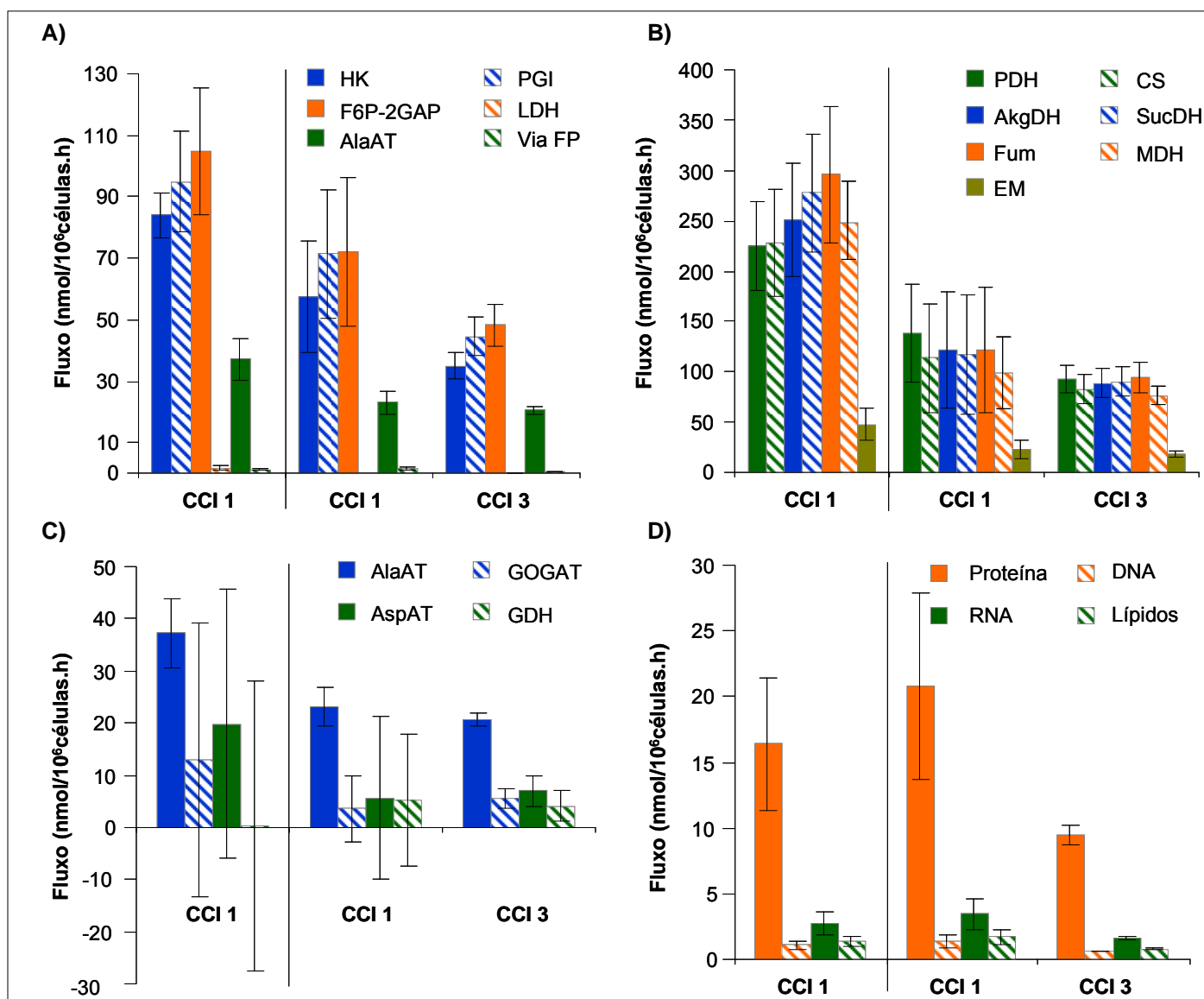
Foi considerada uma fase pós-infecção. Os coeficientes de partição metabólica foram calculados como descrito no Anexo I, utilizando os fluxos obtidos para cada fase calculados com o software FluxAnalyzer. Outros<sup>a</sup> dizem respeito aos fluxos de reacções de contribuição minoritária, e encontram-se listadas no Anexo I.

### 3.1.4 Metabolismo do Azoto

O perfil de consumo de aminoácidos em células infectadas está dependente da estratégia de infecção utilizada. A produção de alanina foi contínua após infecção em todas as diferentes estratégias, sendo máxima durante a infecção com alta MOI. O efeito da densidade celular na produção deste aminoácido não foi tão marcante em células infectadas (Fig. 8C). Por outro lado, os fluxos através da aspartato aminotransferase e glutamato desidrogenase não acompanharam as elevadas taxas de consumo de aminoácidos registadas.

### 3.1.5 Reacções anapleróticas

Relativamente às reacções anapleróticas, os valores dos fluxos foram semelhantes entre células não infectadas e após a infecção (Fig. 3B e 8B, respectivamente). O fluxo da enzima málica foi duas vezes superior na infecção a alta MOI, face a baixa, para a mesma CCI.



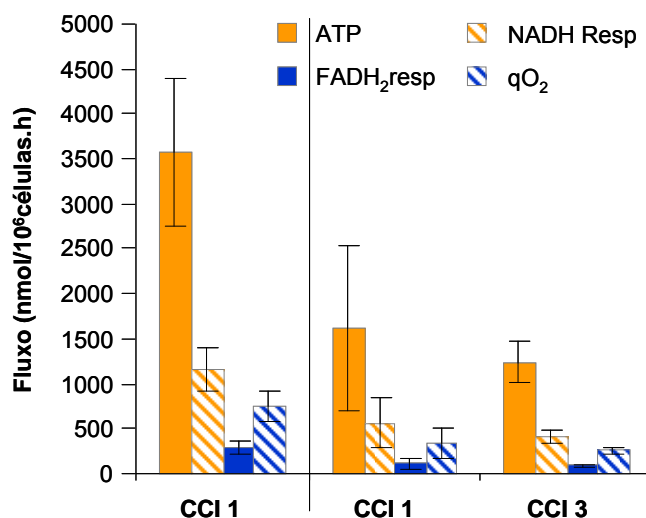
**Figura 8.** Principais fluxos metabólicos para células infectadas com baculovírus a alta (esquerda, 5pfu/célula) e baixa (direita, 0,1 pfu/célula) MOI. As infecções foram realizadas a duas CCIs diferentes (1 e  $3 \times 10^6$  células/mL). **(A)** Glicólise e fluxos relacionados, **(B)** Ciclo dos ATCs e reações anapleróticas, **(C)** Metabolismo do azoto, **(D)** Síntese de macromoléculas. As barras de erro correspondem aos desvios padrão calculados com o *software* FluxAnalyzer.

### 3.1.6 Síntese de Macromoléculas

Os valores das taxas de síntese dos constituintes da biomassa celular diminuíram cerca de 20-30% após infecção como consequência da paragem do crescimento celular. Este efeito mostrou-se dependente da MOI utilizada, sendo mais evidente no caso das células infectadas a alta MOI (Fig. 8D) que cresceram mais lentamente após a infecção.

### 3.1.7 Capacidade celular oxidativa (redox) e *status* energético

Os níveis de síntese de ATP registados nas culturas após infecção seguiram a tendência do estado metabólico das células. Durante a infecção a alta MOI, observou-se um aumento no nível de produção de ATP face a baixa MOI, reflectindo a elevada actividade metabólica através da glicólise e do ciclo dos ATCs (Fig. 9). A taxa específica de consumo de oxigénio em células infectadas a alta MOI sofreu um aumento de cerca de 35% face à da cultura não infectada (Fig. 9 e 4, respectivamente).



**Figura 9.** Fluxos da respiração e estimativa da produção de ATP para células infectadas com baculovírus a alta (esquerda, 5pfu/mL) e baixa (direita, 0,1 pfu/mL) MOI. As infecções foram realizadas a duas CCIs diferentes (1 e  $3 \times 10^6$  células/mL)

## 3.2 Perfil de actividade enzimática

Com o objectivo de estudar o efeito da infecção com baculovírus na actividade das enzimas que regulam as principais vias do metabolismo de células Sf9, foram medidas as actividades enzimáticas nas células sujeitas aos diferentes esquemas de infecção acima descritos. Pela análise do perfil de actividades ao longo do tempo de cultura observou-se que o efeito máximo que o vírus teve registou-se ao fim de setenta e duas horas pós-infecção (dados não apresentados).

### 3.2.1 Glicólise e Via dos Fosfatos de Pentose

Observou-se um decréscimo na actividade enzimática da hexokinase, glucose-6-fosfato desidrogenase, lactato desidrogenase e alanina aminotransferase após a infecção (Fig. 10A, B, C e G). O valor máximo de actividade da hexokinase no momento da infecção ocorreu na infecção a CCI 1 com MOI 0,1, o que está de acordo com o crescimento celular que ocorreu nesta cultura nas primeiras 24 horas, e consequente actividade metabólica. Por outro lado, o



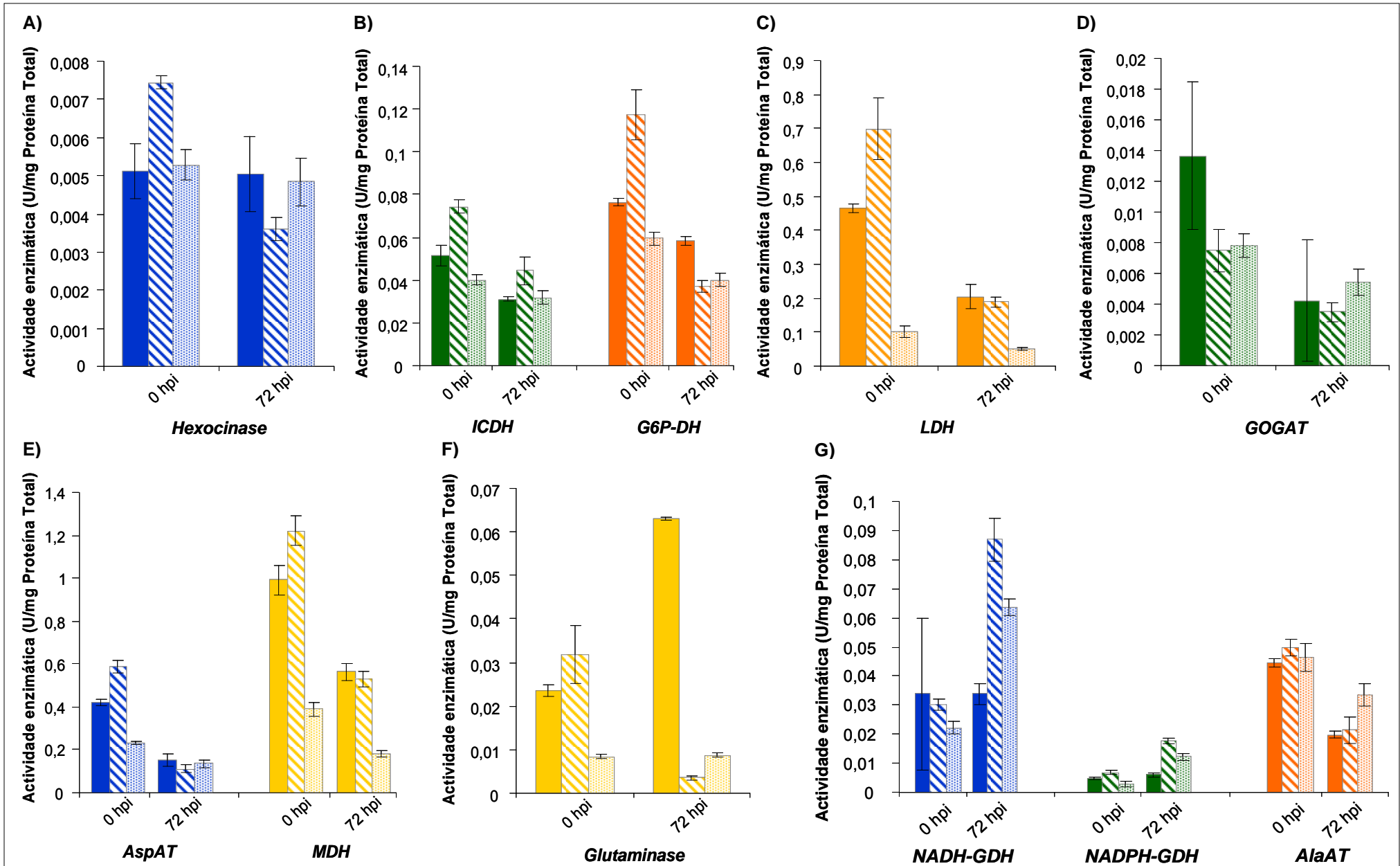
decréscimo na actividade foi também mais marcante nesta cultura face às sujeitas às restantes estratégias de infecção, observando-se uma diminuição da actividade da hexokinase na ordem de 50 %, face a um decaimento catalítico de 2 a 9% nas restantes.

### **3.2.2 Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (ATCs)**

Observou-se uma diminuição na actividade da enzima isocitrato desidrogenase após a infecção nas diferentes culturas (Fig. 10B), reflectindo assim a diminuição dos fluxos pós-infecção através do ciclo dos ATCs. A enzima malato desidrogenase é aquela que possui o nível de actividade máxima mais elevada relativamente às enzimas em estudo, também ela diminuindo a actividade após a infecção (Fig. 10E).

### **3.2.3 Shuttle Malato-Aspartato**

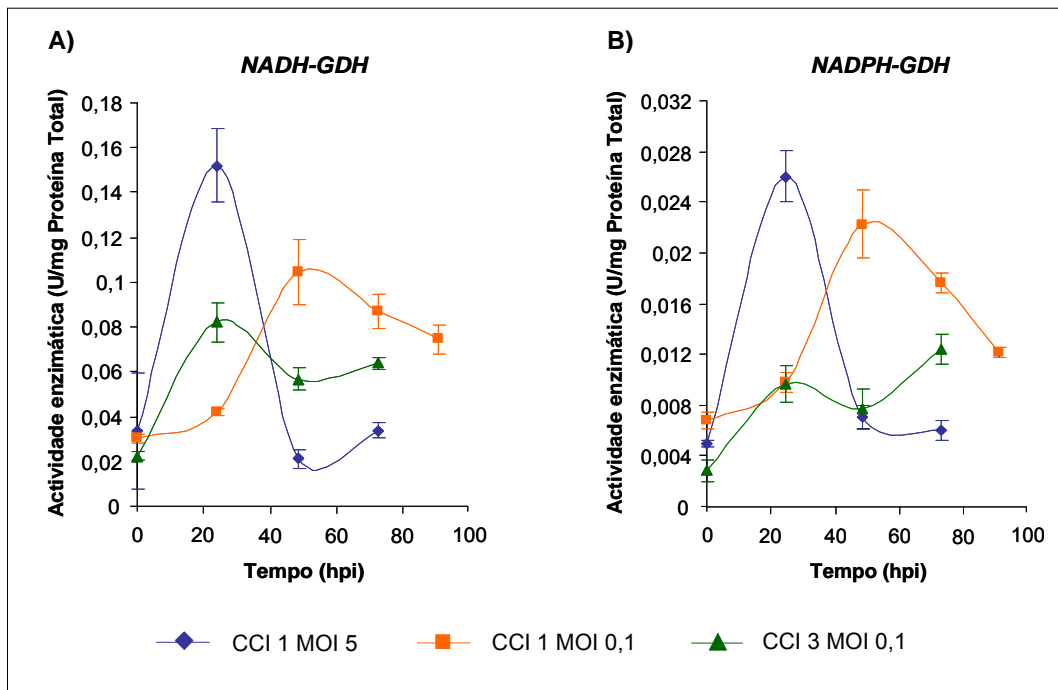
A malato desidrogenase também está envolvida no *shuttle* malato-aspartato, pelo que a actividade determinada corresponde à citosólica e à mitocondrial. O efeito do vírus na enzima aspartato aminotransferase foi mais marcante após a infecção a CCI 1 com MOI 0,1 (Fig. 10E).



**Figura 10.** Efeito da infecção com baculovírus nas atividades das enzimas que regulam as principais vias do metabolismo em células Sf9 a Alta MOI (■) e Baixa MOI a CCI 1 (▨) e CCI 3 (▩). Os valores de actividade estão expressos em Unidade de enzima por miligrama de proteína total.

### 3.2.4 Metabolismo do Azoto

A alteração mais marcante nos níveis de actividade das enzimas que regulam o metabolismo do azoto após infecção foi observada no caso da glutamato desidrogenase. O aumento observado na actividade da GDH (NADH e NADPH-dependente) reflecte a importância do metabolismo do glutamato no período pós infecção, atingindo o valor máximo na infecção a CCI 1 e MOI 0,1 (Fig. 10G). No entanto, comparando os valores de actividade com os fluxos pós-infecção, os primeiros foram muito mais elevados. A actividade da GDH alterou-se imediatamente a seguir à infecção, e a activação destas enzimas mostrou-se dependente da MOI usada. De facto, para alta e baixa MOI, os níveis máximos de actividade foram registados às 24 e 48 hpi, respectivamente, sendo no segundo caso mais tarde devido à infecção assíncrona das células (Fig. 11A e B). No caso da glutaminase, a reproductibilidade dos dados obtidos foi baixa, pelo que é difícil tirar conclusões. A glutamato sintase (GOGAT) é das enzimas que apresenta o nível de actividade enzimática relativo mais baixo, tal como ocorreu durante o crescimento de células Sf9, sinal do papel regulador desta enzima no metabolismo (Fig. 10D e 5D, respectivamente).



**Figura 11.** Efeito da infecção com baculovírus nas actividades das enzimas glutamato desidrogenase NADH e NADPH-dependentes em células Sf9 a alta e baixa MOI (5 e 0,1 pfu/mL). As infecções foram realizadas a duas CCIs diferentes (1 e 3  $\times 10^6$  cels/mL). Os valores de actividade estão expressos em Unidade de enzima por miligrama de proteína total.

## Discussão

O desenvolvimento de uma plataforma de análise metabólica do processo de infecção de células de insecto Sf9 por baculovírus foi realizado neste trabalho. Pela primeira vez dados de fluxos metabólicos pré e pós-infecção foram complementados com a informação do perfil de actividades enzimáticas, oferecendo um maior conhecimento acerca da interacção baculovírus-célula hospedeira. Apesar desta metodologia ter sido muito utilizada na área da engenharia metabólica de microrganismos, a sua aplicação não tem sido estendida à área das células animais. Neermann e Wagner foram os primeiros autores a reportar os níveis das principais actividades enzimáticas no metabolismo primário de células de mamífero e de insecto<sup>[44]</sup>. Vriezen e Van Dijken estudaram até que ponto as diferenças nos fluxos metabólicos numa cultura de células de mieloma operadas em quimiostato, mantendo constante a taxa específica de crescimento, estão relacionados com alterações nos níveis da actividade enzimática<sup>[65]</sup>. Outros autores têm estudado o efeito das condições de cultura nos fluxos metabólicos, as actividades enzimáticas, a expressão génica ou o proteoma de células animais<sup>[55, 57, 73]</sup>.

Segundo o nosso conhecimento, é a primeira vez que a monitorização das actividades enzimáticas é feita em cultura de células Sf9 operada em descontínuo, e após a infecção com baculovírus. Deste modo, o carácter dinâmico da cultura é considerado, o que torna possível o estudo cinético das principais alterações metabólicas causadas pelo efeito da densidade celular e após infecção.

No que diz respeito ao cálculo dos fluxos metabólicos, os nossos resultados estão de acordo com o que foi previamente reportado por Bernal *et al.* e, pela primeira vez, foram complementados com a análise de actividades enzimáticas<sup>[3]</sup>.

Relativamente ao perfil de actividades enzimáticas em células Sf9, vemos que a capacidade catalítica, medida *in vitro*, das enzimas estudadas é elevada e suficiente para permitir a ocorrência dos fluxos calculados *in vivo* (Tabela IV). A actividade enzimática pode ser considerada como o fluxo máximo possível para uma dada via metabólica. Por outro lado, os fluxos metabólicos estimados por MFA são os fluxos reais que ocorrem *in vivo*, sendo iguais ou inferiores às actividades enzimáticas. A comparação entre estas e a magnitude dos fluxos das reacções que catalizam pode indicar quais os passos limitantes no metabolismo celular, e revelar se as vias estão a ocorrer na zona de saturação ou na zona linear da cinética enzimática<sup>[65]</sup>. Este facto é importante pois as enzimas que trabalham na zona de saturação constituem os pontos de controlo mais robustos do metabolismo, uma vez que estando a operar a actividade máxima, não são reguladas pela variação na concentração dos respectivos substratos.

Durante a cultura em descontínuo de células Sf9, os níveis de actividade enzimática tendem a manter-se constantes, ao contrário do que acontece com os fluxos (Fig. 5 e Fig. 3, respectivamente). Apenas a hexokinase apresenta uma ligeira diminuição nos seus níveis de actividade com o aumento da densidade celular, mas esta diferença é muito menor relativamente ao decaimento dos respectivos fluxos (Fig. 5A e Fig. 3A, respectivamente). Do mesmo modo, Vriezen e Van Dijken reportaram que em cultura de células de mamífero SP2/0-Ag14 em quimiostato e fazendo variar as condições de aerobiose, apenas uma pequena parte

da regulação do metabolismo é exercido ao nível enzimático, uma vez que as diferenças observadas nas actividades são residuais relativamente às dos fluxos correspondente<sup>[65]</sup>. Comparando os níveis de actividade catalítica máxima da hexokinase com os respectivos fluxos estimados *in vivo* vemos que apresentam valores semelhantes (Tabela IV). Após a infecção com baculovírus, esta é a única enzima cujo nível de actividade não sofre alterações marcantes (Fig. 10A). Estas duas observações são importantes para a compreensão da regulação do metabolismo do carbono em células Sf9. Sendo a hexokinase a enzima responsável pela primeira etapa da glicólise, a canalização da glucose consumida é directamente proporcional à sua actividade. Por um lado, o facto dos valores dos fluxos serem próximos dos níveis máximos de actividade enzimática revela que esta enzima é um ponto de controlo robusto no fluxo através da glicólise. Por outro lado, a manutenção dos níveis de actividade após infecção com baculovírus evidencia mais ainda a sua importância na manutenção do metabolismo celular também em células infectadas. Deste modo, a hexokinase apresenta um papel fundamental no controlo do metabolismo do carbono e do estado energético em células Sf9 de *Spodoptera frugiperda* através do controlo sobre o fluxo glicolítico. Neermann e Wagner também observaram que, em células animais, o controlo do fluxo através da glicólise é exercido ao nível da hexokinase. Mais especificamente, a actividade da hexokinase é limitante face à das outras enzimas da glicólise em linhas celulares contínuas de mamífero e em células de insecto<sup>[44]</sup>. Contrariamente, Vriezen e Van Dijken observaram em células de mieloma que a actividade da hexokinase está em excesso relativamente ao fluxo medido *in vivo*<sup>[65]</sup>. Estes autores procederam a culturas em quimiostato, ou seja, a taxa específica de crescimento celular foi mantida constante não tendo por isso em conta o carácter dinâmico da evolução de uma cultura celular em descontínuo. Outras enzimas da glicólise podem também estar envolvidas no controlo do metabolismo do carbono, como a fosfofrutokinase, como foi reportado previamente por Brand e Newsholme em culturas *in vitro* de timócitos primários de rato<sup>[45]</sup>.

Especialmente interessante é o caso da enzima lactato desidrogenase (LDH). Contrariamente àquilo observado durante a análise dos fluxos metabólicos, esta enzima apresenta níveis de actividade muito superiores (Fig. 3A e Fig. 5B, respectivamente). Do ponto de vista energético, a transformação de piruvato em acetil-CoA e a canalização deste através do ciclo dos ATCs é preferencial face à produção de lactato. Mais ainda, a LDH possui baixa afinidade para o piruvato, em relação à alta afinidade da piruvato desidrogenase. No entanto, não foi possível analisar a actividade do complexo piruvato desidrogenase, pois os níveis da LDH são tão elevados que se sobrepõem às diferenças de afinidades entre as duas enzimas. Outros autores reconheceram a mesma dificuldade<sup>[44, 65]</sup>. Neerman e Wagner reportaram que o complexo PDH está activo em células Sf9, contrariamente ao que ocorre em células de mamífero<sup>[44]</sup>. De facto, o metabolismo oxidativo de células Sf9 de *Spodoptera frugiperda* foi descrito previamente e elevados fluxos através da PDH foram observados utilizando MFA<sup>[3]</sup>.

Os fluxos através da via dos fosfatos de pentose diminuem com o aumento da densidade celular e após infecção com baculovírus (Fig. 3A e Fig. 8A, respectivamente). Estes dois cenários têm um ponto em comum, o facto de não existir crescimento celular. O efeito da densidade celular é caracterizado pela regulação negativa do metabolismo energético das

células e, como consequência, pela diminuição do crescimento <sup>[10, 11, 49]</sup>. Após a infecção ocorre a paragem do ciclo celular na fase G<sub>2</sub>/M, e o vírus toma o controlo da maquinaria de síntese para a sua replicação<sup>[6]</sup>. Como a via dos fosfatos de pentose é responsável pelo fornecimento de monómeros para biossíntese e equivalentes redutores (NADPH), a sua actividade será elevada enquanto a taxa de crescimento celular for máxima. Durante a diminuição do crescimento celular, as necessidades de componentes e energia para a biossíntese diminuem, o que justifica o decaimento observado nos fluxos. A glucose canalizada para a via dos fosfatos de pentose pode ser consumida, originando nucleótidos, utilizados por exemplo para síntese de ácidos nucleicos, ou reciclada e voltar a entrar novamente na glicólise. Neste momento não temos dados suficientes para diferenciar as percentagens de glucose que é metabolizada nesta via, ou apenas reciclada. Bonarius reportou que, em células de hibridoma, a grande maioria da glucose consumida, cerca de 90%, é canalizada pela via dos fosfatos de pentose a intermediários da glicólise<sup>[5]</sup>. No entanto, experiências com nutrientes marcados radioactivamente em <sup>13</sup>C e <sup>14</sup>C revelaram que uma fracção muito menor do fluxo de glucose, 4 a 10%, passa através da referida via <sup>[25, 39]</sup>. Benslimane também analisou o fluxo através da via dos fosfatos de pentose nas linhas celulares de insecto Sf9 e HighFive, e observou que 14% a 17% do total de glucose consumida é canalizada para esta via<sup>[2]</sup>.

Considerando as enzimas do ciclo dos ATCs, vemos que os valores de actividade da isocitrato desidrogenase (ICDH) são muito inferiores face aos da malato desidrogenase (MDH) (Fig. 5E e 5D, respectivamente). A ICDH catalisa a primeira etapa imediatamente a seguir à entrada de acetil-CoA no ciclo, sendo considerada uma enzima limitante no fluxo através deste, enquanto que a MDH actua mais à frente. A posição destas duas enzimas no ciclo dos ATCs é importante e, juntamente com o envolvimento da MDH no *shuttle* malato-aspartato, justifica o facto de as termos seleccionado para análise neste trabalho. A organização destas duas enzimas leva-nos a pensar que, a existir um ponto de controlo no ciclo dos ATCs, a ICDH é a candidata. Os valores de actividade da ICDH são também da mesma ordem de grandeza dos respectivos fluxos estimados *in vivo*, provando o seu papel no controlo do fluxo através do ciclo dos ATCs (Tabela IV). Este facto está em concordância com aquilo que foi previamente demonstrado por outros autores<sup>[65]</sup>. No entanto, após infecção, esta enzima deixa de operar a velocidade máxima, perdendo o seu carácter limitante, ao contrário da hexokinase (Fig. 10B), apoiando a hipótese de que a hexokinase será o principal ponto de controlo do metabolismo do carbono em células Sf9. De facto, a nossa equipa tem demonstrado que a alteração dos fluxos através do ciclo dos ATCs pela adição de piruvato e α-cetoglutarato é possível e permite uma melhoria na produção de baculovírus<sup>[9]</sup>.

Chegados a este ponto do trabalho, é evidente que a actividade limitante das enzimas hexokinase e isocitrato desidrogenase é um ponto-chave na regulação do metabolismo do carbono em células Sf9. Deste modo, surge a questão se o controlo dos fluxos exercido por estas enzimas é resultado da diminuição da sua síntese, ou se ocorre por modulação da actividade enzimática em si. Já que os níveis de actividade das restantes enzimas da glicólise e do ciclo dos ATCs tendem a manter-se constantes ao longo de toda a cultura (Fig. 5), parece ser possível que o controlo dos fluxos ocorra principalmente devido à modulação da actividade da hexokinase e isocitrato desidrogenase, por alteração na concentração dos respectivos

efectores (activadores e/ou inibidores), e a menor nível pela diminuição da sua síntese. Resultados idênticos podem ser observados em células Sf9 infectadas com baculovírus. Após infecção, a única enzima que apresenta valores de actividade próximos do fluxo determinado *in vivo* é a hexokinase (dados não expostos). De facto, Stansfield *et al.* determinaram que, durante a produção de anticorpo monoclonal recombinante em células GS-NS0, as alterações observadas nos fluxos metabólicos não estavam relacionadas com alterações no proteoma celular durante a cultura<sup>[57]</sup>. Estes autores descreveram que as diferenças na produtividade e taxas metabólicas específicas seriam provavelmente devidas a alterações na taxa de crescimento. Mais ainda, observaram que as flutuações no estado metabólico ocorreram maioritariamente dentro dos níveis do proteoma existente. Assim, podemos inferir que a modulação dos fluxos metabólicos ocorre principalmente por alterações na cinética das reacções, já que os níveis de síntese proteica não parecem ser alterados<sup>[34, 35, 55, 65]</sup>. Este tipo de regulação é vantajoso para as células, pois permite uma resposta adaptativa mais rápida face às modificações do meio envolvente.

O ciclo dos ATCs é “alimentado” a dois níveis, através da acção da piruvato desidrogenase que origina acetil-CoA, e da glutaminólise que origina  $\alpha$ -cetoglutarato. O metabolismo da glutamina é por isso fundamental à manutenção do *status* energético celular. O catabolismo deste aminoácido pode ocorrer através de oito vias diferentes<sup>[21]</sup>. Uma observação importante é a semelhança entre os perfis de actividade da glutamato sintase (GOGAT) e da alanina aminotransferase (AlaAT) durante a cultura em descontínuo de células Sf9 (Fig. 5G). Estas duas enzimas são muito importantes no metabolismo de células Sf9, pois são responsáveis pela ausência de produção de amónia durante o catabolismo da glutamina, uma das características que as torna vantajosas face às células de mamífero. Para tal, possuem um mecanismo altamente eficiente que se baseia na actividade de ambas, durante o qual a GOGAT transfere o grupo amida da glutamina ao  $\alpha$ -cetoglutarato, originando glutamato, e a AlaAT o grupo amina do glutamato ao piruvato, originando alanina e  $\alpha$ -cetoglutarato (Fig. 2).

Relativamente ao metabolismo do azoto, a glutamato desidrogenase (GDH) apresenta perfis únicos de actividade durante a cultura de células Sf9 e após infecção face às restantes enzimas analisadas. Durante toda a cultura, a actividade da GDH NADH-dependente foi cerca de 4 a 6 vezes maior que a da NADPH-dependente, no entanto os seus perfis de actividade são iguais (Fig. 5F). Este último facto faz-nos pensar em duas hipóteses acerca do mecanismo de regulação a que estas duas enzimas possam estar sujeitas. Ou são enzimas que estão sob a mesma regulação génica, uma vez que a actividade de uma acompanha a actividade da outra, ou então a glutamato desidrogenase é apenas uma única enzima capaz de operar com os dois cofactores (NADH e NADPH). De facto, se pensarmos que a disponibilidade de NADPH, face à de NADH, é menor uma vez que é necessário à biossíntese de componentes celulares, justifica-se a menor actividade da glutamato desidrogenase NADPH-dependente em relação à GDH NADH-dependente. A actividade da GDH-NADPH dependente e da GDH-NADH dependente aumentou com a densidade celular, coincidindo com a fase estacionária da cultura. Após infecção com baculovírus, estas foram as únicas enzimas que sofreram um aumento na actividade catalítica máxima, especialmente quando as infecções foram realizadas a baixa densidade celular (Fig. 10G). Deste modo, a regulação da actividade da glutamato

desidrogenase parece estar inversamente relacionada com o crescimento celular, o que explica a sua maior actividade na fase estacionária da cultura e especialmente após a paragem do ciclo celular durante a infecção com o vírus. Assim, o metabolismo do azoto em células Sf9 parece estar relacionado com a fase do ciclo celular. Numa primeira etapa, em que as células estão na fase exponencial de crescimento, a GOGAT e a alanina aminotransferase podem actuar preferencialmente. Durante a fase estacionária e após infecção com baculovírus, em que deixa de haver crescimento celular, o catabolismo de fontes de azoto passa a ser da responsabilidade de outro conjunto de enzimas como a glutaminase, glutamato desidrogenase e alanina aminotransferase. A principal diferença entre estes dois esquemas é o envolvimento do cofactor NADPH, que passa a estar disponível em maiores quantidades devido à diminuição da biossíntese e necessidades energéticas na ausência de crescimento celular.

Relativamente ao processo de infecção, o aumento da actividade da glutamato desidrogenase causada pelo vírus pode assegurar a produção de  $\alpha$ -cetogluturato, mantendo o *status* energético celular, o que é vantajoso para a replicação viral. Carinhas *et al.* observaram que a adição de  $\alpha$ -cetogluturato à cultura de células Sf9 no momento da infecção com baculovírus resultou num aumento na produtividade, com títulos virais 6 a 7 vezes superiores relativamente às culturas controlo<sup>[9]</sup>. Martinelle *et al.* observaram que em células de mamífero (hibridoma e mieloma) cultivadas na ausência de glucose as actividades das enzimas glutaminase e glutamato desidrogenase aumentaram<sup>[41]</sup>. Ambas as enzimas parecem estar reguladas negativamente na presença deste açúcar, e na sua ausência respondem de modo a assegurarem a produção de energia celular. Este mecanismo parece ser activado quando a célula se encontra em condições adversas, e reflecte uma capacidade adaptativa da célula às alterações do meio envolvente. Taegtmeyer *et al.* reportaram que, em humanos, a actividade da glutamato desidrogenase é controlada através do nível de fosforilação do ADP que, por sua vez, está sob dependência do gene *sirt4*<sup>[59]</sup>. Esta regulação é diminuída em resposta à restrição calórica e a baixos níveis de glucose na corrente sanguínea. Nestas circunstâncias, a actividade da glutamato desidrogenase é aumentada de modo a ser produzido  $\alpha$ -cetogluturato, o que ultimamente vai resultar na produção de energia devido à canalização deste para o ciclo dos ATCs. À luz dos nossos resultados, um mecanismo semelhante a operar em células Sf9 infectadas com baculovírus faz todo o sentido, já que pode assegurar os níveis de energia necessários à manutenção celular que estas células necessitam, como foi reportado por Bernal *et al.*<sup>[3]</sup>.

O facto das razões calculadas para algumas das enzimas que regulam o metabolismo do azoto serem da ordem de grandeza das unidades suporta o elevado consumo de aminoácidos pelas células Sf9, e que os níveis de actividade acompanham o elevado fluxo registado nestas vias (Tabela IV). Estes resultados estão em concordância com o observado previamente por outros autores, que também registaram que os níveis das enzimas do metabolismo do azoto são maiores relativamente ao metabolismo do carbono<sup>[44, 65]</sup>.

É ainda importante salientar que, de um modo geral, as actividades enzimáticas das culturas infectadas a elevada densidade celular são menores relativamente àquelas infectadas a baixa densidade (Fig. 10). Tal acontecimento deve-se ao longo período de cultura, reflectindo a diminuição da actividade metabólica causada pelo efeito da densidade celular. Como



consequência, a produtividade específica destas culturas é menor (Tabela VI), como já foi previamente publicado<sup>[9]</sup>.

O estudo comparativo entre os perfis de actividade das enzimas que regulam as principais vias metabólicas em células Sf9 e respectivos fluxos, permitiu-nos descobrir quais os pontos de controlo do metabolismo. A hexokinase é a enzima responsável pelo controlo do fluxo da glicólise, e a isocitrato desidrogenase limita o fluxo através do ciclo dos ATCs. O vírus causa o aumento da actividade da glutamato desidrogenase, assegurando assim a produção de  $\alpha$ -cetoglutarato para manter o *status* energético celular, e assegurar assim a sua própria replicação. Durante a infecção com baculovírus, as restantes actividades enzimáticas diminuíram como resultado da repressão da expressão dos genes da célula hospedeira. A quantificação combinada da magnitude dos fluxos das vias metabólicas e da cinética das enzimas que os regulam, é uma estratégia que se revela pertinente para a compreensão da regulação do metabolismo celular. Como aqui demonstrámos, torna possível a identificação dos pontos de controlo metabólicos mais robustos que é de extrema importância na área da engenharia metabólica. Por outro lado, a compreensão da dinâmica da interacção entre o vírus e a célula oferece uma visão mais abrangente acerca da resposta fisiológica à infecção, e daí ver quais as vias metabólicas em que o vírus interfere.

## Conclusões e Perspectivas de Trabalho Futuro

O trabalho realizado nesta Tese de Mestrado visava a melhor compreensão do processo de infecção por baculovírus em células de insecto sob uma perspectiva metabólica. Mais concretamente, pretendia-se caracterizar o metabolismo celular e as alterações que nele ocorrem devidas ao efeito da densidade celular e ao próprio vírus, perceber como se processa a regulação do metabolismo e, principalmente, como o vírus a manipula para proveito próprio, ou seja, para se replicar.

O estudo combinado de fluxos e actividades enzimáticas permitiu-nos identificar as principais vias de controlo do metabolismo de células Sf9. Os resultados obtidos mostraram dois pontos-chave no controlo do metabolismo oxidativo: a regulação do fluxo glicolítico é exercida pela hexokinase, enquanto que a isocitrato desidrogenase é responsável pela actividade do ciclo dos ATCs. O baculovírus provoca um aumento na actividade da glutamato desidrogenase, de modo a manter o *status* energético celular, assegurando assim melhores condições para a sua replicação. O estudo dos fluxos revelou que esta via e, em geral, todas as do metabolismo de aminoácidos, não estão limitadas ao nível das actividades enzimáticas.

Este trabalho permitiu-nos identificar e aceder aos pontos de controlo do metabolismo, oferecendo novas perspectivas para o melhoramento do bioprocessamento. A hexokinase e a isocitrato desidrogenase apresentam-se como potenciais alvos para engenharia metabólica tendo em vista o aumento do rendimento da produção de baculovírus e vectores derivados. Neste contexto, a sobre-expressão destas enzimas é aconselhada e surge como perspectiva imediata de trabalho futuro. Deste modo, espera-se um aumento na disponibilidade de ATP gerado e, conseqüentemente, a melhoria do *status* energético celular. Isto irá favorecer a produção de vírus, uma vez que a replicação viral está intimamente relacionada com o *status* energético celular.

Como ficou aqui demonstrado, a utilização de ferramentas de análise metabólica permite ganhar um maior conhecimento acerca da dinâmica da interacção baculovírus-célula hospedeira. Neste sentido, o estudo da biologia do sistema BEVS-IC é fortemente aconselhado, sobretudo sob uma perspectiva global e abrangente que consiga correlacionar diferentes processos celulares e a respectiva regulação. Duas abordagens surgem como candidatas: a transcritómica e a proteómica. Os perfis de transcrição e das proteínas presentes na célula podem oferecer novas ideias acerca do metabolismo celular, sua regulação e principais alterações causadas pelo vírus. Por um lado, tornam possível compreender como a regulação da expressão génica ocorre, quais os genes que são expressos diferencialmente e de que modo isso é reflectido na fisiologia da célula e, por outro lado, a análise do proteoma permite-nos saber de facto quais os transcritos que deram origem a proteínas. A combinação entre estes dois tipos de dados, juntamente com o perfil de actividades enzimáticas e fluxos metabólicos, oferecerá uma visão global do metabolismo e permitirá saber com maior precisão como se processa a regulação das etapas chave do metabolismo e de como são subvertidas pelo vírus durante a infecção. Deste modo, irá possibilitar a delineação de novas estratégias tendo em vista a optimização de bioprocessos baseados no sistema BEVS-IC.

## Referências Bibliográficas

1. Atkinson, A.E., et al., *Assembly of functional GABAA receptors in insect cells using baculovirus expression vectors*. Neuroreport, 1992. 3(7): p. 597-600.
2. Benslimane, C., et al., *Insights into the central metabolism of *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) and *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (Tn-5) insect cells by radiolabeling studies*. Biotechnol Prog, 2005. 21(1): p. 78-86.
3. Bernal, V., et al., *Cell density effect in the baculovirus-insect cells system: a quantitative analysis of energetic metabolism*. Biotechnol Bioeng, 2009. 104(1): p. 162-80.
4. Blissard, G.W., *Baculovirus--insect cell interactions*. Cytotechnology, 1996. 20(1-3): p. 73-93.
5. Bonarius, H.P., et al., *Metabolic flux analysis of hybridoma cells in different culture media using mass balances*. Biotechnol Bioeng, 1996. 50(3): p. 299-318.
6. Braunagel, S.C., et al., *Autographa californica nucleopolyhedrovirus infection results in Sf9 cell cycle arrest at G2/M phase*. Virology, 1998. 244(1): p. 195-211.
7. Calles, K., U. Eriksson, and L. Haggstrom, *Effect of conditioned medium factors on productivity and cell physiology in *Trichoplusia ni* insect cell cultures*. Biotechnol Prog, 2006. 22(3): p. 653-9.
8. Calles, K., et al., *Effects of conditioned medium factors and passage number on Sf9 cell physiology and productivity*. Biotechnol Prog, 2006. 22(2): p. 394-400.
9. Carinhas, N., et al., *Improving baculovirus production at high cell density through manipulation of energy metabolism*. Metab Eng, 2009.
10. Carinhas, N., et al., *Baculovirus production for gene therapy: the role of cell density, multiplicity of infection and medium exchange*. Appl Microbiol Biotechnol, 2009. 81(6): p. 1041-9.
11. Caron, A.W., J. Archambault, and B. Massie, *High-level recombinant protein production in bioreactors using the baculovirus-insect cell expression system*. Biotechnol Bioeng, 1990. 36(11): p. 1133-40.
12. Carstens, E.B., S.T. Tjia, and W. Doerfler, *Infectious DNA from *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus*. Virology, 1980. 101(1): p. 311-4.
13. Cruz, P.E., et al., *Optimization of the production of virus-like particles in insect cells*. Biotechnol Bioeng, 1998. 60(4): p. 408-18.
14. Doverskog, M., et al., *Determination of NADH-dependent glutamate synthase (GOGAT) in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) insect cells by a selective  $1\text{H}/15\text{N}$  NMR in vitro assay*. J Biotechnol, 2000. 79(1): p. 87-97.
15. Doverskog, M., et al., *Physiology of cultured animal cells*. J Biotechnol, 1997. 59(1-2): p. 103-15.
16. Drews, M., et al., *Pathways of glutamine metabolism in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) insect cells: evidence for the presence of the nitrogen assimilation system, and a metabolic switch by  $1\text{H}/15\text{N}$  NMR*. J Biotechnol, 2000. 78(1): p. 23-37.
17. Federici, B.A., *Ultrastructure of baculoviruses*, in *The biology of baculoviruses*, R.R.F. Granados, B.A. , Editor. 1986, CRC Press: Florida CRC Press. p. p.61-88.
18. Granados, R.R. and K.A. Lawler, *In vivo pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection*. Virology, 1981. 108(2): p. 297-308.
19. Granados, R.R., T. Nguyen, and B. Cato, *An insect cell line persistently infected with a baculovirus-like particle*. Intervirology, 1978. 10(5): p. 309-17.
20. Granados, R.R.W., K.A., *In vivo infection and replication of baculovirus*, in *The biology of baculoviruses*, R.R.F. Granados, B.A. , Editor. 1986, CRC Press: Florida. p. p.89-108.
21. Häggström, L., *Energetics of glutaminolysis -a theoretical evaluation in Production of Biologicals from Animal Cells in Culture*, J.G.a.B.M. RE Spier, Editor. 1991, Butterworth-Heinemann Ltd: Oxford. p. 79–81.
22. Hitchman, R.B., R.D. Possee, and L.A. King, *Baculovirus expression systems for recombinant protein production in insect cells*. Recent Pat Biotechnol, 2009. 3(1): p. 46-54.
23. Hu, Y.C., *Baculoviral vectors for gene delivery: a review*. Curr Gene Ther, 2008. 8(1): p. 54-65.
24. Ikonomou, L., Y.J. Schneider, and S.N. Agathos, *Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins*. Appl Microbiol Biotechnol, 2003. 62(1): p. 1-20.

25. Jan, D.C., et al., *The effect of dissolved oxygen on the metabolic profile of a murine hybridoma grown in serum-free medium in continuous culture*. Biotechnol Bioeng, 1997. 54(2): p. 153-64.
26. Kawamoto, F., N. Kumada, and M. Kobayashi, *Envelopment of the nuclear polyhedrosis virus of the oriental tussock moth, Euproctis subflava*. Virology, 1977. 77(2): p. 867-71.
27. Keddie, B.A., G.W. Aponte, and L.E. Volkman, *The pathway of infection of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus in an insect host*. Science, 1989. 243(4899): p. 1728-30.
28. Kelly, D.C., et al., *Induction of a nonoccluded baculovirus persistently infecting Heliothis zea cells by Heliothis armigera and Trichoplusia ni nuclear polyhedrosis viruses*. Virology, 1981. 112(1): p. 174-89.
29. Kinnunen, K., et al., *Baculovirus is an efficient vector for the transduction of the eye: comparison of baculovirus- and adenovirus-mediated intravitreal vascular endothelial growth factor D gene transfer in the rabbit eye*. J Gene Med, 2009. 11(5): p. 382-9.
30. Kitano, H., *Looking beyond the details: a rise in system-oriented approaches in genetics and molecular biology*. Curr Genet, 2002. 41(1): p. 1-10.
31. Klamt, S., S. Schuster, and E.D. Gilles, *Calculability analysis in underdetermined metabolic networks illustrated by a model of the central metabolism in purple nonsulfur bacteria*. Biotechnol Bioeng, 2002. 77(7): p. 734-51.
32. Klamt, S., et al., *FluxAnalyzer: exploring structure, pathways, and flux distributions in metabolic networks on interactive flux maps*. Bioinformatics, 2003. 19(2): p. 261-9.
33. Kloppinger, M., et al., *Multistage production of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus in insect cell cultures*. Cytotechnology, 1990. 4(3): p. 271-8.
34. Korke, R., et al., *Large scale gene expression profiling of metabolic shift of mammalian cells in culture*. J Biotechnol, 2004. 107(1): p. 1-17.
35. Korke, R., et al., *Genomic and proteomic perspectives in cell culture engineering*. J Biotechnol, 2002. 94(1): p. 73-92.
36. Kost, T.A. and J.P. Condey, *Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors*. Trends Biotechnol, 2002. 20(4): p. 173-80.
37. Kost, T.A., J.P. Condey, and D.L. Jarvis, *Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells*. Nat Biotechnol, 2005. 23(5): p. 567-75.
38. Lowy, D.R. and J.T. Schiller, *Prophylactic human papillomavirus vaccines*. J Clin Invest, 2006. 116(5): p. 1167-73.
39. Mancuso, A., et al., *Examination of primary metabolic pathways in a murine hybridoma with carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Biotechnol Bioeng, 1994. 44(5): p. 563-85.
40. Maranga, L., et al., *Large scale production and downstream processing of a recombinant porcine parvovirus vaccine*. Appl Microbiol Biotechnol, 2002. 59(1): p. 45-50.
41. Martinelle, K., et al., *Elevated glutamate dehydrogenase flux in glucose-deprived hybridoma and myeloma cells: evidence from 1H/15N NMR*. Biotechnol Bioeng, 1998. 60(4): p. 508-17.
42. Mena, J.A., O.T. Ramirez, and L.A. Palomares, *Intracellular distribution of rotavirus structural proteins and virus-like particles expressed in the insect cell-baculovirus system*. J Biotechnol, 2006. 122(4): p. 443-52.
43. Murhammer, D.W., *Review and patents and literature. The use of insect cell cultures for recombinant protein synthesis: Engineering aspects*. Appl Biochem Biotechnol, 1991. 31(3): p. 283-310.
44. Neermann, J. and R. Wagner, *Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells*. J Cell Physiol, 1996. 166(1): p. 152-69.
45. Newsholme, E.A., et al., *The maximum activities of enzymes that are involved in substrate cycles in liver and muscle of obese mice*. Biochem J, 1979. 182(2): p. 621-4.
46. Oker-Blom, C., K.J. Airene, and R. Grabherr, *Baculovirus display strategies: Emerging tools for eukaryotic libraries and gene delivery*. Brief Funct Genomic Proteomic, 2003. 2(3): p. 244-53.

47. Palomares, L.A., S. Estrada-Mondaca, and O.T. Ramirez, *Production of recombinant proteins: challenges and solutions*. Methods Mol Biol, 2004. 267: p. 15-52.
48. Patterson, R.M., J.K. Selkirk, and B.A. Merrick, *Baculovirus and insect cell gene expression: review of baculovirus biotechnology*. Environ Health Perspect, 1995. 103(7-8): p. 756-9.
49. Reuveny, S., et al., *Production of recombinant proteins in high-density insect cell cultures*. Biotechnol Bioeng, 1993. 42(2): p. 235-9.
50. Richards, A., M. Matthews, and P. Christian, *Ecological considerations for the environmental impact evaluation of recombinant baculovirus insecticides*. Annu Rev Entomol, 1998. 43: p. 493-517.
51. Roldao, A., et al., *Error assessment in recombinant baculovirus titration: evaluation of different methods*. J Virol Methods, 2009. 159(1): p. 69-80.
52. Savinell, J.M. and B.O. Palsson, *Optimal selection of metabolic fluxes for in vivo measurement. I. Development of mathematical methods*. J Theor Biol, 1992. 155(2): p. 201-14.
53. Savinell, J.M. and B.O. Palsson, *Optimal selection of metabolic fluxes for in vivo measurement. II. Application to Escherichia coli and hybridoma cell metabolism*. J Theor Biol, 1992. 155(2): p. 215-42.
54. Sazanov, L.A. and J.B. Jackson, *Proton-translocating transhydrogenase and NAD- and NADP-linked isocitrate dehydrogenases operate in a substrate cycle which contributes to fine regulation of the tricarboxylic acid cycle activity in mitochondria*. FEBS Lett, 1994. 344(2-3): p. 109-16.
55. Seow, T.K., et al., *Proteomic investigation of metabolic shift in mammalian cell culture*. Biotechnol Prog, 2001. 17(6): p. 1137-44.
56. Simpson, T.W., H. Shimizu, and G. Stephanopoulos, *Experimental determination of group flux control coefficients in metabolic networks*. Biotechnol Bioeng, 1998. 58(2-3): p. 149-53.
57. Stansfield, S.H., et al., *Dynamic analysis of GS-NS0 cells producing a recombinant monoclonal antibody during fed-batch culture*. Biotechnol Bioeng, 2007. 97(2): p. 410-24.
58. Summers, M.D., *Milestones leading to the genetic engineering of baculoviruses as expression vector systems and viral pesticides*. Adv Virus Res, 2006. 68: p. 3-73.
59. Taegtmeier, H., et al., *Metabolic energetics and genetics in the heart*. Ann N Y Acad Sci, 2005. 1047: p. 208-18.
60. Taticek, R.A. and M.L. Shuler, *Effect of elevated oxygen and glutamine levels on foreign protein production at high cell densities using the insect cell-baculovirus expression system*. Biotechnol Bioeng, 1997. 54(2): p. 142-52.
61. Urabe, M., C. Ding, and R.M. Kotin, *Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors*. Hum Gene Ther, 2002. 13(16): p. 1935-43.
62. Vallino, J.J. and G. Stephanopoulos, *Metabolic flux distributions in Corynebacterium glutamicum during growth and lysine overproduction*. Biotechnol Bioeng, 1993. 41(6): p. 633-46.
63. Vieira, H.L., et al., *Triple layered rotavirus VLP production: kinetics of vector replication, mRNA stability and recombinant protein production*. J Biotechnol, 2005. 120(1): p. 72-82.
64. Volkman, L.E., *Baculovirus bounty*. Science, 1995. 269(5232): p. 1834.
65. Vriezen, N. and J.P. van Dijken, *Fluxes and enzyme activities in central metabolism of myeloma cells grown in chemostat culture*. Biotechnol Bioeng, 1998. 59(1): p. 28-39.
66. Wang, N.S. and G. Stephanopoulos, *Application of macroscopic balances to the identification of gross measurement errors*. Biotechnol Bioeng, 1983. 25(9): p. 2177-208.
67. Whitt, M.A. and J.S. Manning, *A phosphorylated 34-kDa protein and a subpopulation of polyhedrin are thiol linked to the carbohydrate layer surrounding a baculovirus occlusion body*. Virology, 1988. 163(1): p. 33-42.
68. Wickham, T.J., et al., *General analysis of receptor-mediated viral attachment to cell surfaces*. Biophys J, 1990. 58(6): p. 1501-16.
69. Wiechert, W., *Modeling and simulation: tools for metabolic engineering*. J Biotechnol, 2002. 94(1): p. 37-63.

70. Williams, G.V., et al., *A cytopathological investigation of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus p10 gene function using insertion/deletion mutants*. J Gen Virol, 1989. 70 ( Pt 1): p. 187-202.
71. Winstanley, D. and N.E. Crook, *Replication of Cydia pomonella granulosis virus in cell cultures*. J Gen Virol, 1993. 74 ( Pt 8): p. 1599-609.
72. Wood, H.A., L.B. Johnston, and J.P. Burand, *Inhibition of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus replication in high-density Trichoplusia ni cell cultures*. Virology, 1982. 119(2): p. 245-54.
73. Yallop, C.A., et al., *Characterisation of G418-induced metabolic load in recombinant CHO and BHK cells: effect on the activity and expression of central metabolic enzymes*. Cytotechnology, 2003. 42(2): p. 87-99.

## Anexos

### I. Cálculo dos níveis de partição metabólica ao nível do Piruvato

De modo a analisar a partição que ocorre ao nível do “nó” do piruvato, foram considerados todos os fluxos intracelulares responsáveis pela sua formação e consumo calculados com o *software* FluxAnalyzer. Destas reacções, apenas as mais representativas em termos de contribuição global estão discriminadas :

|                          |                  |                                  |  |
|--------------------------|------------------|----------------------------------|--|
| <b>Fluxos de entrada</b> | <b>Glicólise</b> | Piruvato kinase (PK)             | $\frac{v_{PK}}{v_{PK} + v_{EM} + v_{outras}}$                  |
|                          | <b>Malato</b>    | Enzima málica (EM)               | $\frac{v_{EM}}{v_{PK} + v_{EM} + v_{outras}}$                  |
| <b>Fluxos de saída</b>   | <b>Lactato</b>   | Lactato desidrogenase (LDH)      | $\frac{v_{LDH}}{v_{LDH} + v_{AlaAT} + v_{PDH} + v_{outras}}$   |
|                          | <b>Alanina</b>   | Alanina aminotransferase (AlaAT) | $\frac{v_{AlaAT}}{v_{LDH} + v_{AlaAT} + v_{PDH} + v_{outras}}$ |
|                          | <b>ACoA</b>      | Piruvato desidrogenase (PDH)     | $\frac{v_{PDH}}{v_{LDH} + v_{AlaAT} + v_{PDH} + v_{outras}}$   |

### II. Reacções bioquímicas do metabolismo de células Sf9 de *S. frugiperda*.

As reacções que se seguem foram consideradas na análise dos fluxos metabólicos.

#### Difusão/Transporte Passivo

$$Glc_e = Glc$$

$$Lac = Lac_e$$

$$Malt_e = Malt$$

$$Sucr_e = Sucr$$

$$Pyr_e = Pyr$$

$$\alpha KG_e = \alpha KG$$

$$Amm = Amm_e$$

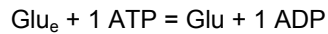
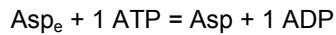
$$Ala = Ala_e$$

$$O_{2,e} = O_2$$

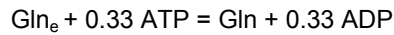
$$CO_2 = CO_{2,e}$$

#### Transporte Activo (dependente de ATP)

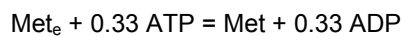
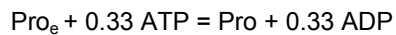
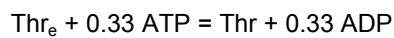
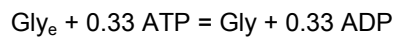
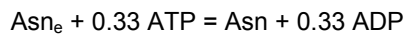
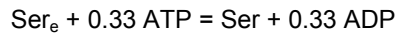
#### Sistema de transporte XAG:



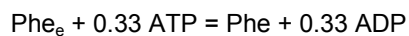
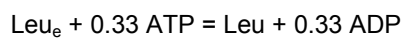
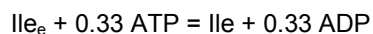
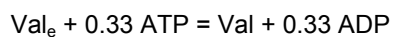
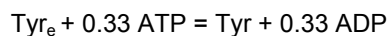
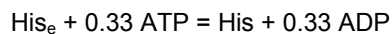
#### **Sistema de transporte A/L:**



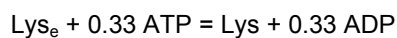
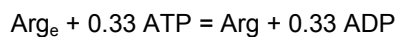
#### **Sistema de transporte A:**



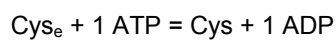
#### **Sistema de transporte L:**



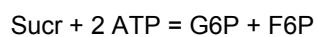
#### **Sistema de transporte y+L:**



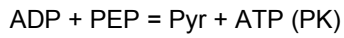
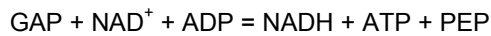
#### **Sistema de transporte X-C:**



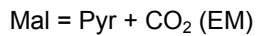
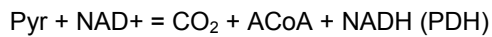
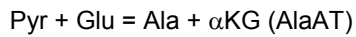
#### **Glicólise e Via dos Fosfatos de Pentose**



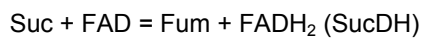
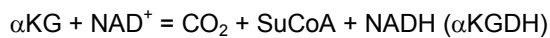
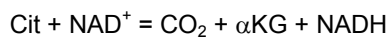




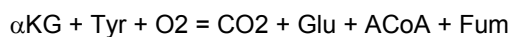
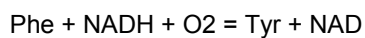
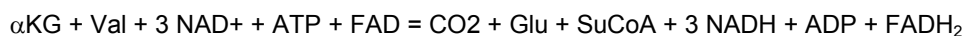
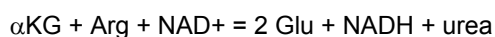
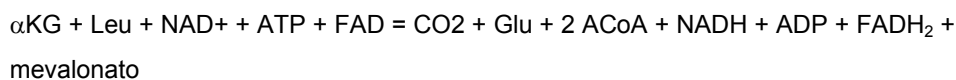
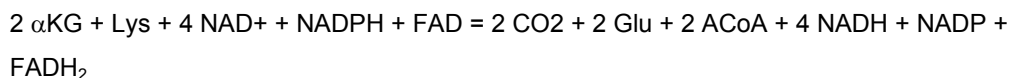
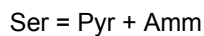
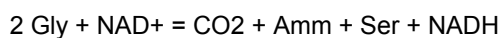
### **Nó do Piruvato**



### **Ciclo dos ATCs**



### **Metabolismo dos Aminoácidos**



Pro + NADP<sup>+</sup> + 0.5 O<sub>2</sub> = Glu + NADPH

Cys = Pyr + Amm

### **Produção de Energia (respiração e ciclos fúteis)**

NADH + 2.5 ADP + 0.5 O<sub>2</sub> = NAD<sup>+</sup> + 2.5 ATP

1.5 ADP + FADH<sub>2</sub> + 0.5 O<sub>2</sub> = 2.5 ATP + FAD

ATP = Energia

NAD<sup>+</sup> + NADPH = NADH + NADP<sup>+</sup> (transH)

### **Síntese de Biomassa**

1000 Proteína + 111 FA + 89.5 DNA + 224.7 RNA = Biomassa

### **Ácidos Nucleicos**

0.5 CO<sub>2</sub> + R5P + 1.9 Gln + 1.3 Ser + 1.3 Asp + 0.7 NAD<sup>+</sup> + NADPH + 9 ATP = 1.9 Glu + 0.8

Fum + 0.8 Gly + DNA + 0.7 NADH + NADP<sup>+</sup> + 9 ADP

CO<sub>2</sub> + R5P + 1.9 Gln + Ser + 1.3 Asp + NAD<sup>+</sup> + ATP = Glu + 0.8 Fum + 0.5 Gly + RNA + NADH + ADP

### **Síntese Proteica**

0.417 Ala + 0.251 Glu + 0.315 Gln + 0.432 Gly + 0.348 Ser + 0.344 Lys + 0.410 Leu + 0.213 Ile

+ 0.301 Arg + 0.238 Asp + 0.290 Thr + 0.305 Val + 0.109 Met + 0.162 Phe + 0.131 Tyr + 0.109

His + 0.266 Pro + 0.223 Asn + 0.142 Cys + 10.014 ATP = 1 Proteína + 10.014 ADP

### **Metabolismo Lipídico**

9 AcoA + 7 NADPH + 26 ATP + 10 NADH + 1 O<sub>2</sub> = 1 FA + 7 NADP<sup>+</sup> + 26 ADP + 10 NAD<sup>+</sup>