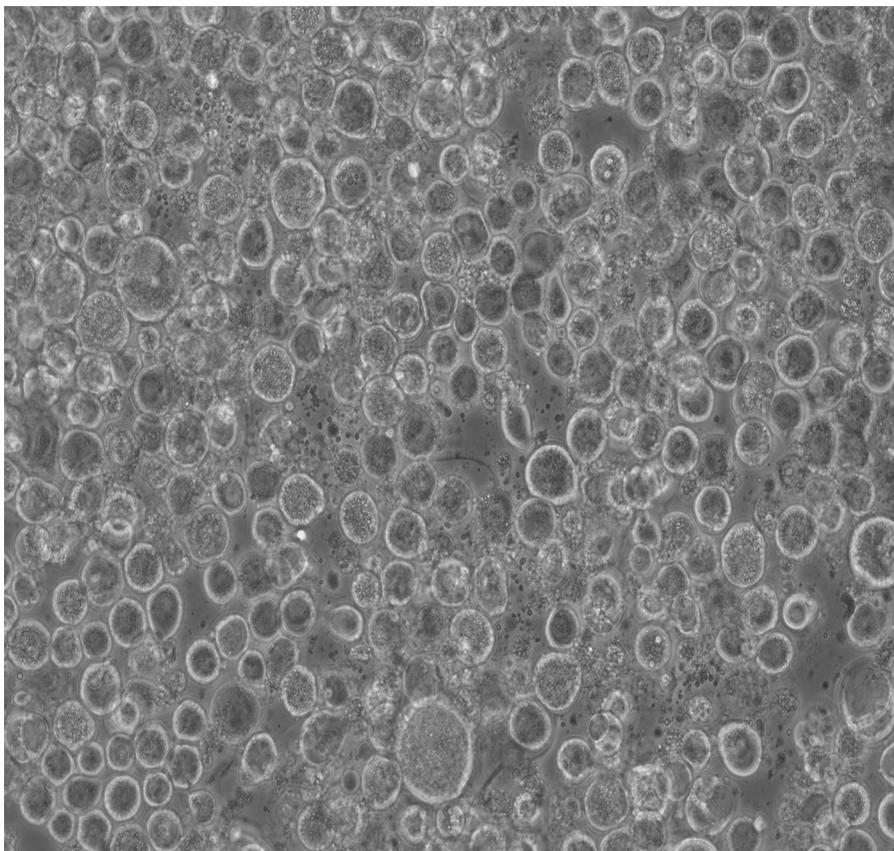


**Caracterização matemática da morte de células de inseto (IPLB-Sf21) em infecção suspensa com o baculovírus *Anticarsia gemmatalis* MNPV**

Foto: Laboratório de Virologia de Insetos - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*** 300

## **Caracterização matemática da morte de células de inseto (IPLB- Sf21) em infecção suspensa com o baculovírus *Anticarsia gemmatalis* MNPV**

Carlos Eduardo de Araújo Padilha  
Andréa Farias de Almeida  
Graciana Clécia Dantas  
Marlinda Lobo de Souza  
Márcia Regina da Silva Pedrini

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Endereço: Parque Estação Biológica – PqEB – Av. W5 Norte  
Caixa Postal 02372 – Brasília, DF – Brasil – CEP: 70770-917  
Fone: (61) 3448-4700 / Fax: (61) 3340-3624  
Home page: <http://www.cenargen.embrapa.br/>  
E-mail (sac): [sac@cenargen.embrapa.br](mailto:sac@cenargen.embrapa.br)

**Comitê Local de Publicações**

Presidente: João Batista Teixeira  
Secretário-Executivo: Thales Lima Rocha  
Membros: Jonny Everson Scherwinski Pereira  
Lucília Helena Marcelino  
Lígia Sardinha Fortes  
Márcio Martinelli Sanches  
Samuel Rezende Paiva  
Vânia Cristina Rennó Azevedo  
Suplentes: João Batista Tavares da Silva  
Daniela Aguiar de Souza Kols

Revisão de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães  
Normalização bibliográfica: Ana Flávia do N. Dias Côrtes  
Editoração eletrônica: José Cesamildo Cruz Magalhães

**1ª edição (*online*)**

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

---

Caracterização matemática da morte de células de inseto (IPLB-Sf21) em infecção suspensa com o baculovírus *Anticarsia gemmatilis* MNPV / Carlos Eduardo de Araújo Padilha... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2013.  
21 p.: il. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 300).

1. Caracterização matemática. 2. Baculovírus. 3. vAgEGTΔ-LacZ. 4. Morte celular. I. Padilha, Carlos Eduardo de Araújo. II. Almeida, Andréa farias de. III. Dantas, Graciana Clécia. IV. Souza, Marlinda Lobo de. V. Pedrini, Márcia Regina da Silva. VI. Série.

---

581 – CDD 21

© Embrapa 2013

# Sumário

|   |    |
|---|----|
| <b>Resumo</b> .....                     | 05 |
| <b>Abstract</b> .....                   | 07 |
| <b>Introdução</b> .....                 | 09 |
| <b>Material e Métodos</b> .....         | 10 |
| <b>Resultados e Discussão</b> .....     | 14 |
| <b>Conclusões</b> .....                 | 17 |
| <b>Referências Bibliográficas</b> ..... | 18 |

# Caracterização matemática da morte de células de inseto (IPLB-Sf21) em infecção suspensa com o baculovírus *Anticarsia gemmatalis* MNPV

---

*Carlos Eduardo de Araújo Padilha<sup>1</sup>*

*Andréa Farias de Almeida<sup>2</sup>*

*Graciana Clécia Dantas<sup>3</sup>*

*Marlinda Lobo de Souza<sup>4</sup>*

*Márcia Regina da Silva Pedrin<sup>5</sup>*

## Resumo

A utilização de baculovírus tem sido apontada como uma alternativa para substituir os inseticidas químicos na agricultura, além de se destacar como vetores de expressão na produção de proteínas heterólogas, principalmente por meio do cultivo de células de inseto. Entretanto, são escassos os dados disponíveis sobre a morte celular pós-infecção, os quais são essenciais para a modelagem de produção de corpos de oclusão (OB). A caracterização matemática deste fenômeno foi elaborada em trabalhos anteriores atrelando-se os efeitos da infecção, como a multiplicidade de infecção (MOI). Utilizou-se o modelo multihit, na região de morte rápida, o qual estabelece uma associação entre a viabilidade celular e o tempo de infecção por meio de uma relação linear. Neste trabalho, verificou-se o aumento da constante de morte celular ( $k$ ) com a elevação da MOI, mas não se observou uma correlação sobre o número de extrapolação ( $n$ ). Dos resultados, pode-se perceber que o processo de infecção e a taxa de morte celular mostram-se consistentes com a literatura, muito embora

os sistemas em suspensão estejam mais expostos aos vírus do que nos cultivos em monocamada.

Termos para indexação: caracterização matemática, baculovírus, vAgEGTΔ-LacZ, morte celular.

---

<sup>1</sup> Engenheiro Químico, Mestrando, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

<sup>2</sup> Engenheira Química, Professora doutora, Universidade Federal da Paraíba.

<sup>3</sup> Engenheira Química, Doutoranda, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

<sup>4</sup> Bióloga, Ph.D., Pesquisadora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Engenheira de Alimentos, Professora doutora, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

# Mathematical Characterization of Insect Cells Death in Suspension (IPLB-Sf21) Infected with *Anticarsia gemmatalis* MNPV

---

## Abstract

The use of baculovirus has been identified as an alternative to replace chemical insecticides in agriculture, furthermore its use stands out as expression vector for heterologous proteins production specially in infections in insect cell culture. However, limited data is available on cell death after infection, which is essential for modeling production of occlusion bodies (OB). The mathematical characterization of this phenomenon was made in previous studies, linking the infection effects with the multiplicity of infection (MOI). The multihit model was used in the rapid death phase, which establishes an association between cell viability and infection time by a linear relationship. In this work an increase of cell death constant ( $k$ ) was observed with the increasing MOI, but there was no significant correlation regarding the extrapolation number ( $n$ ). From the obtained results it can be observed that the infection process and the cell death rate is consistent with what the literature shows, although cell suspension systems are more

exposed to the virus than monolayer cultures.

Index terms: mathematical characterization, baculovirus, vAgEGTΔ-LacZ, cell death.

## Introdução

Atualmente, tem-se buscado a substituição dos inseticidas químicos em lavouras em virtude da sua menor agressividade em relação ao homem e ao meio ambiente. Nesse âmbito, o baculovírus se insere como uma possível alternativa, dada a sua especificidade e seu caráter atóxico. No campo de atuação do baculovírus, destaca-se a importante contribuição das células animais, principalmente as células de inseto, na produção de bioinseticida viral e na expressão de proteínas recombinantes (BEV).

A produção de baculovírus utilizados como bioinseticidas pode ser realizada em dois sistemas distintos: o cultivo *in vivo*, no qual os vírus são dispersos em lavouras, seguindo o ciclo natural do vírus (KING; POSSEE, 1992), e o cultivo *in vitro*, que é realizado com o vírus extracelular da hemolinfa de insetos infectados ou do sobrenadante das células infectadas por meio da liberação das partículas virais dos corpos de oclusão (OBs) produzidos (CHAN; GREENFIELD; REID, 1998). Destaca-se desta estratégia de produção um melhor controle sobre o sistema em relação à multiplicação *in vivo*, permitindo a condição de esterilidade e possibilitando a alta pureza do produto.

Alguns parâmetros interferem no crescimento celular, bem como na replicação dos baculovírus, dentre os quais estão: fatores físico-químicos, efeito passagem, linhagem de células e a multiplicidade de infecção (MOI), tendo este último se mostrado mais significativo em ensaios prévios (LICARI; BAILEY, 1991; LINDSAY; BETENBAUGH, 1992). A MOI refere-se à quantidade de inóculo viral utilizado para infectar uma cultura de células de inseto, a qual é expressa em unidades formadoras de placas adicionadas por célula (PFU/célula) (POWER, 1993).

A queda na viabilidade das células de inseto tem sido empregada como um indicativo da eficácia da infecção do baculovírus (HENSLER; AGATHOS, 1994). Após a infecção, as células param de crescer e

gradualmente morrem no decorrer do processo; entretanto, percebe-se um intervalo de tempo relativamente grande da infecção até o decréscimo da viabilidade celular.

Até recentemente, a morte celular durante a fermentação era caracterizada apenas por necrose, ocasionada por estresses que provocam graves danos à célula; entretanto, observou-se que isso não é verdade, pois as células podem morrer mediante um processo conhecido como apoptose. A apoptose, um tipo de morte programada de células comumente observada em vertebrados, foi verificada durante a infecção de baculovírus, de modo a prolongar a vida da célula (DALAL; BENTLEY, 1999; SINGH et al., 1994; CLEM et al., 1991). Após investigações do mutante viral, constatou-se que o gene p35 do baculovírus é responsável por prevenir a morte celular prematura de células *Spodoptera frugiperda*-21 (CLEM et al., 1991).

Com base nesses estudos, Wu et al. (1993, 1994) desenvolveram um modelo matemático que descreve a morte dinâmica de células hospedeiras em um cultivo em monocamada. A ideia central do modelo é a divisão do processo de morte em duas etapas: a fase lag, período no qual a viabilidade mantém-se constante, e a fase rápida, em que se observa uma queda acentuada na viabilidade das células. A aplicação deste modelo em outros sistemas de baculovírus permite acumular mais informações sobre os fatores que afetam a morte celular, o que é importante em uma futura elevação de escala.

Diante dos fatos, o presente trabalho tem como finalidade obter uma caracterização matemática do processo de infecção em células Sf21 utilizando-se as diferentes multiplicidades de infecção do baculovírus recombinante vAgEGTΔ-LacZ, associando a influência destas multiplicidades virais à viabilidade celular.

## Material e Métodos

### Vírus

O vírus recombinante vAgEGT $\Delta$ -LacZ, construído a partir do *Anticarsia gemmatalis* Multiple Nucleopolyhedrovirus, foi gentilmente cedido pelo Dr. Bergmann Morais Ribeiro, da Universidade de Brasília (UnB). O vírus vAgEGT $\Delta$ -LacZ apresenta deleção do gene viral EGT, que codifica a enzima ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (EGT), e adição do gene bacteriano LacZ, que codifica a enzima beta-galactosidase.

## Células de Inseto

A linhagem de célula utilizada foi a Sf21, cultivada em *shaker* (Tecnal – TE421), com agitação controlada de 120 rpm e 28°C, utilizando-se o meio de cultura Sf-900II® SFM (*Serum Free Medium*) (GIBCO).

## Meio de cultura para manutenção e crescimento celular

O meio de cultivo utilizado na manutenção das células e nos ensaios de infecção foi o Sf-900II® SFM (*Serum Free Medium*) (GIBCO), ao qual foi acrescentado 1% (v/v) de antibiótico (Antibiotic - Antimycotic) (*Invitrogen Corporation*) e preservado em geladeira a 4°C para utilização posterior.

## Determinação da concentração celular

A concentração de células viáveis e a viabilidade celular foram determinadas por contagem, com o emprego da técnica de exclusão, pela coloração com azul de Tripán (Sigma-Aldrich) a uma concentração final de 0,1% (v/v). Todas as contagens foram realizadas diariamente com a utilização de um microscópio fase-contraste (Olympus, Japão) e um hemocítômetro modelo Neubauer (*Bright-Line Hemacytometer Sigma*). Por este método, é possível obter um desvio de 15%, com aproximadamente 200 células contadas em ambos os lados do hemocítômetro (NIELSEN et al., 1991).

As células que se tornaram azuladas devido à entrada do corante foram consideradas não viáveis, enquanto que as células transparentes foram

consideradas viáveis. A concentração celular é expressa em células por mL (células/mL). A viabilidade foi definida como a relação entre a quantidade total de células viáveis e não viáveis (KING; POSSEE, 1992).

## Titulação viral

Para este estudo de caracterização, as células Sf21, cultivadas em Sf-900II® SFM (GIBCO), foram infectadas com o vírus extracelular (BV) do vAgEGTΔ-LacZ. Este BV foi coletado da infecção em células TN5B1-4 com 5 dias de experimento e, posteriormente, utilizado como inóculo para as infecções. As condições de cultivo utilizadas para as infecções foram 28°C, 120 rpm e suspensão de células de 50 mL em frascos *Erlenmeyers* de 125 mL e com tempo de infecção (TOI) correspondente a  $5,0 \times 10^6$  células viáveis/mL. A titulação viral para determinação da MOI seguiu a metodologia proposta por Mena et al. (2003).

## Modelo matemático

O modelo de inativação por irradiação desenvolvido por Alper et al. (1960) e Atwood & Norman (1949) foi adaptado para a infecção de células de inseto por Wu et al. (1993). A teoria propõe que a probabilidade de inativação segue a distribuição de Poisson, de modo que a probabilidade de uma célula com  $n$  sítios de inativação seja atingida é descrita por:

$$P = (1 - e^{-kt})^n \quad (1)$$

onde  $k$  é a taxa de morte celular. A fração de células viáveis ( $V$ ) da população é, portanto, dada por:

$$V = 1 - (1 - e^{-kt})^n = 1 - \sum_{i=0}^n \frac{n!}{i!(n-i)!} (-1)^i e^{-ikt} \quad (2)$$

A expansão da série revela que, em valores elevados de tempo ( $t$ ), apenas a contribuição do primeiro termo é significativa, podendo a equação ser simplificada a:

$$\ln(V) = \ln(n) - kt. \quad (3)$$

Da curva de fração viável podem ser identificadas duas regiões distintas, como foi observado em Wu et al. (1993, 1994). A primeira tem valor constante caracterizado pelo tempo de atraso ( $t_d$ ). A segunda fase é a de morte rápida, sendo o coeficiente angular a taxa de morte celular ( $k$ ), resultado da infecção pelo baculovírus, como pode ser visto na Figura 1. A meia-vida ( $t_{1/2}$ ) para a cultura pode ser estimada pelo intervalo de tempo necessário para a viabilidade celular reduzir-se para 50%.

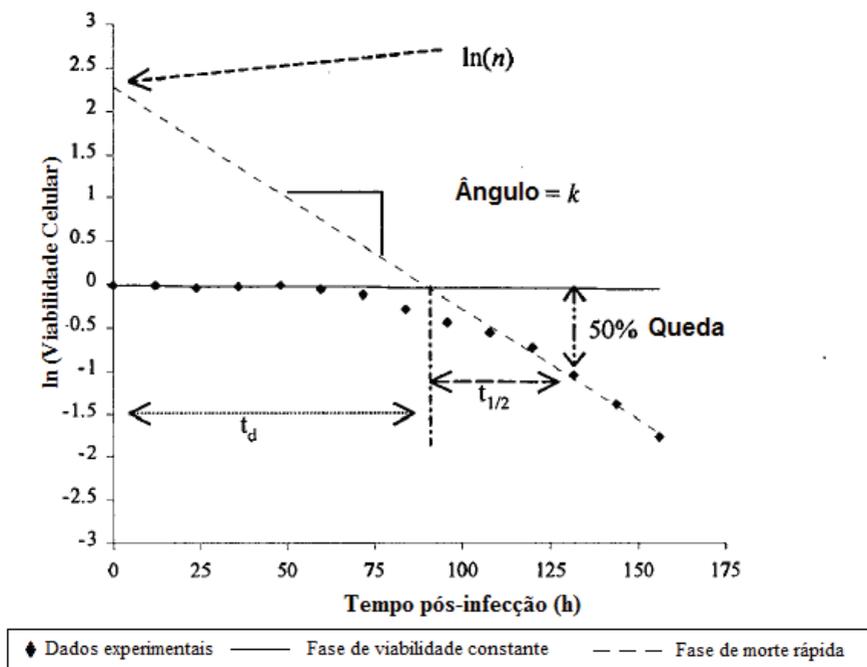


Figura 1. Gráfico da viabilidade celular durante a infecção, definindo os parâmetros do modelo de morte celular. Fonte: Dalal & Bentley (1999).

Os parâmetros do modelo de inativação, a taxa de morte celular ( $k$ ) e o número de extrapolação ( $n$ ) são calculados segundo as equações abaixo:

$$k = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} \quad (4)$$

$$\ln(n) = \frac{t_d}{t_{1/2}} \ln 2 \quad (5)$$

## Resultados e Discussão

A partir da leitura de microplacas no espectrofotômetro, pode-se dispor as informações obtidas em um gráfico sigmoide (Figura 2), sendo este organizado com base nas diluições virais do baculovírus vAgEGTΔ-LacZ.

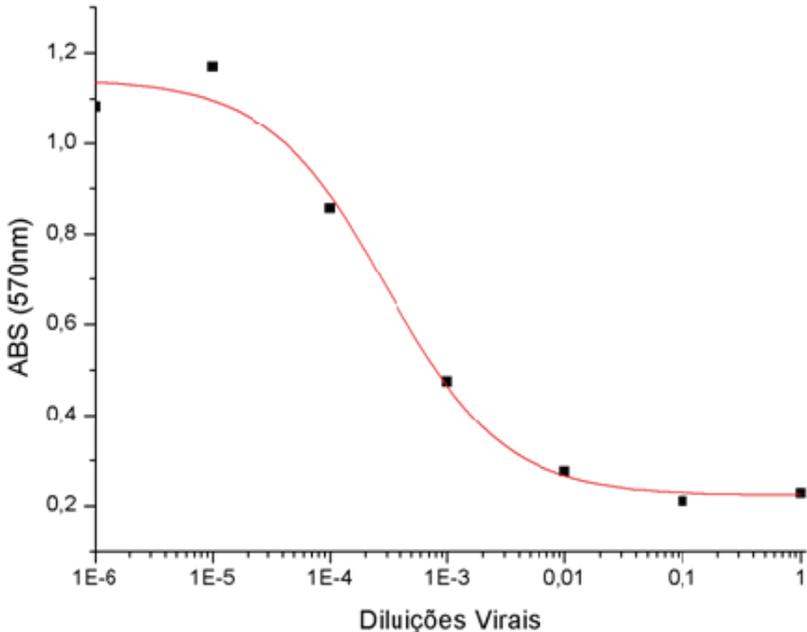


Figura 2. Gráfico sigmoide obtido da titulação viral.

O ajuste da sigmoide aos dados forneceu o termo  $D_0$ , que indica a diluição na qual a resposta de infecção foi 50%, fundamental no cálculo do  $TCLD_{50}$ . Destarte, para a infecção 1% v/v de  $5 \times 10^6$  células viáveis (TOI) em suspensão de 100 mL, obteve-se o parâmetro  $TCLD_{50}$  igual a  $3,33 \times 10^5$ , resultando na MOI de 66,67. Dados estes valores, foi possível realizar diluições sobre os inóculos e, por sua vez, distribuir as infecções em faixas de MOI diferentes, ou seja, 1,25; 2,5; 5,0; 12,5 e 25,0.

A análise sobre as curvas cinéticas revela que a fase de viabilidade constante ( $t_d$ ) reduz-se com o aumento da MOI, mas dispõe-se em patamares de 92 h para as MOI menores (2,5; 5,0) e 75 h para valores elevados de multiplicidade (12,5; 25). A distribuição deste parâmetro em níveis é vista também em Wu et al. (1993), em que  $t_d$  é fixo em 106,7 h para baixas MOI. Para o caso específico da infecção com MOI 0,5, a quantidade de inóculo viral é insuficiente para infectar todas as células. Dessa forma, a viabilidade decai mais rapidamente do que nos outros casos, já que alguns organismos têm seu metabolismo colapsado, como pode ser visto na Tabela 1.

**Tabela 1.** Influência da MOI sobre os parâmetros do modelo.

| MOI  | Tempo de atraso<br>$t_d$ (h) | Tempo de meia vida<br>$t_{1/2}$ (h) | Número de extrapolação<br>(n) | Constante de morte celular<br>$k$ ( $h^{-1}$ ) |
|------|------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--|
| 1,25 | 66,12                        | 120,41                              | $1,18 \pm 0,32$               | $-0,0025 \pm 0,0005$                           |
| 2,5  | 93,03                        | 29,23                               | $2,61 \pm 0,73$               | $-0,0103 \pm 0,0012$                           |
| 5,0  | 92,36                        | 9,62                                | $18,01 \pm 2,35$              | $-0,0313 \pm 0,0067$                           |
| 12,5 | 76,86                        | 10,01                               | $10,06 \pm 1,43$              | $-0,0301 \pm 0,0041$                           |
| 25   | 74,15                        | 8,11                                | $15,66 \pm 1,98$              | $-0,0371 \pm 0,0052$                           |

O número de extrapolação,  $\ln(n)$ , que pode ser considerado como medida de sítios de infecção, é tido como constante para o desenvolvimento do modelo. Contudo, percebe-se que este termo oscila modificando o valor multiplicidade, em contraste ao observado

em Dee & Shuler (1997) e em Dalal & Bentley (1999). A expectativa para este parâmetro seria a redução gradual com o crescimento da MOI, pelo esgotamento dos sítios por uma atividade infecciosa mais intensa.

Observa-se na Figura 3 que a inclinação da fase de morte rápida (*rapid death phase*) torna-se mais íngreme com o aumento da MOI. Este fato se explica pela ação de lise, dada a rápida ação viral que compromete a quantidade de células e, conseqüentemente, a produção do bioinseticida viral em períodos mais longos. Em contrapartida, para os sistemas submersos com Sf9 vistos nos trabalhos de Wu et al. (1993) e Dalal & Bentley (1999), a relação da constante de morte celular e da MOI é inversa. Apesar da diferença entre as tendências, o valor da constante obtida no trabalho para a MOI 25,0 ( $-0,0371 \pm 0,0052 \text{ h}^{-1}$ ) é similar ao obtido em Dalal & Bentley (1999) para a MOI 20,0 ( $-0,035 \pm 0.005 \text{ h}^{-1}$ ).

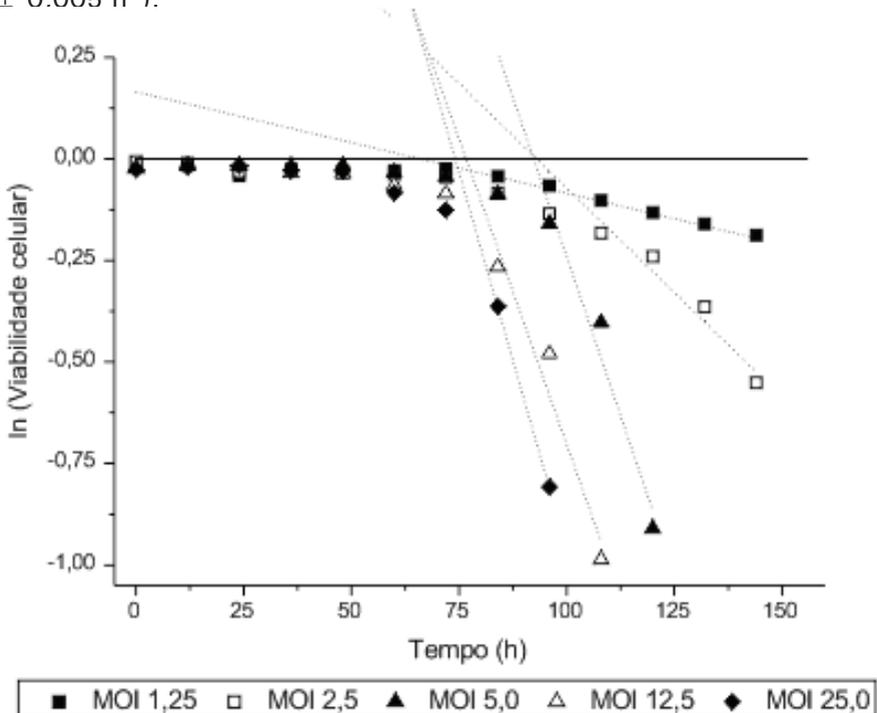


Figura 3. Efeito da multiplicidade de infecção (MOI) na fração de células viáveis.

## **Conclusões**

Os dados obtidos de tempo de atraso e tempo de meia-vida em função do MOI mostraram-se consistentes com a literatura, muito embora no cultivo em suspensão as células estejam mais expostas aos vírus do que nos cultivos em monocamada. Os resultados ratificam o uso de MOI com valor intermediário (2,5 e 5,0) na infecção de células Sf21, já que permite uma infecção controlada sem comprometimento rápido da viabilidade celular, indicados pelos valores acentuados de tempo de atraso 93,03 h e 92,36 h, respectivamente.

## Referências Bibliográficas

ALMEIDA, A. F. **Estratégias de produção in vitro de bioinseticida viral: influência do isolado, da cinética e do modo de operação.** 2010. 133 f. (Tese de Doutorado). Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, Brasil.

ALPER, T.; GILLIES, N.; ELKIND, M. M. The sigmoid survival curve in radiobiology. **Nature**, v. 186, p. 1062-1063, 1960.

ATWOOD, K. C.; NORMAN, A. On the interpretation of multihit survival curves. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 35, p. 696-709, 1949.

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

CLEM, R. J., FECHHEIMER, M., MILLER, L. K. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. **Science**, v. 254, 1388-1390, 1991.

DALAL, N. G.; BENTLEY, W. E. Mathematical characterization of insect cell (Sf-9) death in suspended culture. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 325-329, 1999.

DEE, K. U.; SHULER, M. L. A mathematical model of trafficking of acid-dependent enveloped viruses: application to the binding, uptake, and nuclear accumulation of baculovirus. **Biotechnology and Bioengineering**, p. 54, p. 468-490, 1997.

HENSLER, W. T.; AGATHOS, S. N. Evaluation of monitoring approaches and effects of culture conditions on recombinant protein production in baculovirus-insect cells. **Cytotechnology**, v. 15, p. 177-186, 1994.

KING, L. A.; POSSEE, R. D. **The baculovirus expression system: a laboratory guide**. London; New York: Chapman & Hall, p. 14, 229 p. 1992.

LICARI, P.; BAILEY, J. E. Factors influencing recombinant protein yields in an insect cell-baculovirus expression system: multiplicity of infection and intracellular protein degradation, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, p. 238-246, 1991.

LINDSAY, D. A.; BETENBAUGH, M. J. Quantification of cell culture factors affecting recombinant protein yields in baculovirus-infected insect cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, p. 798-804, 1992.

MENA, J. A.; RAMÍREZ, O. T.; PALOMARES, L. A. Titration of non-occluded baculovirus using a cell viability assay. **Biotechniques**, v. 34, p. 260-264, 2003.

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

POWER, J. F. **Modelling and Optimisation of the Baculovirus Expression Vector System in Suspension Culture**. 1993. 303 f. (Tese de Doutorado). Departamento de Engenharia Química, University of

Queensland, Queensland-Australia.

SINGH, R. P.; AL-RUBENI, M.; GREGORY, C. D.; EMERY, A. N. Cell death in bioreactors: a role for apoptosis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 720-726, 1994.

WU, S. C.; DALE, B. E.; LIAO, J. C. Kinetic characterization of baculovirus-induced cell death insect cell cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, p. 104-110, 1993.

WU, S. C.; JARVIS, D. L.; DALE, B. E.; LIAO, J. C. Heterologous protein expression affect cell death kinetics of baculovirus-infected cell cultures: a quantitative study by use of n-target theory. **Biotechnology Progress**, v. 10, p. 55-59, 1994.



---

***Recursos Genéticos e  
Biotecnologia***