



X Congresso Brasileiro de Engenharia Química Iniciação Científica

“Influência da pesquisa em Engenharia Química no desenvolvimento tecnológico e industrial brasileiro”

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Universidade Severino Sombra
Vassouras – RJ – Brasil

ACOMPANHAMENTO DE MUDANÇAS MORFOLÓGICAS EM CULTIVOS DE *ESCHERICHIA COLI* RECOMBINANTE POR ANÁLISE DE IMAGENS UTILIZANDO RECURSOS COMPUTACIONAIS

ANDRADE^{*1}, J.V.L.; CARRA¹, M.A.S.; SILVA², G.G.; CAMPANI², G.; ZANGIROLAMI³, T.C.

¹Aluno do DEQ/UFSCar ²Mestrando do PPG-DEQ/UFSCar ³Professor da DEQ/UFSCar
Departamento de Engenharia Química - Universidade Federal de São Carlos
Endereço – UFSCar, SP 310, km 235, São Carlos, CEP. 13.565-905, SP,
email: teresacz@ufscar.br

RESUMO - Cultivos de alta densidade de *Escherichia coli* geneticamente modificada (rE. coli) vêm sendo amplamente utilizados para a obtenção de proteínas terapêuticas e enzimas. O estresse associado à síntese da proteína recombinante afeta a fisiologia e a morfologia das células, impactando na produtividade em biomassa e produto de interesse. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi desenvolver uma metodologia para avaliar as características morfológicas das células rE. coli expressando fragmento de Proteína Antigênica de Superfície de Pneumococo (PspA). Amostras coletadas durante cultivos em biorreator foram transferidas para lâminas, coradas com reagentes Gram e posteriormente analisadas em microscópio ótico acoplado a sistema de aquisição de imagens. As imagens adquiridas foram binarizadas utilizando o programa ImageJ[®] e tratadas por rotina desenvolvida em MATLAB[®] para estimativa de comprimento e diâmetro das células. Os resultados mostraram que tanto a média dos diâmetros (1,50 µm) quanto dos desvios-padrão (0,53 µm) manteve-se praticamente constante independentemente do tempo de cultivo. Quanto ao comprimento, observou-se uma tendência de diminuição desta dimensão com o aumento da concentração celular de 23 para 97 g de massa seca/L. As alterações observadas na morfologia são coerentes com as relatadas na literatura, que descreve a ocorrência de células menos alongadas com o aumento da concentração celular.

Palavras chave: proteína heteróloga, morfologia celular, organismo geneticamente modificado.

INTRODUÇÃO

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa, largamente utilizada na produção de proteínas heterólogas por possuir genoma bem conhecido (LEE *et al.*, 2001) e, protocolos de cultivo em alta densidade com substratos baratos (KYLE *et al.*, 2012). Fatores como composição

do meio de cultivo, temperatura, indutor empregado e concentração celular podem influenciar a produção da proteína de interesse.

O indutor isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), um análogo da lactose, é normalmente usado em laboratório. Porém, se por um lado ele apresenta efetividade na indução, não sendo consumido durante o

*Bolsista do Programa Jovens Talentos para Ciência (CAPES)

processo (SHOJAOSADATI *et al.*, 2008), por outro lado o IPTG apresenta duas desvantagens: é caro e tóxico (ZHANG *et al.*, 2009), o que pode intensificar o estresse associado à produção da proteína heteróloga. A alternativa ao IPTG é a própria lactose, já que ela apresenta baixo custo, não é tóxica às células (SHOJAOSADATI *et al.*, 2008) e funciona como fonte de carbono (LEE *et al.*, 2001). Por sua vez, apresenta a desvantagem de depender da presença da permease na superfície das bactérias (LEE *et al.*, 2001), de ser pouco solúvel, e de ser consumida durante o cultivo (ZHANG *et al.*, 2009).

Além do tipo de indutor, o modo como o mesmo é fornecido e assimilado (por pulso ou gradativamente), a composição do meio de cultivo e as condições de cultivo (principalmente a temperatura) são também determinantes do nível de estresse causado pela síntese da proteína heteróloga (SANTOS, 2012). Em relação à influência da temperatura, a modulação da velocidade de crescimento e das reações intracelulares também pode afetar a síntese da proteína recombinante. Se a temperatura for baixa, a indução pode se tornar ineficiente. Se a temperatura for alta, a indução é intensificada, elevando o estresse metabólico e causando perda de plasmídeo e baixa produtividade.

A exposição às condições estressantes pode afetar as células de várias maneiras, levando a alterações no metabolismo assim como nas características fisiológicas e morfológicas (KOOLAE *et al.*, 2006). Da mesma forma, durante a fase de indução, além das condições de estresse já mencionadas, o principal fator de estresse é a própria síntese da proteína recombinante, que pode inclusive ser tóxica para a célula e provocar mudanças morfológicas (KYLE *et al.*, 2012).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma metodologia de análise da morfologia de *rE. coli* por meio da determinação de medidas de comprimento e diâmetro das células sob diferentes condições de cultivos, e avaliar possíveis relações entre a diferenciação celular e outras propriedades do cultivo (concentração celular, tempo de cultivo, estratégia de indução etc).

METODOLOGIA

Cultivos

As características morfológicas de *rE. coli* foram determinadas a partir dos dados ob-

tidos em dois cultivos, cujas principais características estão descritas na Tabela 1. Ambos os cultivos foram realizados em reator de bancada tipo tanque agitado com 5 L de volume total, equipado com sensores de oxigênio dissolvido e pH. O sistema experimental está detalhadamente descrito em Horta (2011). O Cultivo 1 foi realizado em meio definido (HORTA, 2011), contendo lactose como indutor e glicerol como fonte de carbono. Já o Cultivo 2 foi realizado em meio complexo (SANTOS, 2012), tendo IPTG como indutor e glicose e glicerol como fontes de carbono.

Tabela 1 – Informações do cultivo 1 e 2

	Cultivo 1	Cultivo 2
<i>E. coli</i>	BL21(DE3)	M15
Proteína	PspA4Pro	PspA94 – PdT
Meio	Definido	Complexo
Indutor	Lactose	IPTG
Temperatura	37°C/30°C	31°C

Obtenção de imagens em microscópio ótico

Durante os cultivos, amostras de 10µL foram retiradas para confecção de lâminas pelo método de Gram (KYLE *et al.*, 2012). As células foram fixadas com calor e tratadas com uma solução de cristal violeta por 1 minuto, lavada em seguida. Aplicou-se, então, solução de Lugol por 30 segundos, sendo novamente lavada. Foi usado álcool etílico absoluto durante 5 segundos para descoloração e água destilada para enxágue. Por fim, as células foram coradas com fucsina durante 30 segundos antes da última lavagem com água destilada. Lâminas preparadas foram posteriormente visualizadas em microscópio ótico de bancada acoplado a câmara digital e computador para aquisição das imagens.

Análise de Imagens

Aproximadamente 100 imagens digitais dos cultivos realizados foram geradas e armazenadas.

A análise dessas imagens foi desenvolvida basicamente em duas etapas: a binarização e o tratamento por rotina. A primeira etapa é realizada pelo programa ImageJ®, o qual transforma uma imagem colorida em escala preto e branco. Posteriormente, utilizou-se uma rotina desenvolvida para o software MATLAB®, por meio da qual as informações sobre comprimento e diâmetro foram obtidas. Essa rotina transforma

uma imagem digital numa matriz binária, identificando individualmente as células contidas na imagem, e calculando suas dimensões.

Todos esses dados foram transferidos para uma planilha de cálculo para realização de tratamento estatístico. A análise estatística consistiu na determinação da média e desvio-padrão das propriedades avaliadas (comprimento e diâmetro) e na construção de histogramas.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Cultivo 1

O Cultivo 1 foi considerado de alta densidade, já que a concentração celular atingiu valores superiores a 100g/L (HORTA, 2011). Como descrito na Tabela 1, esse cultivo teve lacto-

se como indutor e meio definido. A indução com o pulso de lactose (20g/L) ocorreu com 15h de cultivo (HORTA, 2011). Dessa forma, foi possível observar a influência do aumento da concentração sobre o comprimento e o diâmetro ao longo do cultivo (Figuras 1 e 2).

A partir da Figura 2, observa-se que ambas as medidas diminuíram com o aumento da concentração celular: de 3,5 μ m a 2,9 μ m, chegando a 2,6 μ m (comprimento); de 1,8 μ m a 1,5 μ m, chegando a 1,4 μ m (diâmetro). Além disso, pôde-se notar que a diminuição foi mais acentuada para o comprimento. Esses resultados sugerem que as células se tornam mais redondas com o aumento da concentração, o que está de acordo com observações relatadas na literatura (KOOLAE *et al.*, 2006). Dados complemen-

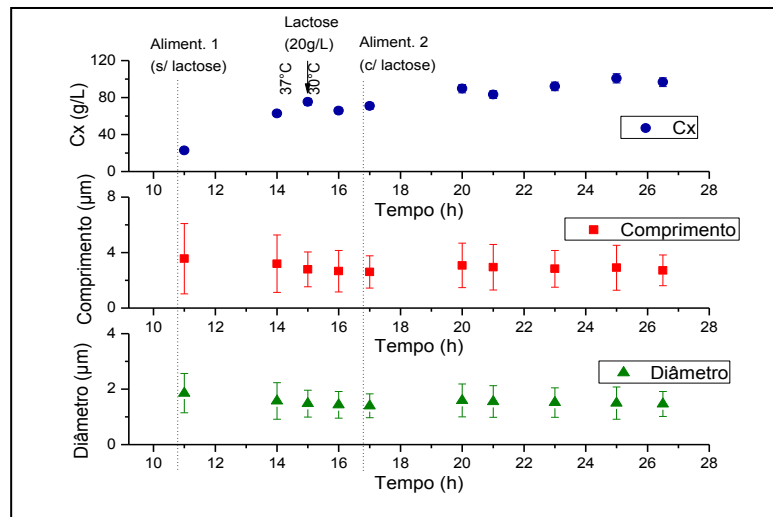


Figura 1 – Concentração celular (Cx) e valores médios do comprimento e do diâmetro em função do tempo de cultivo. Desvio padrão representado por barras. Imagens coletadas durante o Cultivo 1

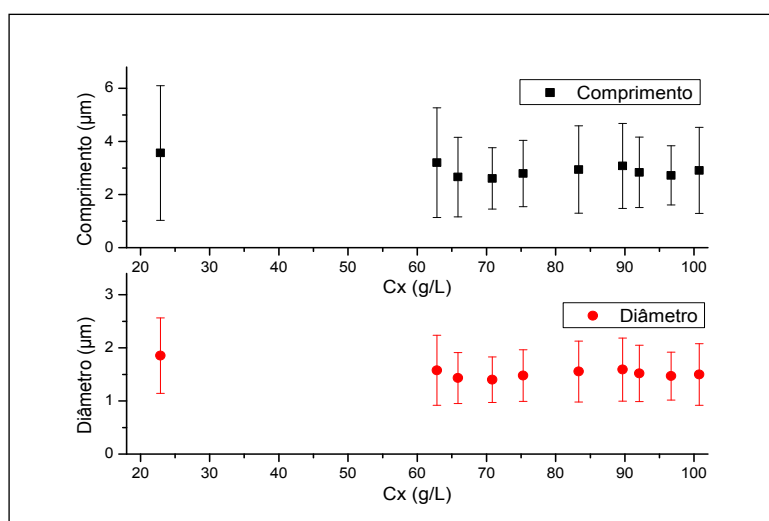


Figura 2 – Valores médios de comprimento e diâmetro em função da concentração celular (Cx), referentes ao Cultivo 1

tares para concentrações entre 25 e 60 g/L (não disponíveis) seriam importantes para confirmar a tendência de diminuição do comprimento das células devido ao aumento da concentração. Nota-se ainda na Figura 2 uma tendência de aumento do comprimento com a concentração para valores de concentração celular entre 60 e 90 g/L. Esse fato pode estar relacionado com a adição do indutor lactose, a qual foi realizada quando o cultivo alcançou ~ 60 g/L (Figura 1). A partir da adição do indutor, o metabolismo celular é dire-

cionado à produção da proteína de interesse e isso pode se refletir na morfologia celular (Figura 3).

A produção da proteína final foi de 13,2 mg PspA/g cél, em 11,5h de indução (26,5h de cultivo). A produção máxima foi de 17,0 mg PspA/g cél em 10h de indução (25h de cultivo). Devido à baixa produção, não foi possível analisar a influência do acúmulo de proteína sobre a morfologia.

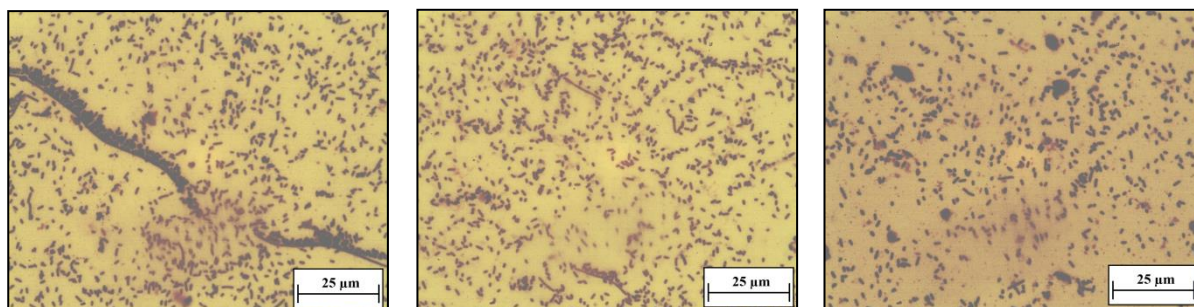


Figura 3 – Imagens do Cultivo 1 obtidas por microscópio ótico em 15 (esquerda), em 20 (central) e 26,5 (direita) de cultura

Os dados obtidos para o comprimento ao longo do Cultivo 1 foram utilizados para construção de histogramas (Figura 4). Apresentando uma tendência gaussiana, os histogramas mostraram que houve uma diminuição do desvio-padrão associado às medidas do comprimento de 2,5 μ m para 1,1 μ m (estimado a partir dos dados correspondentes a 68% da curva) com o aumento da concentração. Porém, o desvio-padrão associado às medidas de diâmetro manteve-se praticamente constante. Esse desvio-padrão está relacionado com a dispersão da população de bactérias e sua homogeneidade. Portanto, conclui-se que, com o aumento da concentração celular, a população se torna mais homogênea ao longo do cultivo.

Cultivo 2

No Cultivo 2 foi atingida uma concentração celular máxima de 40 g/L, sendo ele portanto de média densidade (Figura 5). Esse cultivo foi realizado em meio complexo, cuja composição é diferente da do meio utilizado no Cultivo 1. Além disso, a linhagem de *E. coli* cultivada é diferente, assim como a proteína heteróloga produzida. Outra diferença foi a estratégia de indução usada no Cultivo 2. Foram feitos 4 pulsos de IPTG (0,5mM) a cada 2h, a partir de 15h de cultivo (Figura 5). Porém, os resultados da análise da morfologia foram semelhantes

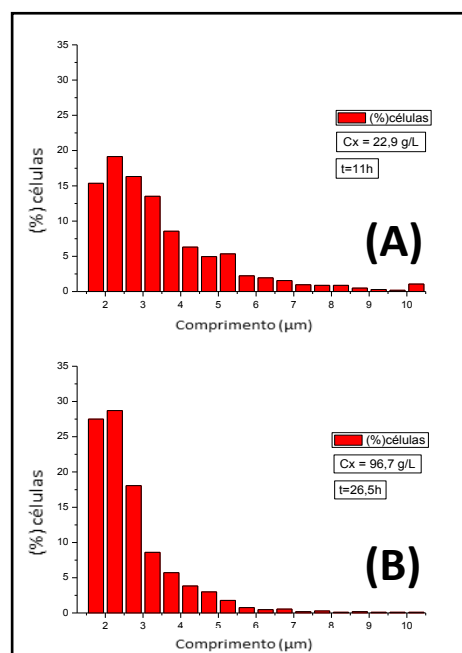


Figura 4 – Histogramas referentes ao comprimento das bactérias do Cultivo 1: (A) em 11h; (B) em 26,5h

aos do Cultivo 1. A Figura 5 mostra as mudanças da concentração celular, do comprimento e do diâmetro em função do tempo para o Cultivo 2.

Já a Figura 6 mostra, de maneira mais clara, a relação entre as dimensões da bactéria e o crescimento celular. Semelhantemente ao Cultivo 1, observou-se que tanto o diâmetro mé-

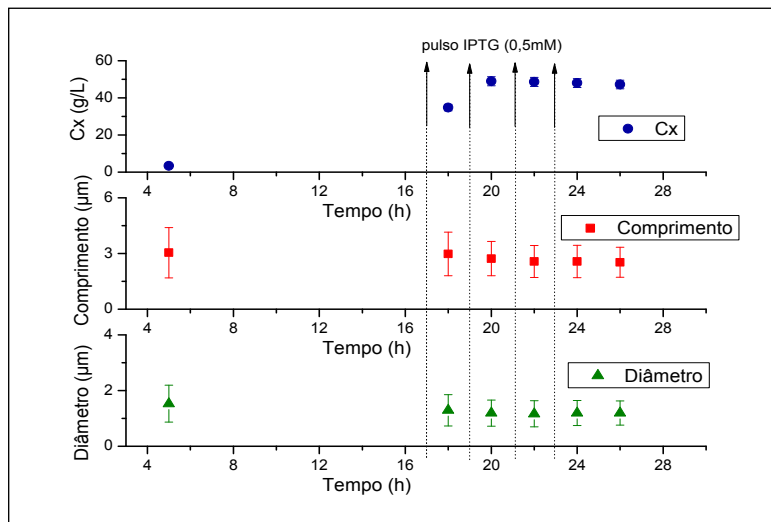


Figura 5 – Concentração celular (Cx) e valores médios correspondentes para comprimento e diâmetro em função do tempo de cultivo. Desvio padrão representado por barras. Imagens coletadas durante o Cultivo 2

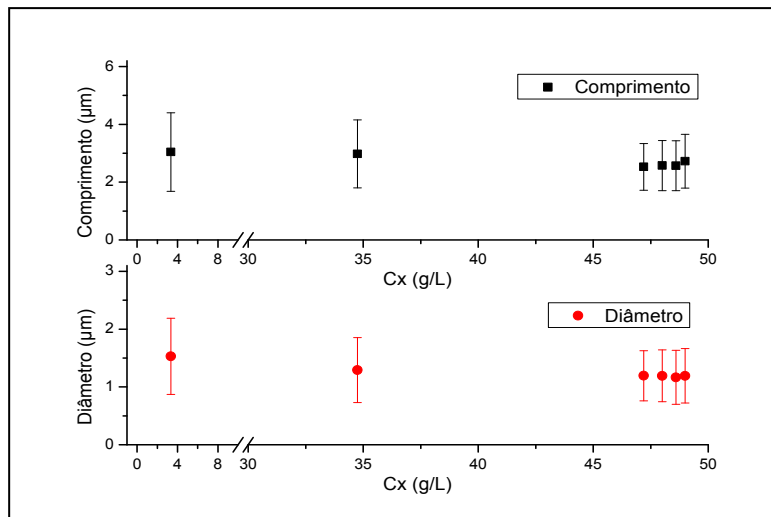


Figura 6 – Variação do comprimento e do diâmetro em função da concentração celular (Cx). Dados obtidos no Cultivo 2

do como o comprimento médio diminuíram com o aumento da concentração no Cultivo 2. A Figura 6 ainda sugere que o comprimento médio tem uma tendência de aumento para a faixa de concentração entre 45 e 50 g/L, o que pode estar relacionado à adição do indutor (Figura 3), que dispara a mudança do metabolismo no sentido de produzir a proteína de interesse. Esse mesmo comportamento foi observado no Cultivo 1 (Figura 2).

Em relação à homogeneidade da população inferida a partir do comportamento do desvio-padrão, os histogramas gerados a partir da análise das imagens obtidas ao longo do Cultivo 2, representados na Figura 7, indicam que o desvio-padrão do diâmetro manteve-se praticamente constante, porém, houve uma diminuição de 1,4μm a 0,8μm desse mesmo parâmetro em relação ao comprimento com o aumen-

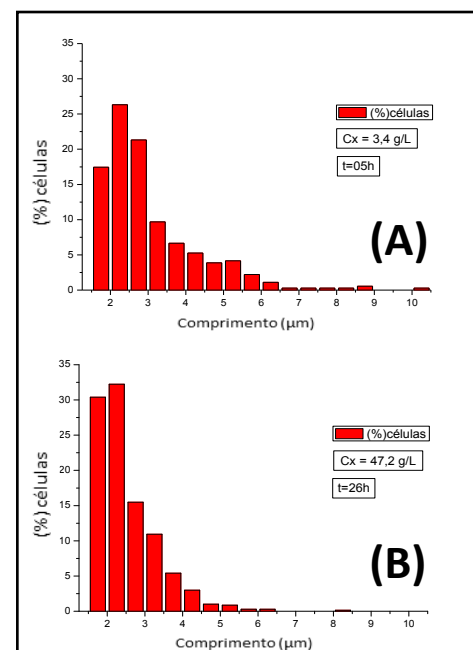


Figura 7 – Histogramas referentes ao comprimento das bactérias do Cultivo 2: (A) em 5h; (B) em 26h.

to da concentração. Dessa forma, foi confirmado as observações relatadas para o Cultivo 1, as quais reforçam que existe uma relação entre o comprimento das bactérias e a concentração celular do cultivo analisado.

No Cultivo 2, a produção da PspA94 – PdT foi muito baixa e não foi quantificada. Por isso, também não possível avaliar a influência do acúmulo de proteína sobre as mudanças morfológicas da *rE. coli*.

CONCLUSÃO

A aplicação de cultivos de alta densidade de *Escherichia coli* para produção de proteínas heterólogas vem crescendo com o desenvolvimento da biotecnologia. Por isso, o aprimoramento e a otimização desse processo é crucial não só a formação de biomassa, mas também para maximizar a síntese das proteínas de interesse.

Nesse contexto, o acompanhamento das mudanças morfológicas da bactéria se apresenta como uma ferramenta promissora para inferência do estado fisiológico da célula durante a realização do cultivo, viabilizando os ajustes na estratégia de cultivo que preservem a produção da proteína de interesse. No presente trabalho foi desenvolvida uma metodologia para aquisição e tratamento de imagens utilizando os programas ImageJ®, MATLAB® e Excel®. Mais de 100 imagens geradas a partir de dois cultivos foram processadas de acordo com a metodologia desenvolvida, permitindo a caracterização da morfologia das células.

Os resultados mostraram, em ambos os cultivos, a tendência da *rE. coli* em diminuir seu tamanho e alterar a morfologia, de bastonete a esférica, com o aumento da concentração celular e com o decorrer do tempo de cultivo. Desse modo, pôde-se constatar a influência do aumento da concentração celular sobre a morfologia. Além disso, a população de bactérias foi se tornando mais homogênea.

Efeito de fatores como indutor, temperatura e meio de cultivo sobre a morfologia não foram avaliados devido ao número reduzido de imagens disponíveis. Da mesma forma, a presença de células filamentosas foi verificada apenas no início dos cultivos. Essa alteração morfológica pode estar associada ao estresse causado pela produção da proteína recombinante. Devido a baixa produção de proteína nos cultivos 1 e 2, novos estudos estão em andamento para avaliação da influência da produção de proteína sobre a morfologia.

REFERÊNCIAS

- HORTA, A. C. L. Sistema automático de supervisão e controle de cultivos de alta densidade celular de *E. coli* recombinante. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de São Carlos, 2011.
- KOOLAE, S. M. V., SHOJAOSADATI, S. A., BABAEIPOUR, V., GHAEEMI, N., “Physiological and morphological changes of recombinant *E. coli* during over-expression of human interferon- γ in HCD.” Iranian Journal of Biotechnology. v 4 (4). Outubro de 2006.
- KYLE, S., JAMES, K. A. R., MCPHERSON, M. J., Recombinant production of the therapeutic peptide lunasin. Microbial Cell Factories, 2012.
- LEE, J.; SARASWAT, V.; KOH, I.; SONG, K. B.; PARK, Y. H.; RHEE, S. K. Secretory production of Arthro bacter levan fructotransferase from recombinant *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letters. v.195. p.127-132. 2001.
- SANTOS, M. P. Avaliação de temperatura de indução e de fontes de nitrogênio na produção de proteína de superfície de *S. pneumoniae* em *E. coli* recombinante. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – PPG-EQ/UFSCar, 2012.
- SHOJAOSADATI, S. A.; KOLAEIL, S. M. V.; BABAEIPOUR, V.; FARNOUD, A. M. “Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein.” Iranian Journal of Biotechnology, v. 6, No. 2, p.3-84, 2008.
- ZHANG, H. ZHENG, Y. LIU, Q.; TAO, X.; ZHENG, W.; MA, X.; WEI, D. “Development of a fed-batch process for the production of anticancer drug TATm-survivin(T34A) in *Escherichia coli*.” Biochem Eng J. v.43. p.163-168. 2009.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela bolsa Jovens Talentos para a Ciência concedida ao primeiro autor do trabalho e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para desenvolvimento dos estudos (Proc. no. 08/05207-4).