

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA**

**SURIAN GUERIOS FARIA**

**ESTABELECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM BANCO DE  
CÉLULAS DE TRABALHO PARA PRODUÇÃO DA ENZIMA TAQ DNA  
POLIMERASE**

**DISSERTAÇÃO**

**CURITIBA**

**2017**

**SURIAN GUERIOS FARIA**

**ESTABELECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM BANCO DE  
CÉLULAS DE TRABALHO PARA PRODUÇÃO DA ENZIMA TAQ DNA  
POLIMERASE**

Dissertação de Mestrado Profissional apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do grau de “Mestre em Ciências” – Área de Concentração: Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Kurt Schneider  
Coorientadora: Dra. Viviane Monteiro Góes

**CURITIBA**

**2017**

---

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação**

---

F224e Faria, Surian Guerios  
2017 Estabelecimento e caracterização de um banco de células  
de trabalho para produção da enzima Taq DNA Polimerase  
/ Surian Guerios Faria.-- 2017.  
135 f.: il.; 30 cm.

Disponível também via World Wide Web.

Texto em português, com resumo em inglês.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica  
Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia  
Biomédica. Área de Concentração: Engenharia Biomédica,  
Curitiba, 2017.

Bibliografia: f. 121-127.

1. DNA polimerases. 2. Enzimas. 3. Reação em cadeia  
de polimerase. 4. Células - Criopreservação. 5. Biologia  
molecular. 6. Saúde pública. 7. Instituto de Biologia  
Molecular do Paraná. 8. Engenharia biomédica - Dissertações.  
I. Schneider, Fábio Kurt, orient. II. Góes, Viviane Monteiro,  
coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.  
Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica. IV.  
Título.

CDD: Ed. 22 -- 610.28

---

**Biblioteca Central do Câmpus Curitiba - UTFPR**

Título da Dissertação Nº83

**“Estabelecimento e caracterização de um banco de células de trabalho para produção da enzima Taq DNA polimerase”.**

Por

**Surian Guerios Faria**

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Engenharia Biomédica

LINHA DE PESQUISA: Biotecnologia.

Esta dissertação foi apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de **MESTRE EM ENGENHARIA BIOMÉDICA (M.Sc.)** – Área de Concentração: Engenharia Biomédica, pelo **Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica (PPGEB)**, – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (**UTFPR**), Campus Curitiba, às **14h00min** do dia **23 de fevereiro de 2017**. O trabalho foi aprovado pela Banca Examinadora, composta pelos professores:

---

Fabio Kurt Schneider, Dr.  
(Presidente – UTFPR)

---

Prof. Luis Gustavo Morello, Dr.  
(ICC)

---

Prof. Gilson Yukio Sato, Dr.  
(UTFPR)

Visto da coordenação:

---

Prof<sup>a</sup>. Leandra Ulbricht., Dr<sup>a</sup>.  
(Coordenadora do PPGEB)

Dedico este trabalho à minha mãe  
Madeleine, por seu amor incondicional e  
por me apoiar em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, meu Criador e Pai, por ter me dado condições de estar aqui, por ter me orientado e iluminado em todos os momentos, pelo amor incondicional e zelo a mim destinados.

A minha mãe Madeleine Ayres Guerios, por sua completa dedicação a mim, por estar sempre comigo me auxiliando, me levantando, me fazendo acreditar e realizar, por todo o exemplo de vida que me dá a cada dia.

Ao meu pai Dalton Faustino Faria, que apesar de corporalmente ausente há tantos anos, sei que segue me acompanhando e me iluminando em todos os momentos importantes de minha vida.

À minha avó Lacy Ayres Guerios, por todo carinho, motivação, afeto e acalento. Ela sabe o quão importante sua presença é para mim.

Ao meu namorado Guido Günther, por ser meu parceiro para tudo, por todo o incentivo que me dá, pelo carinho, amor, atenção, por me proporcionar a perspectiva de uma vida tão feliz ao seu lado.

À minha madrinha Marahane Ayres Guerios, por sua disponibilidade e amabilidade, pessoa com a qual sei que sempre posso contar.

Às minhas tias Katy Ayres Matzembacher e Poliana Ayres Matzembacher, pelo apoio, por me confortarem nos momentos de dificuldade, pelo carinho e afeto.

Às minhas amigas Fernanda Marchesini Altheia e Flávia Manfroni, por me motivarem, me inspirarem e por estarem sempre presentes.

A todos de minha família e a todos os meus amigos que estiveram ao meu lado, me apoiando e incentivando nessa trajetória.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Fábio Kurt Schneider, pela disponibilidade e por ter tão bem me guiado com toda sua bagagem acadêmica.

À minha coorientadora e gerente do setor de Produção do Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), Dra. Viviane Monteiro Góes, pela sugestão do tema Banco de Células, por sua orientação e dedicação sempre presentes.

À Dra. Elezer Monte Blanco Lemes, vice-diretora de Produção do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos – Fiocruz), pela solicitude e grande ajuda na elaboração e execução dos procedimentos para estabelecimento do Banco de Células de Trabalho.

À gerente do Controle de Qualidade do IBMP, Cristina Reinert, pela disponibilidade em me orientar quanto ao projeto de pesquisa e pela grande oportunidade de crescimento intelectual e pessoal que me proporcionou com o trabalho no Laboratório de Controle de Qualidade (LCQ) do IBMP durante o período em que fui bolsista de mestrado.

Aos meus colegas e amigos com os quais trabalhei no LCQ do IBMP, Daiane Lima Szpak, Dásio Roberto de Oliveira Junior, Fabio Cesar de Oliveira, Isabela Duarte, Lorena Mello Rodrigues, Mariely Cordeiro Estrela, Pedro Henrique de Caires Schluga, Tainara Renata Vieira Alves da Luz, Thaisa Yumi Kataoka e Walleyd Sami Tassi, pela ajuda e colaboração na execução dos procedimentos, interpretação de resultados e elaboração de documentos internos relacionados ao projeto de pesquisa.

Às colegas e amigas do setor de Produção do IBMP, Priscila Zanette de Souza, Stephanie Massaki, Alexandre Garus, Bruna de Almeida Braga, Cristiane Kuligorki Fernandes, Elayne Cristina Raniel, Keyla Kaori Kuniyoshi e Valesca Weingartner Montibeller, pela prestatividade e auxílio com o desenvolvimento das atividades.

Às colegas e amigas do setor de Oligonucleotídeos do IBMP, Dayane Priscila Dias Machado e Jackeline Taveira Cangussu, pelo fornecimento dos iniciadores necessários aos procedimentos do projeto de pesquisa.

Às colegas e amigas do setor de Garantia da Qualidade do IBMP, Anna Luiza de Castro, Cintia Rompkovski, Mariana Torres, Vanessa Lindemann Lubasinski e Vanessa Mensch Garcia, pelo apoio e orientações quanto às documentações.

Aos colegas e amigos dos setores de Logística, Manutenção e Engenharia do IBMP, pelo suporte, auxílio e disponibilidade.

Ao Gerente de Logística e Engenharia do IBMP, Maykon Luiz Nascimento Costa, por ter me incentivado a me inscrever no processo seletivo do mestrado.

À Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica (PPGEB), pela cooperação.

A todas as pessoas que colaboraram e estiveram presentes nessa trajetória, e que não estão presentes nessas palavras. Agradeço e me desculpo por não estar citando nome a nome. Mas, elas podem estar certas de meu reconhecimento e apreço.

## RESUMO

FARIA, Surian Guerios. **Estabelecimento e Caracterização de um Banco de Células de Trabalho para Produção da enzima Taq DNA Polimerase**. 2017. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2017.

O Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP) produz kits de diagnóstico para o Sistema Único de Saúde (SUS), que consistem em testes moleculares, realizados por reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR). Essa reação ocorre pela atividade da enzima Taq DNA Polimerase (Taq). O IBMP fabrica a Taq a partir do cultivo de células bacterianas, em conformidade às Boas Práticas de Fabricação (BPF) e pretende produzi-la a partir de um banco de células providas de um mesmo clone visando o aumento da homogeneidade e reprodutibilidade do processo produtivo. O objetivo do presente trabalho é estabelecer um banco de células de trabalho (BCT) e avaliar sua estabilidade para a produção da enzima Taq, partindo de um banco de células mestre (BCM) estabelecido em Bio-Manguinhos. O estabelecimento do BCT consiste em cultivar colônias do BCM, caracterizá-las, avaliar desempenho, e eleger células adequadas para compor o BCT. O estudo da estabilidade contempla testes para comprovar que as células retêm a capacidade de produzir a Taq ao longo do tempo (i.e., viabilidade celular, estabilidade plasmídica, cinética de crescimento, indução da expressão, extração e dosagem do DNA plasmidial, análise de restrição e avaliação plasmidial). O critério decisivo para a seleção de um dos clones para compor o BCT foi o resultado da cinética de crescimento. A estabilidade foi estudada em 10 avaliações realizadas mês a mês. Nelas, a viabilidade celular foi superior a  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL, mostrando que as células permanecem com capacidade de realizar seu metabolismo e reprodução. O crescimento até a fase exponencial se deu entre 6 e 7 horas de cultivo, com taxa específica de crescimento superior a  $0,4 \text{ min}^{-1}$ . Os cultivos acrescidos de 1 mM de IPTG expressaram a enzima Taq DNA Polimerase, revelando a qualificação das células para o fim proposto. A estabilidade plasmídica foi superior a 90%, indicando que o plasmídeo pBioMTaq se mantém estável e com boa capacidade de replicação. A concentração plasmidial média foi de 338 ng/ $\mu\text{L}$ , e em todos os meses foi maior que 100 ng/ $\mu\text{L}$ . Na análise de restrição os plasmídeos foram corretamente clivados e na avaliação plasmidial houve adequada amplificação do fragmento de 500 pb, demonstrando que o plasmídeo se mantém íntegro e estável, com sequências compatíveis com sua construção. O BCT foi testado como substrato para um processo fabril típico do IBMP de produção da Taq DNA polimerase, se apresentando satisfatório em todas as etapas em que foi avaliado. Esses resultados indicam que o banco estabelecido se manteve estável ao longo de 10 meses e está apto a ser utilizado como protótipo para um BCT em conformidade às BPF.

**Palavras-chave:** Banco de células de trabalho. Taq DNA Polimerase. Caracterização de células.



## ABSTRACT

FARIA, Surian Guerios. **Establishment and Characterization of a Working Cell Bank for the Production of enzyme Taq DNA Polymerase**. 2017. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2017.

The Molecular Biology Institute of Paraná (*Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP*) produces diagnostic kits for the Brazilian Unified National Health System (*Sistema Único de Saúde - SUS*), that consist in molecular tests, carried out by polymerase chain reaction (PCR). This reaction is performed by the enzyme Taq DNA Polymerase (Taq). The IBMP manufactures Taq from bacterial cell culture in accordance with Good Manufacturing Practices (GMP) and intends to produce it from a cell bank using cells from the same clone in order to increase the homogeneity and reproducibility of the production process. The objective of the present work is to establish a working cell bank (WCB) and to evaluate its stability for the production of the Taq enzyme, starting from a master cell bank (MCB) established in Bio-Manguinhos. The WCB establishment consists of cultivating MCB colonies, characterizing them, evaluating performance, and electing proper cells to compose the WCB. The stability study contemplates tests to prove that cells retain the ability to produce Taq over time (i.e., cell viability, plasmid stability, growth kinetics, expression induction, plasmid DNA extraction and dosage, restriction analysis and plasmid evaluation). The decisive criterion for the selection of one of the clones to compose WCB was the result of growth kinetics. Stability was studied in 10 month-to-month evaluations. In them, cell viability was higher than  $1,0 \times 10^6$  CFU/mL, showing that the cells remain capable of performing their metabolism and reproduction. Growth to the exponential phase occurred between 6 and 7 hours of culture, with a specific growth rate greater than  $0.4 \text{ min}^{-1}$ . The cultures with 1 mM IPTG expressed Taq DNA polymerase enzyme, revealing the qualification of the cells to the intended purpose. The plasmid stability was greater than 90%, indicating that the plasmid pBioMTaq remains stable and has good replication ability. The mean plasmid concentration was 338 ng/ $\mu\text{L}$ , and in all months it was greater than 100 ng/ $\mu\text{L}$ . In the restriction analysis the plasmids were correctly cleaved and in the plasmid evaluation there was adequate amplification of the 500 bp fragment, demonstrating that the plasmid remains intact and stable, with compatible sequences with its construction. The WCB was tested as substrate for a typical IBMP production process of Taq DNA polymerase, presenting satisfactory in all the stages in which it was evaluated. These results indicate that the established bank remained stable over 10 months and is apt to be used as a prototype for a WCB in compliance with GMP.

**Keywords:** Working Cell Bank. Taq DNA Polymerase. Cell characterization.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas da clonagem gênica em verde, e em preto a identificação dos esquemas.....	30
Figura 2 - Mapa do plasmídeo pBioMTaq .....	31
Figura 3 - Etapas da reação em cadeia da Polimerase (PCR).....	33
Figura 4 - Esquema de medição de transmitância e absorbância na suspensão bacteriana.....	40
Figura 5 - Esquema do sistema de eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida .....	41
Figura 6 - Efeito do detergente SDS na forma e na carga da proteína .....	42
Figura 7 - Esquema da lise alcalina de <i>Escherichia coli</i> .....	45
Figura 8 - Princípio de purificação de ácidos nucleicos em membrana de sílica.....	46
Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose para separação de moléculas de DNA...47	
Figura 10 - Migração das diferentes formas de DNA em gel de eletroforese .....	48
Figura 11 - Esquema de diluição seriada até $10^{-5}$ para viabilidade celular .....	62
Figura 12 - Esquema de Placas de Petri para Viabilidade Celular .....	62
Figura 13 - Esquema de diluição seriada até $10^{-6}$ .....	65
Figura 14 - Esquema de Placas de Petri para Estabilidade Plasmídica .....	65
Figura 15 - Esquema para identificação das placas para <i>picking and patching</i> colonies .....	66
Figura 16 - Esquema de realização do <i>picking and patching colonies</i> .....	67
Figura 17 - Esquema de identificação dos tubos de reação seguindo as diluições das enzimas, onde R se refere à empresa Roche, GE à empresa de mesmo nome, CN é o controle negativo, A e B são as amostras em teste. Os números se referem às diluições, seguindo o apresentado na Tabela 4 e na Tabela 5 .....	74
Figura 18 - Colônias crescidas a partir da inoculação de 5 $\mu$ L e 10 $\mu$ L de cultivo.....	76
Figura 19 - Colônias crescidas a partir da inoculação de 20 $\mu$ L e 30 $\mu$ L de cultivo...76	
Figura 20 - Colônias crescidas a partir da inoculação de 40 $\mu$ L e 50 $\mu$ L de cultivo...77	
Figura 21 - Colônias crescidas a partir da inoculação de 100 $\mu$ L de cultivo.....	77

Figura 22 - Resultado da indução da expressão dos clones avaliados, não induzidos e induzidos com 1 mM e 2 mM de IPTG .....	80
Figura 23 - Resultado da indução da expressão dos clones avaliados, não induzidos e induzidos com 3 mM de IPTG .....	81
Figura 24 - Resultado da indução da expressão dos clones avaliados, não induzidos e induzidos com 1 mM, 2 mM e 3 mM de IPTG .....	82
Figura 25 - Resultado da análise de restrição do plasmídeo pBioMTaq com as enzimas EcoRI e XbaI .....	84
Figura 26 - Resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida para indução da expressão da enzima Taq DNA Polimerase.....	92
Figura 27 – Crescimento de 50 UFC em ambas as placas LB agar com e sem ampicilina. ....	97
Figura 28 - Resultado da análise de restrição dos plasmídeos pBioMTaq.....	98
Figura 29 - Resultado da Avaliação Plasmidial .....	99
Figura 30 - Resultado da indução da expressão da enzima Taq DNA Polimerase na etapa Pré-Inóculo .....	109
Figura 31 - Resultado da indução da expressão da enzima Taq DNA Polimerase na etapa do cultivo em biorreator pré-indução com IPTG .....	110
Figura 32 - Resultado da indução da expressão da enzima Taq DNA Polimerase na etapa do cultivo em biorreator pós-indução com IPTG .....	111
Figura 33 - Resultado da análise de restrição dos plasmídeos pBioMTaq da triplicata proveniente do cultivo em biorreator pré-indução .....	113
Figura 34 - Resultado da avaliação plasmidial da triplicata de cultivos da etapa do pré-inóculo.....	114
Figura 35 - Resultado da avaliação plasmidial da triplicata de cultivos da etapa em biorreator pré-indução com IPTG .....	115
Figura 36 - Resultado da avaliação plasmidial da triplicata de cultivos da etapa de fermentação em biorreator pós-indução com IPTG.....	115
Figura 37 - Resultado do teste de atividade da Taq DNA polimerase no lisado clarificado. ....	116

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva de crescimento bacteriano com as quatro fases típicas de crescimento .....	39
Gráfico 2 - Fluxograma dos testes realizados durante o estabelecimento do banco de células de trabalho .....	53
Gráfico 3 - Fluxograma dos testes realizados até o T6 do estudo de estabilidade do BCT .....	60
Gráfico 4 - Fluxograma dos testes realizados a partir de T7 do estudo de estabilidade do BCT .....	61
Gráfico 5 - Cinética de crescimento dos clones avaliados .....	78
Gráfico 6 - Taxas específicas de crescimento microbiano dos clones avaliados, com barras de erro padrão .....	79
Gráfico 7 - Concentração plasmidial dos clones avaliados, com barras de erro padrão .....	83
Gráfico 8 - Cinética de crescimento do clone 3 para cultura preparatória .....	85
Gráfico 9 - Viabilidade celular ao longo do estudo de estabilidade, com barras de erro padrão .....	86
Gráfico 10 - Número médio de UFC crescidas para a triplicata de cultivos avaliada em cada mês .....	87
Gráfico 11 - Curva de crescimento de T2 .....	88
Gráfico 12 - Curva de crescimento de T6 .....	88
Gráfico 13 - Curva de crescimento de T10 .....	89
Gráfico 14 - Curvas de Crescimento de T0 a T10 .....	90
Gráfico 15 - Taxas Específicas de Crescimento de T0 a T10, com barras de erro padrão .....	91
Gráfico 16 - Concentrações plasmidiais de T0 a T5, com barras de erro padrão .....	93
Gráfico 17 - Concentrações plasmidiais de T6 a T10, com barras de erro padrão .....	93
Gráfico 18 - Número de UFC crescidas a partir dos cultivos sem indução com IPTG .....	94
Gráfico 19 - Número de UFC crescidas a partir dos cultivos pós-indução com IPTG	95

Gráfico 20 - Curva de crescimento dos dois cultivos avaliados para pré-inóculo....	100
Gráfico 21 - Curvas de crescimento dos cultivos da cultura preparatória .....	102
Gráfico 22 - Viabilidade celular da triplicata de cultivos provenientes do pré-inóculo e do cultivo em biorreator, com barras de erro padrão.....	104
Gráfico 23 - Número médio de UFC crescidas no teste de viabilidade celular na triplicata de cultivos provenientes do pré-inóculo e do cultivo em biorreator.....	105
Gráfico 24 - Número médio de UFC crescidas no teste de estabilidade plasmídica na triplicata de cultivos provenientes do pré-inóculo e do cultivo em biorreator.....	106
Gráfico 25 - Curva de crescimento da triplicata de cultivos provenientes do pré-inóculo.....	107
Gráfico 26 - Curva de crescimento da triplicata de cultivos provenientes do cultivo em biorreator.....	107
Gráfico 27 - Dosagem do DNA plasmidial da triplicata de cultivos provenientes do pré-inóculo e dos cultivos em biorreator antes e pós-indução com IPTG, com barras de erro padrão.....	112
Gráfico 28 - Curva de crescimento do cultivo de T0.....	129
Gráfico 29 - Curva de crescimento do cultivo de T1.....	129
Gráfico 30 - Curvas de crescimento da triplicata de cultivos de T2.....	130
Gráfico 31 - Curvas de crescimento da triplicata de cultivos de T3.....	130
Gráfico 32 - Curvas de crescimento da triplicata de cultivos de T4.....	131
Gráfico 33 - Curvas de crescimento da triplicata de cultivos de T5.....	131
Gráfico 34 - Curvas de crescimento da triplicata de cultivos de T6.....	132
Gráfico 35 - Curvas de crescimento da triplicata de cultivos de T7.....	132
Gráfico 36 - Curvas de crescimento da triplicata de cultivos de T8.....	133
Gráfico 37 - Curvas de crescimento da triplicata de cultivos de T9.....	133
Gráfico 38 - Curvas de crescimento da triplicata de cultivos de T10.....	134

Quadro 1 - Alterações de procedimentos ao longo do estudo de estabilidade .....	59
Quadro 2 - Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados na avaliação plasmidial .....	68

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Volumes de reagentes a serem adicionados para 1 reação de análise de restrição.....	57
Tabela 2 - Reagentes necessários para 1 PCR da avaliação plasmidial .....	69
Tabela 3 - Programação de 35 ciclos no termociclador .....	69
Tabela 4 - Diluição das enzimas referência Roche (R) e GE .....	73
Tabela 5 - Diluição das amostras A e B do lisado clarificado .....	73
Tabela 6 - Reagentes necessários para uma reação do teste de atividade da enzima Taq no lisado clarificado.....	74
Tabela 7 - Programação do termociclador para teste de atividade de Taq no lisado clarificado .....	75
Tabela 8 - Cinética de crescimento dos clones avaliados para o BCT. Os valores mostrados são de densidade óptica a 600 nm ( $DO_{600nm}$ ).....	78
Tabela 9 - Estabilidade plasmídica em T0 e T1 .....	95
Tabela 10 - Crescimento dos dois cultivos avaliados para pré-inóculo.....	100
Tabela 11 - Taxas específicas de crescimento do pré-inóculo.....	101
Tabela 12 - Densidades ópticas a 600 nm da cultura preparatória .....	101
Tabela 13 - Acompanhamento da densidade óptica a 600nm do cultivo em biorreator .....	102
Tabela 14 - Pesagem dos pacotes plásticos contendo biomassa .....	103
Tabela 15 - Velocidades específicas de crescimento da triplicata de cultivos provenientes do pré-inóculo e do cultivo em biorreator, em $min^{-1}$ .....	108
Tabela 16 - Resultado da determinação do peso seco da biomassa .....	117

## LISTA DE ABREVIATURAS

amp	Ampicilina
Bio-Manguinhos	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
pBioMTaq	Plasmídeo que carrega o inserto para produção da Taq DNA Polimerase BioMTaq
<i>T. aquaticus</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Taq	Taq DNA Polimerase

## LISTA DE SIGLAS

BCM	Banco de Células Mestre
BCT	Banco de Células de Trabalho
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BSA	Albumina sérica bovina, do inglês <i>bovine serum albumin</i>
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos, do inglês <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos, do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
GE	Empresa General Eletric
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV	Vírus da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, do inglês <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> )
IBMP	Instituto de Biologia Molecular do Paraná
ICH	Conferência Internacional de Harmonização, do inglês <i>International Conference of Harmonisation</i>
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido

LB	Luria-Bertani
MOPS	Ácido 4-morfolinopropanossulfônico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida, do inglês <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
RNase	Enzima que degrada RNA
SDS	Dodecilsulfato de sódio, do inglês <i>sodium dodecyl sulfate</i>
UFC	Unidades formadoras de colônias
ZDC	Zika, dengue e Chikungunya

## LISTA DE ACRÔNIMOS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, do inglês <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
NAT	Teste de ácido nucleico, do inglês <i>Nucleic Acid Test</i>
Roche	A F. Hoffmann–La Roche AG
SUS	Sistema Único de Saúde



## LISTA DE DEFINIÇÕES

Lag	Fase inicial do crescimento bacteriano, com pouca ou nenhuma divisão celular
Log	Fase de crescimento bacteriano de modo exponencial
Nonidet P-40	Octilfenoxi poli(etilenoxi)etanol
RNase free	Livre de enzimas que degradam o RNA
Trizma base	2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol ou Tris(hidroximetil)aminometano
Tween®20	Monolaurato de polietilenoglicol sorbitano

## LISTA DE SÍMBOLOS

$A_{260}$	Absorbância a 260 nm
$DO_{600nm}$	Densidade óptica a 600 nm
HCl	Ácido clorídrico
KAc	Acetato de potássio
KDS	Dodecil sulfato de potássio
$Mg^{2+}$	Íon magnésio
NaOH	Hidróxido de sódio

## LISTA DE UNIDADES

kDa	Quilodalton
M	Molar, equivalente a mol/L
rpm	Rotações por minuto

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
1.1 RELEVÂNCIA .....	23
1.2 OBJETIVOS.....	24
1.2.1 Objetivo Geral.....	24
1.2.2 Objetivos Específicos.....	24
1.2.2.1 Objetivo Específico 1 .....	24
1.2.2.2 Objetivo Específico 2 .....	24
1.2.2.3 Objetivo Específico 3 .....	24
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>25</b>
2.1 ASPECTOS REGULATÓRIOS .....	25
2.2 CLONAGEM E EXPRESSÃO GÊNICA DA TAQ DNA POLIMERASE .....	28
2.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) .....	32
2.4 BANCO DE CÉLULAS NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS.....	34
2.4.1 Criopreservação.....	35
2.4.2 Banco de Células Mestre .....	37
2.5 ESTABELECIMENTO DO BANCO DE CÉLULAS DE TRABALHO .....	38
2.5.1 Cinética de Crescimento.....	38
2.5.2 Indução da Expressão da Enzima Taq DNA Polimerase.....	40
2.5.3 Extração e Dosagem do DNA Plasmidial.....	44
2.5.4 Análise de Restrição .....	47
2.6 CARACTERIZAÇÃO DO BANCO DE CÉLULAS DE TRABALHO .....	50
2.6.1 Viabilidade Celular .....	50
2.6.2 Estabilidade Plasmídica .....	51
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>53</b>
3.1 ESTABELECIMENTO DO BANCO DE CÉLULAS DE TRABALHO .....	53
3.1.1 Abertura do Banco de Células Mestre .....	53
3.1.2 Cinética de Crescimento dos Clones do BCM .....	54

3.1.3	Indução da Expressão da Enzima Taq DNA Polimerase .....	55
3.1.4	Extração e Dosagem do DNA Plasmidial.....	56
3.1.5	Análise de Restrição .....	56
3.1.6	Seleção do clone para compor o BCT .....	57
3.1.7	Cultura Preparatória para Congelamento .....	57
3.2	ESTUDO DE ESTABILIDADE DO BANCO DE CÉLULAS DE TRABALHO.....	58
3.2.1	Viabilidade Celular .....	61
3.2.2	Cinética de Crescimento .....	63
3.2.3	Indução da Expressão da Enzima Taq DNA Polimerase .....	63
3.2.4	Estabilidade Plasmídica .....	64
3.2.5	Extração e Dosagem do DNA plasmidial .....	67
3.2.6	Análise de Restrição .....	68
3.2.7	Avaliação Plasmidial por PCR .....	68
3.3	BCT APLICADO EM PROCESSO PRODUTIVO DA TAQ DNA POLIMERASE .....	70
3.3.1	Processo Produtivo .....	70
3.3.1.1	Pré-Inóculo.....	70
3.3.1.2	Cultura preparatória .....	70
3.3.1.3	Cultivo em biorreator.....	71
3.3.2	Caracterização das células .....	71
3.3.3	Lisado clarificado .....	72
3.3.3.1	Lise e clarificação das células.....	72
3.3.3.2	Teste de atividade da enzima Taq .....	73
3.3.4	Determinação do peso seco .....	75
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>76</b>
4.1	ESTABELECIMENTO DO BANCO DE CÉLULAS DE TRABALHO .....	76
4.1.1	Abertura do Banco de Células Mestre .....	76
4.1.2	Cinética de crescimento dos clones do BCM.....	77
4.1.3	Indução da Expressão da enzima Taq DNA Polimerase .....	79
4.1.4	Extração e Dosagem do DNA Plasmidial.....	82

4.1.5	Análise de Restrição .....	83
4.1.6	Seleção do clone para compor o BCT .....	84
4.1.7	Cultura Preparatória para Congelamento do BCT .....	84
4.2	ESTUDO DE ESTABILIDADE DO BANCO DE CÉLULAS DE TRABALHO .....	85
4.2.1	Viabilidade Celular .....	85
4.2.2	Cinética de Crescimento .....	87
4.2.3	Indução da Expressão da enzima Taq DNA Polimerase .....	91
4.2.4	Extração e Dosagem do DNA Plasmidial .....	92
4.2.5	Estabilidade Plasmídica .....	93
4.2.6	Análise de Restrição .....	97
4.2.7	Avaliação Plasmidial por PCR .....	98
4.3	BCT APLICADO EM PROCESSO PRODUTIVO DA TAQ DNA POLIMERASE .....	99
4.3.1	Processo Produtivo .....	99
4.3.1.1	Pré-inóculo .....	99
4.3.1.2	Crescimento da cultura preparatória .....	101
4.3.1.3	Crescimento em biorreator Wave .....	102
4.3.2	Caracterização das células .....	103
4.3.2.1	Viabilidade Celular .....	103
4.3.2.2	Estabilidade Plasmídica .....	105
4.3.2.3	Cinética de Crescimento .....	106
4.3.2.4	Indução da expressão da enzima Taq DNA Polimerase .....	108
4.3.2.5	Extração e Dosagem do DNA Plasmidial .....	111
4.3.2.6	Análise de Restrição .....	112
4.3.2.7	Avaliação Plasmidial .....	113
4.3.3	Lisado clarificado .....	116
4.3.4	Determinação do Peso Seco .....	116
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>118</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>121</b>
	<b>APÊNDICE A - Curvas de Crescimento do Estudo de Estabilidade do BCT....</b>	<b>128</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), originado de uma parceria entre a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e o Governo do Paraná, atua em desenvolvimento tecnológico, com pesquisa aplicada e inovação, além de produzir industrialmente insumos e kits de diagnóstico para o Sistema Único de Saúde (SUS) (IBMP, 2017). As atividades do IBMP estão sempre alinhadas com a visão da Fiocruz, i.e., “ser uma instituição pública e estratégica de saúde, reconhecida pela sociedade brasileira e de outros países por sua capacidade de colocar a ciência, a tecnologia, a inovação, a educação e a produção tecnológica de serviços e insumos estratégicos para a promoção da saúde da população, a redução das desigualdades e iniquidades sociais, a consolidação e o fortalecimento do SUS, a elaboração e o aperfeiçoamento de políticas públicas de saúde” (FIOCRUZ, 2016).

Dentre as decisões estratégicas para o benefício do sistema de saúde nacional, está o fato de o IBMP produzir módulos de amplificação para kits diagnósticos, que consistem em testes moleculares para diagnosticar doenças como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS, do inglês *Acquired Immune Deficiency Syndrome*), hepatites B e C, zika, dengue e febre Chikungunya (IBMP, 2017). Testes moleculares detectam o material genético do patógeno, podendo ser denominados NAT, do inglês *nucleic acid tests* (testes de ácidos nucleicos). Outro método comumente utilizado para diagnóstico de doenças é o sorológico, baseado na detecção de anticorpos específicos para o patógeno no sangue do paciente. Entretanto, os testes sorológicos estão sujeitos à janela imunológica, que é o intervalo de tempo no qual o paciente já está infectado, porém ainda não é possível detectar a doença porque os níveis de patógeno são muito baixos e ainda não foi desencadeada a produção de anticorpos detectáveis pelo teste. A principal vantagem de testes NAT em relação aos sorológicos é a redução da janela imunológica, ou seja, passa a ser possível detectar a doença mesmo quando ainda não há anticorpos e a concentração do patógeno no sangue do paciente está muito baixa. Para a hepatite C, por exemplo, o teste sorológico permite o diagnóstico somente quando o paciente já está infectado há mais de 70 dias, enquanto que com NAT esse tempo se reduz para 12 dias (BUSCH et al, 2000). Por essa maior sensibilidade, os testes NAT são os utilizados para testar as bolsas de sangue de

toda a hemorrede brasileira quanto à presença de HIV, HCV e HBV, que são os vírus da AIDS, hepatites C e B, respectivamente.

Os testes moleculares são realizados através da reação em cadeia da polimerase, ou PCR (do inglês, *polymerase chain reaction*). A PCR consiste na amplificação exponencial de uma sequência específica de ácido desoxirribonucleico (DNA – do inglês *deoxyribonucleic acid*). Para que a reação aconteça, são necessários alguns reagentes, dentre os quais a enzima Taq DNA polimerase, responsável por sintetizar novas fitas de DNA na presença de iniciadores. A Taq DNA Polimerase, comumente chamada somente Taq, foi inicialmente isolada da bactéria *Thermus aquaticus*. Através da tecnologia do DNA recombinante, atualmente a enzima Taq é comumente produzida na bactéria *Escherichia coli* e dela purificada. A Taq é a DNA polimerase mais adequada para as PCRs por ser termoestável e assim passar pelos 94°C da etapa de desnaturação de DNA sem perder sua atividade (BROWN, 2003).

O IBMP fabrica testes moleculares para diagnóstico de várias doenças. O Kit NAT HIV/HCV/HBV detecta os vírus da AIDS e das hepatites B e C. O Kit BIOMOL ZDC, que está em processo de registro e implantação, permite diagnosticar diferencialmente as três doenças transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti*: zika, dengue e febre Chikungunya. Ambos os Kits NAT e BIOMOL ZDC são destinados ao SUS, para testar as bolsas de sangue doadas para a hemorrede pública brasileira, garantindo a eficácia e segurança transfusional (IBMP, 2017).

O IBMP, em parceria com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC), produz também o Kit de Diagnóstico Molecular da Malária, que utiliza a tecnologia da gelificação da PCR para detectar as espécies de *Plasmodium*. Ademais, o IBMP fornece ao CDC e à *Food and Drug Administration* (FDA) o teste molecular para detecção do protozoário *Cyclospora cayetanensis*, causador de diarreia intensa por ingestão de alimentos contaminados (IBMP, 2017).

O IBMP produz a enzima Taq em conformidade às Boas Práticas de Fabricação (BPF). Além disso, pretende passar a fabricá-la a partir de um banco de células estabelecido, a fim de aumentar a reprodutibilidade do processo produtivo ao utilizar células provindas de um mesmo clone (IBMP, 2016). Assim, a produção da Taq partiria de um banco de células de trabalho (BCT) proveniente de um banco de células mestre (BCM). Um BCM consiste em uma cultura celular derivada de uma

única colônia completamente caracterizada, distribuída em vários frascos que são acondicionados sob condições adequadas para preservação. Um BCT, por sua vez, consiste em uma cultura de células preparada a partir de uma alíquota do BCM sob condições de cultivo definidas e distribuída em vários frascos adequadamente preservados (BRASIL, 2014).

O presente trabalho teve como objetivo estabelecer um BCT e estudar a sua estabilidade para a produção da Taq DNA Polimerase. Para isto, foi utilizado o BCM estabelecido no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), uma das unidades da Fiocruz.

O estabelecimento do BCT consistiu em cultivar colônias do banco de células mestre (BCM), caracterizá-las, avaliar desempenho, eleger uma delas para cultivar a cultura preparatória a ser congelada e compor o BCT. Os testes realizados foram cinética de crescimento celular, indução da expressão da enzima Taq, extração e dosagem do DNA plasmidial, e análise de restrição.

O estudo da estabilidade do BCT contemplou testes para comprovar que as células mantêm a capacidade de produzir o produto biotecnológico de interesse ao longo do tempo. Abrangeu desde o estabelecimento até os 10 meses posteriores, com estudos realizados mês a mês. Foram feitos os mesmos testes do estabelecimento, com acréscimo da determinação de viabilidade celular, estabilidade plasmídica e da avaliação plasmidial por PCR.

Este documento está composto pelos capítulos: fundamentação teórica, metodologia, resultados e discussão e conclusões.

## 1.1 RELEVÂNCIA

As normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em relação a bancos de células estão presentes nas Resoluções de Diretoria Colegiada (RDC): nº 49 (BRASIL, 2011); nº 55 (BRASIL, 2010); nº 69 (BRASIL, 2014); e nº 16 (BRASIL, 2013). Nelas consta que a caracterização do BCT deve contemplar a avaliação de identidade, pureza, estabilidade e qualificação das células para o fim proposto. As normativas da ANVISA são baseadas nas recomendações regulatórias da Conferência Internacional de Harmonização (*International Conference of Harmonisation - ICH*), da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da *Food and Drug Administration* (FDA). Com isso, o atendimento às normas da ANVISA significa também o cumprimento às recomendações internacionais.

As recomendações regulatórias da ANVISA direcionam quais medidas precisam ser tomadas para o estabelecimento e estudo da estabilidade de banco de células principalmente quanto aos registros e documentação. Entretanto, não explicitam quais testes e em que condições estes devem ser realizados. Além disso, até o presente momento são escassas publicações científicas sobre estabelecimento de bancos de células bacterianas em conformidade às BPF. Destarte, um trabalho descrevendo todos os testes envolvidos no estabelecimento de um BCT de células de *Escherichia coli* e apresentando o histórico de sua estabilidade se constitui em uma contribuição favorável para a comunidade científica.



## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Estabelecer um banco de células de trabalho estável em conformidade com agências regulatórias para produção da enzima Taq DNA Polimerase em uma instituição governamental de apoio ao Sistema Único de Saúde do Brasil.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

#### 1.2.2.1 Objetivo Específico 1

Definir um processo para o estabelecimento e caracterização de um Banco de Células de Trabalho a partir de um Banco de Células Mestre considerando aspectos regulatórios e as especificidades do IBMP.

#### 1.2.2.2 Objetivo Específico 2

Estabelecer um BCT e caracterizar identidade, pureza e qualificação das células (e.g., análises de estabilidade, viabilidade celular, estabilidade plasmídica e avaliação plasmidial das células).

#### 1.2.2.3 Objetivo Específico 3

Avaliar o potencial da utilização do BCT no processo fabril do IBMP para produção da enzima Taq DNA Polimerase.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A fundamentação teórica está composta neste trabalho pelas seções (1) Aspectos Regulatórios, (2) Clonagem e Expressão Gênica Da Taq DNA Polimerase, (3) Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) , (4) Banco de Células na Produção de Enzimas (5), Estabelecimento do Banco de Células de Trabalho e (6) Caracterização do Banco de Células de Trabalho.

### 2.1 ASPECTOS REGULATÓRIOS

A RDC nº 49, de 2011, rege o estabelecimento de novos bancos de células para produtos biotecnológicos e vacinas, e determina que BCTs devem ser estabelecidos em conformidade às Boas Práticas de Fabricação (BPF), a partir de bancos de células mestre, extensivamente caracterizados e qualificados para o fim proposto. Além disso, também explicita que o estabelecimento de um novo lote do banco de células de trabalho deve ser registrado no histórico de mudanças do produto, instruído com uma declaração que contenha a identificação do novo banco de células de trabalho e com um relatório que apresente a caracterização quanto aos aspectos de identidade, pureza, estabilidade e qualificação das células para o fim proposto.

A RDC nº55, de 2010, dispõe sobre o registro de produtos biológicos. Nela está presente a Documentação de Produção e Controle de Qualidade de Produtos Biotecnológicos, que determina que para protocolar o pedido de registro do produto, a empresa solicitante deve apresentar a descrição dos bancos de células mestre e de trabalho utilizados na fabricação do produto biotecnológico. Para isso, obrigatoriamente devem ser apresentadas:

- a. sequência do gene clonado;
- b. descrição dos métodos de seleção de clones e controle de expressão;
- c. descrição do método de inserção do vetor na célula;
- d. documentação relacionada à estabilidade genética do vetor na célula hospedeira;
- e. descrição da cepa/linhagem da célula hospedeira;

- f. determinação da idade celular máxima in vitro;
- g. descrição do vetor de expressão usado para o desenvolvimento do banco de células mestre;
- h. descrição do sistema de banco de células, identificando o número do lote do banco de célula mestre e de trabalho utilizado para a produção dos lotes clínicos e industriais;
- i. descrição das atividades de controle de qualidade e estabilidade durante a produção e estocagem dos bancos de células mestre e de trabalho; e
- j. relação e frequência de realização dos testes utilizados para a avaliação da estabilidade dos bancos de células mestre e de trabalho.

A RDC nº69, de 2014, dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Insumos Farmacêuticos Ativos. Nela consta a definição de banco de células, banco de células mestre e banco de células de trabalho. Essa resolução determina que os controles do processo devem considerar a manutenção do banco de células. Explicita que o fabricante é responsável pela qualidade de cada banco de células, devendo garantir a rastreabilidade, identidade, pureza, viabilidade e realização dos demais testes em cada banco, conforme as características biológicas das células. Adicionalmente, menciona que BCMs e BCTs usados na fabricação de produtos biológicos devem ser estabelecidos conforme os princípios de BPF. Devem ser armazenados separados de outros materiais com acesso restrito a pessoas autorizadas. Para garantir a produção contínua do insumo biológico, os fabricantes devem ter planos para prevenir que algum evento não desejado como incêndio, queda de energia ou erro humano, possa inutilizar o banco de células. Tais planos podem incluir armazenamento dos frascos do banco de células em múltiplos locais. O banco de células deve ser mantido sob as condições de armazenagem adequadas para manter a viabilidade celular e evitar contaminação. Deve haver procedimentos para evitar contaminação do banco de células, principalmente durante sua manipulação. Os bancos de células de trabalho recém-preparados devem ser qualificados através de caracterização e testes apropriados. Devem ser mantidos registros das condições de armazenagem e do uso dos frascos do banco de células, de forma a permitir sua rastreabilidade. Deve ser feito o monitoramento da estabilidade do banco de células sob condições de armazenagem definidas, para

determinar sua adequação para uso. Deve haver controle e registro do número de repiques/passagens das cepas utilizadas.

A Conferência Internacional de Harmonização (*International Conference of Harmonisation* - ICH) é uma iniciativa para um processo de harmonização orientado a unificar procedimentos farmacêuticos dos Estados Unidos, Europa e Japão, visando inovações regulatórias. Os guias ICH Q tratam da qualidade dos produtos biotecnológicos. O ICH Q 5, de 1998, é o guia “Derivação e Caracterização de Substratos Celulares para Produção de Produtos Biotecnológicos”. De acordo com o ICH Q 5, o histórico da célula hospedeira deve contemplar espécie, cepa, características genótípicas e fenotípicas conhecidas, patogenicidade, produção de toxinas e as demais informações de risco, se houverem. O cultivo celular deve ser documentado, com a descrição de manipulações genéticas e seleções. Devem ser fornecidas todas as informações disponíveis sobre identificação das células, características e resultados de testes para presença de agentes endógenos e adventícios. A frequência de subcultivos após a geração do substrato celular deve ser documentada. Devem-se descrever os constituintes do meio de cultura utilizado. Adicionalmente, deve-se registrar as informações sobre a metodologia utilizada para desenvolver o substrato celular, como fusão celular, transfecção, seleção, isolamento de colônias, clonagem e amplificação gênica, adaptação às condições ou meios de cultura específicos. Os fabricantes são responsáveis por garantir a qualidade dos bancos de células e dos testes neles realizados (ICH, 1998).

Bancos de célula mestre e de trabalho podem diferir um do outro em aspectos como composição do meio de cultura e condições de cultivo. Similarmente, as condições de cultura utilizadas para preparo do BCM e BCT podem ser distintas das utilizadas no processo produtivo (ICH, 1998).

Os fabricantes devem descrever o tamanho do banco de células, quais recipientes são usados para armazenamento, os métodos usados para a preparação do banco de células, incluindo crioprotetor e meio de cultura utilizados, assim como as condições empregadas para a criopreservação. Adicionalmente, é necessário descrever os procedimentos para evitar contaminação e para permitir a rastreabilidade dos criotubos (ICH, 1998).

Para a maioria das células microbianas, a análise do crescimento em meio seletivo é adequada para confirmar a identidade das células. Para bancos de

plasmídeos, a avaliação de identidade deve ser acompanhada da análise da construção de expressão. A expressão do produto de interesse é também considerada adequada para confirmar a identidade dos sistemas de expressão microbianos. A pureza do banco de células pode ser testada utilizando agentes seletivos como antibióticos para que seja possível o cultivo em meio de cultura contendo esse agente, e assim haja crescimento apenas dos microrganismos com marca de seleção (ICH, 1998).

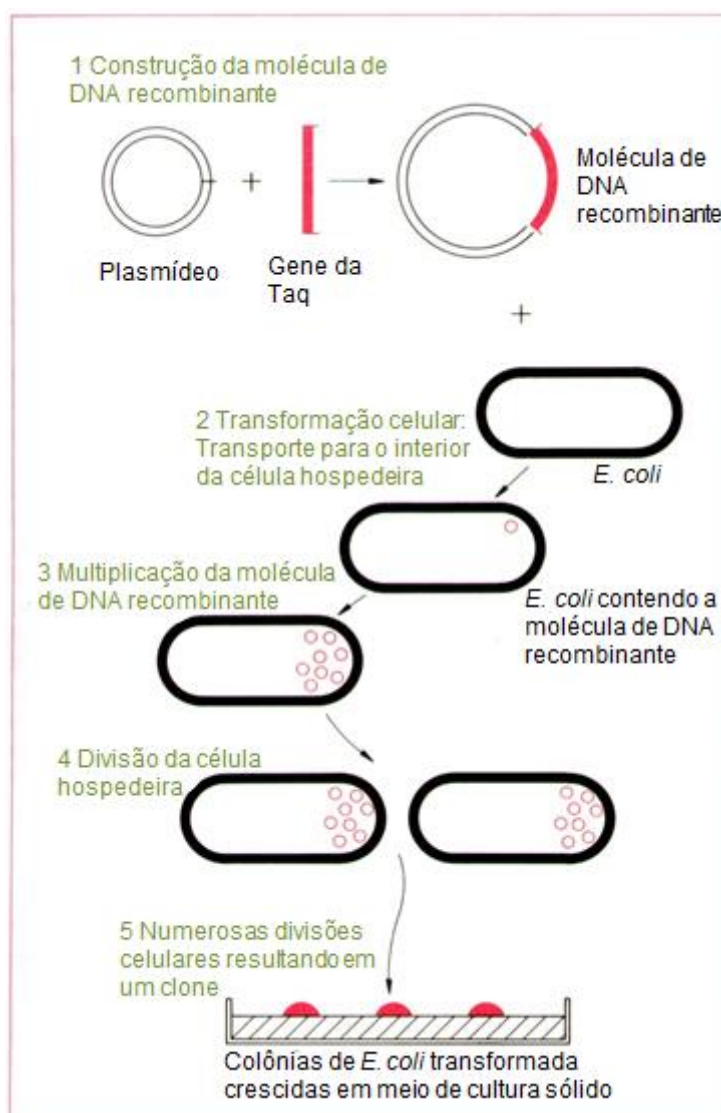
Há duas questões quanto à estabilidade do substrato celular: a geração consistente do produto de interesse e a retenção da capacidade de produção durante armazenamento. Geralmente, as células para produção são obtidas da expansão das células do BCT. O BCM pode ser usado para essa finalidade com uma justificativa apropriada (ICH, 1998).

O tipo de teste utilizado para avaliar se as células geram adequadamente o produto de interesse depende da natureza do substrato celular, dos métodos de cultivo e do produto. Para células contendo expressão de DNA recombinante, deve-se verificar a consistência da sequência que codifica a construção de expressão verificando a sequência nucleotídica do gene de interesse ou analisando a formação do produto. Pode-se também avaliar características morfológicas e perfil de crescimento (ICH, 1998).

## 2.2 CLONAGEM E EXPRESSÃO GÊNICA DA TAQ DNA POLIMERASE

DNA polimerases são enzimas que sintetizam uma nova fita de DNA, complementar a um molde de DNA ou RNA preexistente, na presença de iniciadores. A Taq DNA polimerase é um tipo de DNA Polimerase resistente à desnaturação por tratamento térmico, por ser originária da bactéria *Thermus aquaticus* (BROWN, 2003). Essa bactéria foi isolada pela primeira vez de uma fonte termal do Parque Nacional de Yellowstone, nos Estados Unidos, onde crescia otimamente a 70°C, sendo capaz de se desenvolver até 79°C (BROCK, 1997). A enzima Taq DNA polimerase, muitas vezes abreviada como Taq, é estável a temperaturas ainda maiores, o que a torna adequada para as reações em cadeia da polimerase (PCR), pois não perde sua atividade quando a temperatura é elevada a 94°C para desnaturar o DNA (BROWN, 2003).

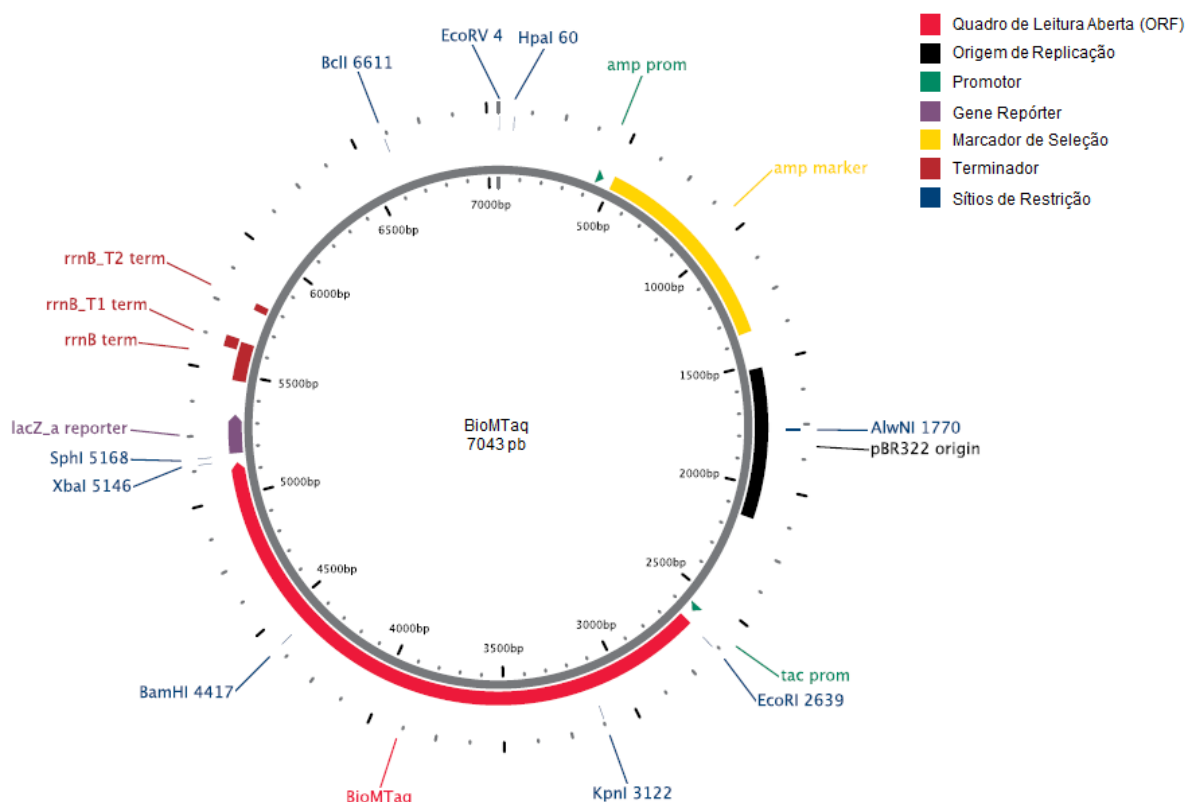
A tecnologia do DNA recombinante permitiu que a Taq DNA polimerase passasse a ser produzida a partir de uma bactéria mais conhecida e fácil de ser cultivada, a *Escherichia coli*. Isso foi possível ao isolar-se o gene da *Thermus aquaticus* responsável por expressar a enzima Taq DNA polimerase, inseri-lo em um vetor, transportar o vetor para o interior da *Escherichia coli*, dar condições para expressão da Taq na *E. coli* e por fim purificar a enzima, com maior rendimento que a obtida da *T. aquaticus* (LAWYER et al., 1989). O vetor citado é um plasmídeo, ou seja, uma molécula de DNA circular com existência independente na célula bacteriana. O transporte do plasmídeo para o interior da célula hospedeira de *E. coli* é denominado transformação celular. Ao cultivar a bactéria em condições adequadas para seu crescimento, o plasmídeo se multiplica produzindo cópias idênticas de si e do gene que ele carrega. Quando a célula hospedeira se divide, sua progênie recebe os plasmídeos, que devem manter sua replicação. Ao se passarem várias divisões celulares são produzidas colônias, ou clones, de células bacterianas supostamente idênticas. Idealmente, cada célula do clone possui uma ou mais cópias do gene de interesse. Esse processo é denominado clonagem gênica e está ilustrado na Figura 1 (BROWN, 2003).



**Figura 1 - Etapas da clonagem gênica em verde, e em preto a identificação dos esquemas**  
**Fonte: Adaptado de Brown, 2003.**

Os organismos possuem genes que são expressos constantemente e outros que podem ter a expressão regulada. Os primeiros são genes que codificam produtos necessários a todo momento para o metabolismo celular, tendo expressão gênica constitutiva. Outros produtos gênicos têm seus níveis celulares aumentados ou diminuídos em resposta a sinais moleculares, tendo expressão gênica regulada. Essa regulação pode ser tanto para indução quanto para repressão da expressão. O agrupamento de genes, promotor, operador e sequências adicionais que atuam na regulação da expressão é chamado de operon (NELSON e COX, 2011).

O plasmídeo pBioMTaq, cujo mapa está na Figura 2, foi construído para produção da enzima Taq DNA polimerase pelo IBMP e provém da transferência de tecnologia da empresa Qiagen (Hilden, Alemanha, 2009).



**Figura 2 - Mapa do plasmídeo pBioMTaq**

Fonte: Qiagen, 2009

Ele possui em sua sequência um operon para regulação da expressão do gene da Taq. A expressão é induzida quando se adiciona ao cultivo o composto químico isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido (IPTG) e deixa-o em condições de temperatura e agitação adequadas pelo tempo necessário para indução (QIAGEN, 2009). Na ausência de IPTG existe uma proteína repressora ligada ao operador que impede que a Taq seja transcrita e traduzida. Quando adicionado, o IPTG se liga a essa proteína repressora e faz com que ela se desligue do operador e permita que o gene da Taq seja expresso e a enzima Taq produzida (NELSON e COX, 2011).



### 2.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) consiste na amplificação exponencial de uma sequência específica de DNA. Suas aplicações incluem a obtenção de amostra pura de um gene individual, análises de DNA na ciência forense e diagnóstico de doenças (BROWN, 2003).

Para a reação, em tubo adiciona-se o conjunto de reagentes necessários para que ela ocorra, sendo eles nucleotídeos (dNTPs), cofator enzimático ( $Mg^{2+}$ ), água, iniciadores, material genético a ser amplificado e a enzima Taq DNA Polimerase. O tubo de reação é colocado no termociclador, um equipamento que realiza ciclos de temperatura pré-programados, permitindo que a PCR aconteça, conforme detalhado a seguir e ilustrado na Figura 3. Primeiro ocorre aquecimento a  $94^{\circ}C$  para desnaturar o DNA, fazendo com que a dupla fita se separe devido ao rompimento de pontes de hidrogênio. A mistura é então resfriada a  $50$  a  $60^{\circ}C$  para permitir o anelamento dos iniciadores. Estes, também chamados de *primers*, são duas pequenas moléculas de DNA, *forward* e *reverse*, que pareiam com as extremidades da fita de DNA que se deseja amplificar (DNA molde). O próximo aquecimento do ciclo vai até  $74^{\circ}C$ , temperatura considerada ótima para a atividade da Taq DNA Polimerase, que se liga na extremidade dos iniciadores e sintetiza novas fitas de DNA, complementares ao DNA molde. Isso compõe um ciclo. O ciclo seguinte se dá com a mesma sequência:  $94^{\circ}C$  de desnaturação,  $50$  a  $60^{\circ}C$  de anelamento,  $74^{\circ}C$  de síntese, e assim segue-se sucessivamente, até a quantidade de ciclos que tenha sido pré-programada. Com 25 ciclos são obtidas mais de 50 milhões de cópias do DNA molde (BROWN, 2003).

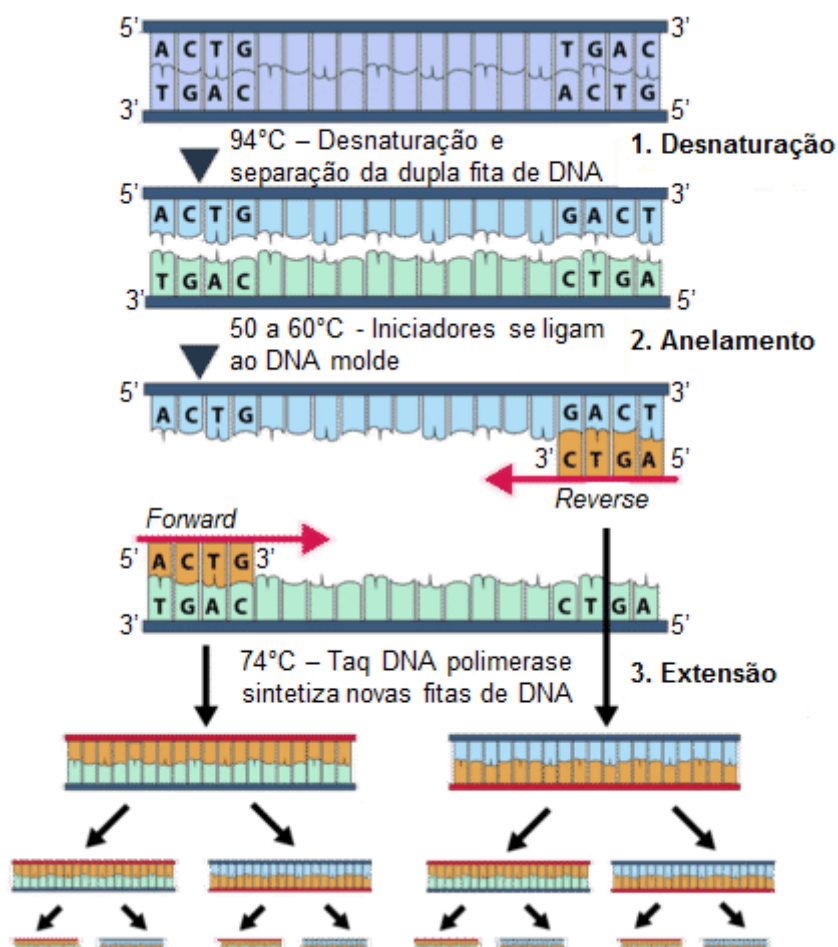


Figura 3 - Etapas da reação em cadeia da Polimerase (PCR)

Fonte: Adaptado de CK-12, 2016

Os testes moleculares são PCRs que permitem o diagnóstico de doenças ao amplificar uma sequência de genes do patógeno que tenha infectado o paciente. O plasma sanguíneo do paciente é processado e dele se extrai o DNA. A PCR é feita com os reagentes expostos anteriormente, usando como material genético o DNA extraído do plasma sanguíneo do paciente e iniciadores específicos para uma sequência genética do patógeno que se deseja identificar.

## 2.4 BANCO DE CÉLULAS NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS

Conforme o item 2.2, a Taq DNA polimerase pode ser produzida em *Escherichia coli* através da transformação da bactéria com plasmídeo que contém o gene da Taq, cultivo das células e indução com IPTG. Porém, a cada nova transformação muitas colônias são geradas (Figura 1). O cultivo de células é feito a partir de uma única colônia alçada da placa de Petri. Cada colônia é um clone e cada clone pode possuir um diferente número de cópias do plasmídeo. Isso porque o plasmídeo tem existência independente na célula e pode se replicar de forma diferente nos vários clones (BROWN, 2003). As células transformadas podem perder plasmídeos ou conter plasmídeos que tenham sido modificados ao longo das multiplicações celulares (OLD e PRIMROSE, 1981). Essa instabilidade plasmídica está elucidada no item 2.6.2. A produção da enzima dependerá do número de plasmídeos presente no clone, pois o gene que codifica a Taq está inserido nesses plasmídeos. Assim, a cada nova transformação se escolhe uma colônia diferente e a produção de Taq pode variar em qualidade e quantidade de enzima obtida.

A proposta de fabricação da Taq a partir de um banco de células é eliminar a variabilidade intrínseca à transformação realizada a cada novo lote de produção. O material genético utilizado para iniciar uma produção biotecnológica precisa ser confiável, contínuo e estável (GEIGERT, 2013). O banco de células é composto de muitos criotubos contendo células transformadas provindas de um único clone. Ao iniciar o cultivo celular de cada lote pela reativação de um criotubo congelado ao invés de usar uma colônia da nova transformação, tem-se a garantia de se estar trabalhando com o mesmo clone em todos os lotes. Assim, a produção da Taq pode ter maior homogeneidade e reprodutibilidade.

Um banco de células mestre (BCM) consiste em uma cultura celular derivada de uma única colônia completamente caracterizada, distribuída em vários criotubos que são acondicionados em condições adequadas para preservação. Tal cultura precisa ser capaz de produzir a enzima Taq. Um banco de células de trabalho (BCT), por sua vez, consiste em uma cultura de células preparada a partir de uma alíquota do BCM em condições de cultivo definidas e distribuída em vários criotubos adequadamente preservados. Os frascos de BCT são utilizados para iniciar a cultura de células na fabricação do produto (BRASIL, 2014).

### 2.4.1 Criopreservação

O elemento chave de um programa de preservação de células é a padronização dos métodos empregados para garantir a obtenção de resultados consistentes e comparáveis (SIMIONE, 2009).

A criopreservação é o método mais comumente utilizado para preservação de células em longo prazo. Culturas celulares adequadamente congeladas e armazenadas compõem bancos de células que formam a base da fabricação de produtos biotecnológicos. O objetivo da criopreservação é alcançar o nível de estase metabólica das células para suprimir qualquer alteração genética ou bioquímica que possa ocorrer enquanto estiverem armazenadas a baixas temperaturas (MOLDENHAUER, 2003).

A liofilização de microrganismos é outra forma de preservá-los por longos períodos. Consiste em remover água e outros solventes, de uma amostra aquosa congelada, por sublimação. O produto seco resultante precisa ser reconstituído com água antes de ser utilizado. A liofilização para preservação em longo prazo de células mais complexas não apresenta sucesso. É mais simples liofilizar células bacterianas Gram-positivas que Gram-negativas, presumivelmente devido às diferenças de estrutura de suas paredes celulares (SIMIONE e BROWN, 1991). Além disso, a liofilização apresenta alguns efeitos adversos que não são observados na criopreservação. Eles incluem potenciais alterações genéticas causadas pela quebra das fitas de DNA e seleção de mutantes, desnaturação de proteínas susceptíveis e queda na viabilidade de muitos tipos de células bacterianas. A liofilização é mais trabalhosa e requer equipamentos e protocolos mais complexos que a criopreservação. O uso de temperatura para preservar e armazenar culturas é universalmente mais simples e geralmente mais robusto para manutenção de muitos tipos de células (MOLDENHAUER, 2003).

Quanto mais baixa a temperatura de armazenamento das células, por mais tempo elas permanecem viáveis (SIMIONE, 2009). O nitrogênio líquido fornece as temperaturas mais baixas (-196°C) para armazenamento de muitos tipos de microrganismos. É um método extensivamente utilizado por manter a viabilidade celular bem preservada. Entretanto, devido ao seu custo relativamente elevado,

utilizam-se temperaturas mais elevadas, como  $-70^{\circ}\text{C}$ , que é suficientemente baixa para preservar a maioria dos microrganismos (HECKLY, 1978).

Geralmente, quanto maior a viabilidade celular antes de ser congelada, melhor a sua recuperação no descongelamento. Para a maioria das bactérias e fungos são requeridas aproximadamente  $10^7$  células por mililitro para assegurar uma adequada recuperação (SIMIONE e BROWN, 1991).

São utilizados em criopreservação pequenos recipientes para armazenamento de células, chamados de criotubos, como ampolas de vidro selado a fogo e *vials* plásticos com tampa de rosquear. Os tamanhos mais comuns são criotubos de 1,2 a 2,0 mL, os quais geralmente são preenchidos com 0,5 a 1,0 mL de suspensão celular (SIMIONE, 2009).

Agentes crioprotetores são substâncias adicionadas às culturas celulares para protegê-las de danos durante o congelamento, armazenamento e descongelamento. Sua eficácia é resultado direto de sua alta solubilidade em água e da habilidade de manter essa propriedade em temperaturas muito baixas. Dessa forma, um crioprotetor induz uma profunda queda no ponto de congelamento da solução biológica. Um crioprotetor efetivo deve permear facilmente as membranas celulares e se difundir rapidamente. Adicionalmente, deve ter baixa toxicidade nas concentrações de uso (MOLDENHAUER, 2003). O glicerol e o dimetilsulfóxido (DMSO) são amplamente utilizados e tradicionalmente são considerados os mais efetivos agentes para preservação de células vivas e organismos. Para a maioria das células, o glicerol é o agente escolhido por ser menos tóxico que o DMSO. Outros crioprotetores por vezes utilizados são polietileno glicol, propileno glicol, glicerina, polivinilpirrolidona, sorbitol, dextran e trealose (SIMIONE, 2009).

O tempo entre a mistura do crioprotetor com a cultura celular e o início do processo de congelamento é chamado de período de equilíbrio. Para a maioria das células, o período de equilíbrio deve durar pelo menos 15 minutos, não podendo passar de 45 a 60 minutos, pois os crioprotetores podem ser tóxicos às células se este período for muito longo (SIMIONE, 2009).

Uma vez que as células tenham sido combinadas com um agente crioprotetor e dispensadas em criotubos, a próxima etapa é o congelamento. A velocidade com que a temperatura é reduzida controla a difusão de água através da membrana celular e, com isso, determina a taxa com que a água é convertida em

gelo e a alteração na concentração de solutos no meio extracelular. O congelamento precisa ser lento o suficiente para prevenir a geração de gelo intracelular e, ao mesmo tempo, rápido o suficiente para minimizar a exposição das células ao efeito prejudicial do meio hipertônico (MOLDENHAUER, 2003). Diferentes tipos de células requerem diferentes taxas de congelamento, mas uma queda uniforme de 1°C por minuto a partir da temperatura ambiente tem sido adequada para uma grande variedade de células e organismos. Quanto maiores e mais complexas as células, mais crítico é o processo de congelamento. A maioria das bactérias tolera ser diretamente posta a -80°C, sem a lenta taxa de congelamento ideal (SIMIONE, 2009).

Em congelamentos rápidos são formados cristais de gelo normalmente pequenos ou até mesmo indetectáveis em microscópio eletrônico. Entretanto, esses cristais de gelo submicroscópicos são termodinamicamente instáveis em relação aos cristais maiores. Por isso, se o descongelamento for lento eles tendem a se agregar formando cristais de gelo maiores, num processo de recristalização que pode danificar as células. Esse processo pode ser evitado ao se adotar o descongelamento rápido, colocando os criotubos congelados diretamente em banho de incubação a 37°C (MOLDENHAUER, 2003; MEZA et al, 2004; TEDESCHI e PAOLI, 2011). A suspensão celular descongelada deve ser transferida o mais rápido possível para o meio de cultura fresco, a fim de evitar a exposição aos efeitos tóxicos do agente crioprotetor (SIMIONE, 2009).

#### 2.4.2 Banco de Células Mestre

O Banco de Células Mestre (BCM) foi estabelecido em 2012 na empresa parceira do IBMP, o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), uma das unidades da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) (PACHECO, 2013). Para o estabelecimento, foi feita a transformação por eletroporação da célula bacteriana de *Escherichia coli* INV $\alpha$ F' (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) com o plasmídeo pBioMTaq, seguida da avaliação do plasmídeo por análise de restrição, PCR, extração e dosagem do DNA plasmidial. Fez-se o cultivo de 10 diferentes clones e testes de cinética de crescimento e indução da expressão da Taq para selecionar um deles para compor o BCM. A cultura preparatória do clone selecionado foi aliqüotada em

200 criotubos contendo glicerol 50%, que foram congelados com etanol absoluto e gelo seco, e armazenados em ultrafreezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ , originando o BCM (PACHECO, 2013).

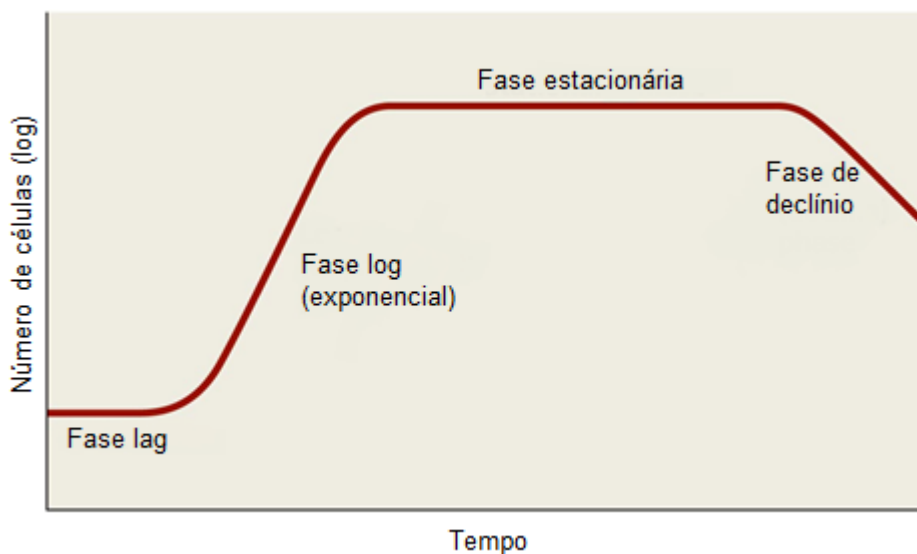
O estudo de estabilidade foi feito no mês do estabelecimento e no quinto, oitavo e décimo primeiro meses posteriores. Foram realizados testes de viabilidade celular, estabilidade plasmídica e indução da expressão da Taq DNA polimerase. O BCM se manteve estável até 11 meses após o seu estabelecimento (PACHECO, 2013).

## 2.5 ESTABELECIMENTO DO BANCO DE CÉLULAS DE TRABALHO

O Banco de Células de Trabalho (BCT) foi estabelecido no IBMP a partir de um criotubo do BCM de Bio-Manguinhos. Portanto, a célula utilizada foi a de *Escherichia coli* INV $\alpha$ F' transformada por eletroporação pelo plasmídeo pBioMTaq. Foram avaliados 10 clones do BCM para eleger um deles para compor o BCT. Os testes realizados foram: cinética de crescimento, indução da expressão da Taq, extração e dosagem do DNA plasmidial, e análise de restrição.

### 2.5.1 Cinética de Crescimento

As bactérias idealmente devem passar pelas seguintes fases de crescimento: lag, com pouca ou nenhuma divisão celular por estarem se adaptando ao meio de cultivo; log, período de crescimento logarítmico; estacionária, na qual o número de células que morrem é equivalente ao número de células novas; e de declínio, em que o número de células mortas excede o de novas. Durante a fase log há maior atividade metabólica e, portanto, maior produção e expressão de proteínas (TORTORA, 2012). O Gráfico 1 mostra a curva de crescimento bacteriano com as quatro fases típicas de crescimento ao longo do tempo. No eixo y está o número de células em escala logarítmica. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2010) somente culturas de células que estão predominantemente em fase log devem ser usadas para estabelecimento de banco de células.



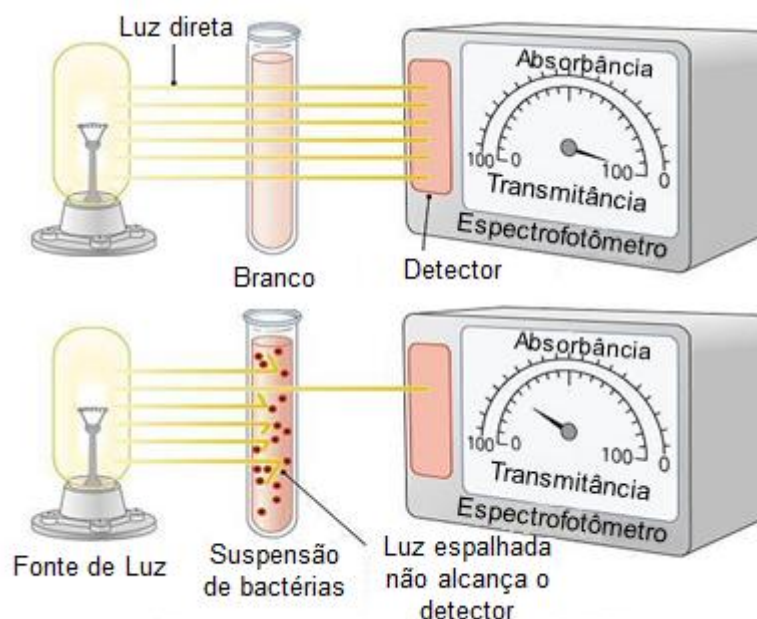
**Gráfico 1 - Curva de crescimento bacteriano com as quatro fases típicas de crescimento**

Fonte: Adaptado de PGCC, 2016

O tempo de duplicação normal da *Escherichia coli* INVαF' transformada com pBioMTaq é de 40 minutos, assim, a taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) ideal é de 0,05/min e o crescimento é considerado satisfatório para  $\mu$  superiores a 0,04/min (QIAGEN, 2009).

A medição da turbidez da cultura é um método para acompanhamento do crescimento das células bacterianas, pois quando elas se multiplicam o meio líquido se torna túrbido devido à alta densidade celular. As medições são feitas em espectrofotômetro, no qual um feixe de luz é transmitido através da suspensão bacteriana para uma célula fotoelétrica. Com o crescimento bacteriano menos luz atinge a célula fotoelétrica e essa alteração é registrada na escala do equipamento como transmitância, ou seja, a porcentagem de transmissão da luz. A partir da transmitância o espectrofotômetro fornece a absorbância, também denominada densidade óptica (DO) da amostra (TORTORA, 2012). A Figura 4 apresenta um esquema da transmitância e absorbância. O branco é o meio de cultura líquido não inoculado, portanto, sem nenhuma célula bacteriana, utilizado para configurar no espectrofotômetro o que se deseja considerar como absorbância zero. Um comprimento de onda frequentemente usado para medição da DO de suspensões de células de bactérias ou leveduras é 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) (MATLOCK et al, 2013).





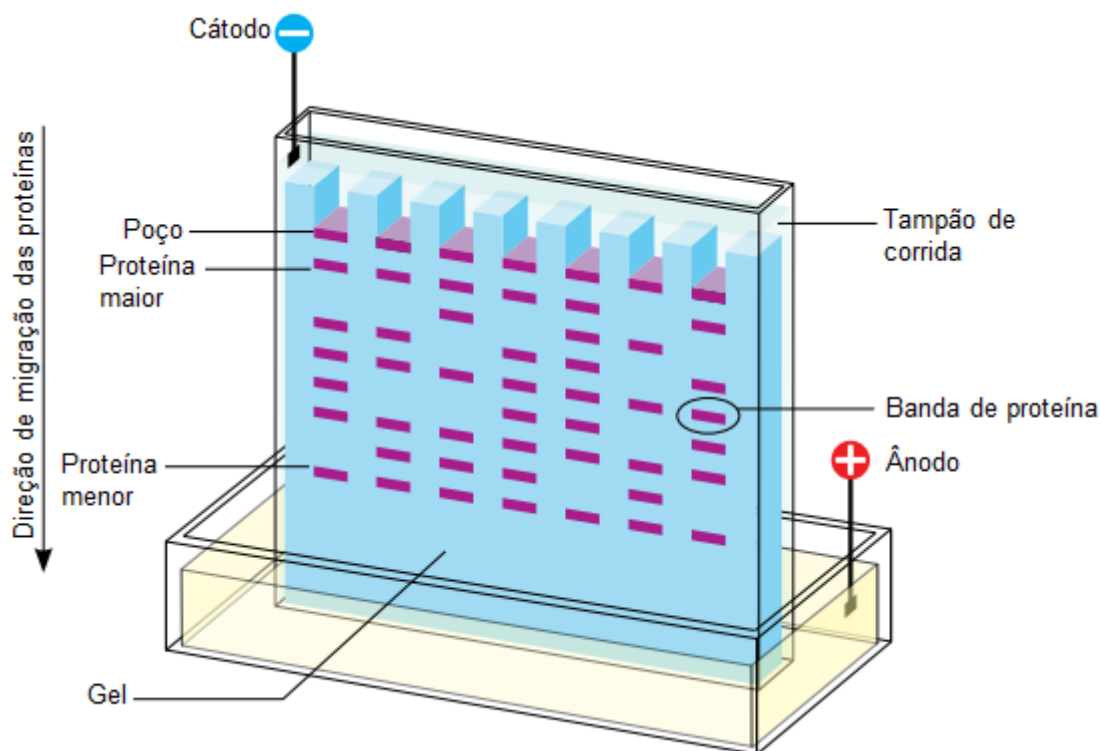
**Figura 4 - Esquema de medição de transmitância e absorvância na suspensão bacteriana**  
**Fonte: Adaptado de TORTORA, 2012**

O objetivo do teste de cinética de crescimento do BCT é avaliar a multiplicação da cultura a fim de comprovar que as células estão atingindo a fase exponencial de crescimento (fase log) com tempos similares ao longo dos meses, e com taxa específica de crescimento superior a 0,04/min.

### 2.5.2 Indução da Expressão da Enzima Taq DNA Polimerase

A indução da expressão da enzima Taq é feita com a adição do IPTG ao meio de cultura e com a incubação em condições de temperatura e agitação adequadas para a bactéria pelo tempo necessário para a indução.

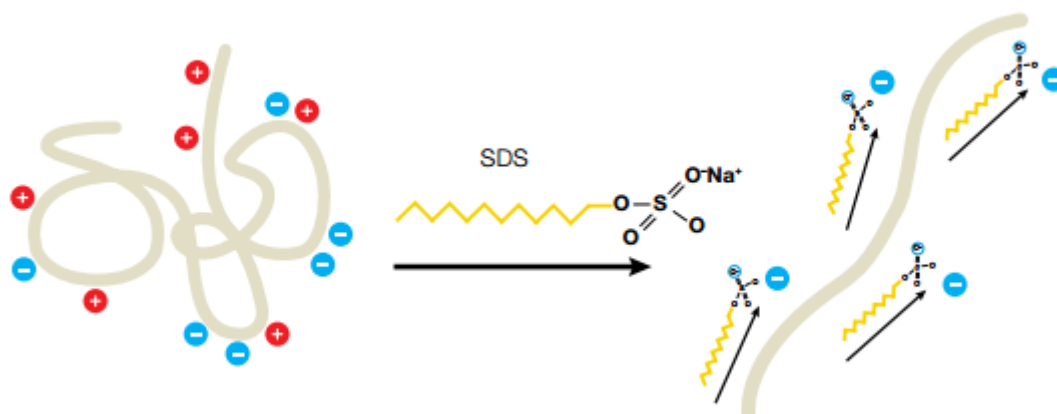
Para analisar se a indução foi eficiente, o cultivo é preparado e analisado em eletroforese de gel de poliácridamida desnaturante, SDS-PAGE. O termo PAGE vem do inglês *polyacrylamide gel electrophoresis* e SDS é o detergente dodecil sulfato de sódio. A eletroforese se refere ao movimento de moléculas carregadas em resposta a um campo elétrico, resultando na separação delas. No campo elétrico, as proteínas se movem em direção ao eletrodo de carga oposta (BIO-RAD, 2016). A Figura 5 apresenta um esquema do sistema de eletroforese.



**Figura 5 - Esquema do sistema de eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida**

Fonte: Adaptado de Bio-Rad, 2016

Além da carga, a migração de uma proteína depende também de sua forma e sua massa molecular. Na literatura, ocasionalmente, faz-se referência à massa utilizando o termo “tamanho” como apresentado na Figura 5. O uso do SDS durante o preparo das amostras é uma forma de eliminar o efeito da carga e da forma na migração das proteínas, enfatizando a massa molecular. O SDS liga-se à maioria das proteínas em quantidades aproximadamente proporcionais à massa molecular delas, contribuindo com uma grande carga negativa. Assim, a carga intrínseca da proteína se torna insignificante e a relação carga-massa torna-se predominante. Ademais, a ligação ao SDS desdobra parcialmente as proteínas, deixando-as com formas similares. O ditioneitol (DTT) ou outro agente redutor também é comumente utilizado por atuar no desdobramento das proteínas ao romper suas pontes dissulfeto. Com isso, a eletroforese com SDS separa as proteínas quase que exclusivamente com base em seus tamanhos (massas moleculares). A Figura 6 ilustra o efeito do SDS na forma e na carga da proteína. O gel de poliacrilamida atua como uma peneira molecular, retardando a migração de proteínas maiores e permitindo passagem mais rápida das proteínas pequenas. Elas são visualizadas em forma de bandas após serem coradas (NELSON e COX, 2011).



**Figura 6 - Efeito do detergente SDS na forma e na carga da proteína**

Fonte: Bio-Rad, 2016

O preparo dos cultivos para serem aplicados em SDS-PAGE inclui desnaturação das proteínas pelos componentes do tampão de amostra para proteína e pelo calor. O tampão costuma conter SDS, um agente redutor (como DTT ou  $\beta$ -mercaptoetanol), glicerol e corante. Glicerol é adicionado por ser mais denso que a água e fazer com que as amostras afundem no poço do gel imerso em tampão. O corante normalmente usado é azul de bromofenol, pois ele possui baixa massa molecular e migra à frente, permitindo acompanhamento visual da eletroforese. A amostra é misturada ao tampão e incubada a  $95^{\circ}\text{C}$  por cinco minutos para completar o rompimento das interações moleculares (BIO-RAD, 2016).

O gel é colocado em uma cuba entre dois eletrodos. A força motriz da migração de proteínas é a tensão elétrica ( $V$ , em volts) aplicada entre os eletrodos. Ela leva a um fluxo de corrente ( $I$ , em amperes) através do gel, que possui uma resistência intrínseca ( $R$ , em ohms). A lei de Ohm descreve a mútua dependência desses três parâmetros, de acordo com a equação (1):

$$R = \frac{V}{I} \quad (1)$$

É possível configurar na fonte de eletroforese a tensão e a corrente que se deseja utilizar, sendo que uma delas é configurada para permanecer constante durante a corrida. A resistência, entretanto, é inerente ao sistema e não permanece constante (BIO-RAD, 2016).

O campo elétrico (E) entre os dois eletrodos, considerado aqui um campo elétrico uniforme, é um importante parâmetro na eletroforese por determinar indiretamente a taxa de migração dos componentes da amostra ao longo de uma distância (D) que separa o cátodo do ânodo, de acordo com a equação (2).

$$E = \frac{V}{D} \quad (2)$$

A intensidade de campo elétrico é fornecida em newton por coulomb (N/C) ou volt por metro (V/m). No entanto, considerando as dimensões de um equipamento de eletroforese biomolecular, esta grandeza é tipicamente fornecida em V/cm.

A maioria das eletroforeses de proteína é operada com força do campo elétrico de 10 a 20 V/cm (BIO-RAD, 2016). Como a força do campo elétrico gerada entre dois eletrodos é função do meio que os separa, ela pode ser modificada pelo calor produzido durante a eletroforese devido ao efeito Joule. Esse efeito pode levar a distorções e aumento de difusão das bandas proteicas.

Em sistemas descontínuos como é o da SDS-PAGE, a resistência aumenta com o progresso da corrida. Com tensão elétrica constante, a corrente e a potência diminuem conforme a resistência aumenta. Isso leva a um aumento no tempo da corrida, que permite que as proteínas se espalhem mais no gel. Com a corrente constante, a tensão elétrica, a potência e consequentemente o efeito Joule aumentam durante a eletroforese, resultando em corridas mais curtas, porém, mais aquecidas que as de tensão elétrica constante. Por isso, costuma-se preferir o uso de tensão elétrica constante. Adicionalmente, para promover ainda mais a separação das proteínas, pode-se configurar uma tensão elétrica menor, que faz com que o tempo de corrida seja ainda maior e as proteínas se separem mais (BIO-RAD, 2016).

O objetivo da eletroforese SDS-PAGE nos testes do BCT é verificar se há expressão da enzima BioMTaq, que possui massa molecular de aproximadamente 95 quilodaltons (kDa). Para isso, além das amostras induzida e não induzida, aplica-se também no gel um marcador de peso molecular e uma amostra de Taq DNA Polimerase referência.

### 2.5.3 Extração e Dosagem do DNA Plasmidial

Para ser adequada para passar pelo procedimento de extração plasmidial, a cultura bacteriana deve estar em sua fase logarítmica de crescimento, ou no início da fase estacionária. O uso de células antes disso pode gerar baixos rendimentos de DNA plasmidial extraído devido à baixa densidade celular. Já o uso de células em fases mais avançadas pode resultar em qualidade e rendimento baixos, devido à degradação do DNA das células mais antigas (QIAGEN, 2016).

A extração do DNA plasmidial do BCT é feita utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Hilden, Alemanha), que se baseia na lise alcalina e clarificação das células, seguida da adsorção do DNA em colunas com membrana de sílica, na presença de alta concentração salina, lavagens da coluna e por fim eluição do DNA (QIAGEN, 2015).

Inicialmente, a cultura é centrifugada, para que as células sedimentem, e o sobrenadante é descartado. O *pellet* de células pode ser congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para ser posteriormente processado. A lise alcalina é o método mais comumente utilizado na purificação plasmidial de células bacterianas (BIRNBOIM e DOLY, 1979; BIRNBOIM, 1983). Ela envolve quatro etapas (Figura 7). A primeira é a ressuspensão do pellet de células em tampão Tris-EDTA contendo RNase A. A segunda é a lise celular propriamente dita, com uso da base hidróxido de sódio (NaOH) e do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS). O SDS solubiliza os fosfolipídeos e proteínas na membrana células, levando à lise e liberação do conteúdo celular. O NaOH desnatura o DNA cromossômico e o DNA plasmidial, assim como as proteínas. A presença de RNase A garante que o RNA celular liberado é digerido durante a lise. Essa etapa precisa ser feita rapidamente para que não ocorra desnaturação irreversível dos plasmídeos. A terceira etapa é a neutralização do lisado pela adição do sal acetato de potássio (KAc). A alta concentração salina faz com que o dodecil sulfato de potássio (KDS) formado precipite, e haja coprecipitação de proteínas e DNA cromossômico desnaturados, juntamente com debris celulares, no complexo insolúvel de sal-detergente. O DNA plasmidial, entretanto, sendo circular e covalentemente fechado, renatura corretamente e permanece em solução. A quarta etapa é clarificar o lisado neutralizado, o que é feito por centrifugação. O lisado clarificado é transferido para uma coluna com membrana de sílica. Conforme a

Figura 8, os ácidos nucleicos são adsorvidos à membrana na presença de sais caotrópicos, que removem água das moléculas hidratadas em solução. Polissacarídeos e proteínas não adsorvem e são removidos nas etapas de lavagem da coluna, com alta concentração de sal e/ou etanol. O DNA plasmidial é eluído com tampão de baixa ou nula concentração salina (QIAGEN, 2016).

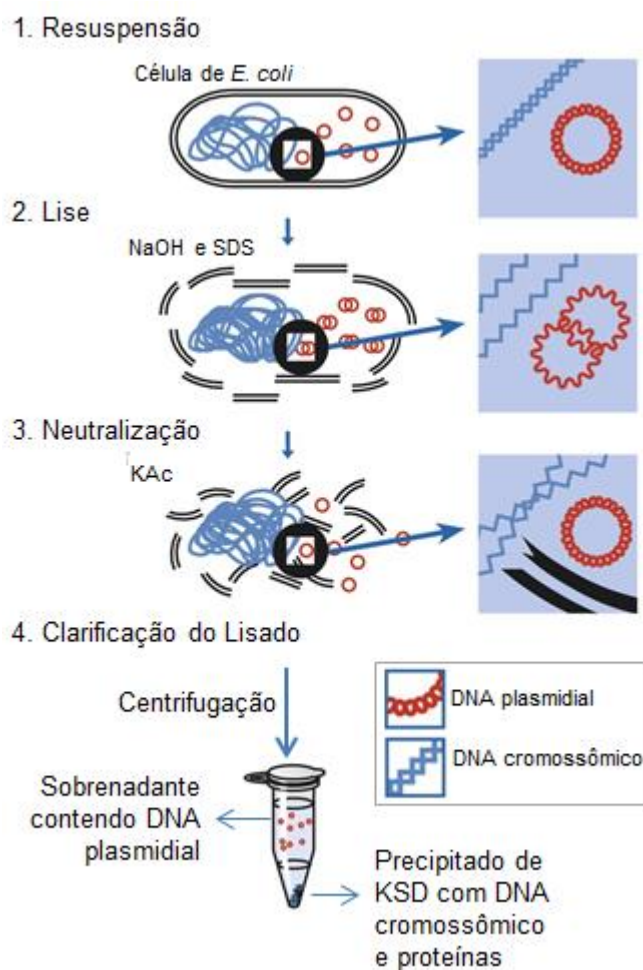
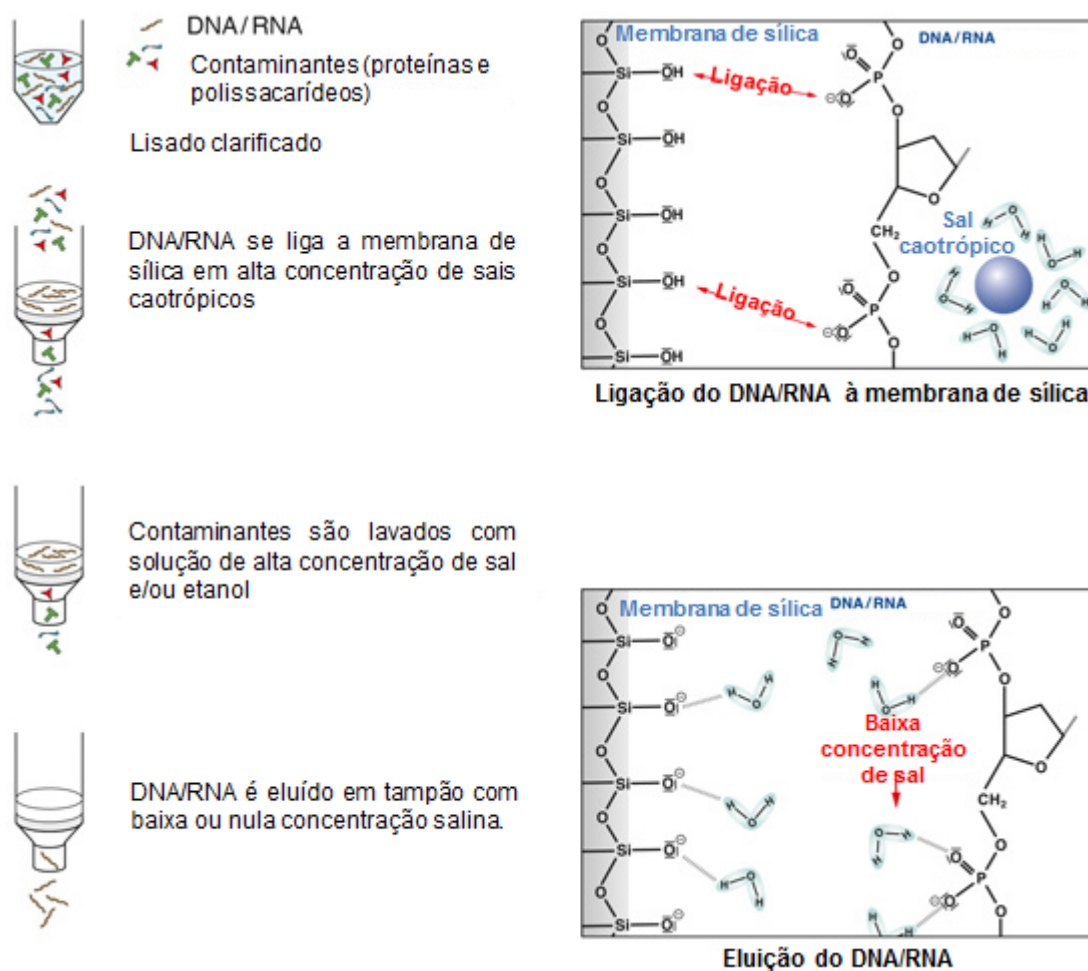


Figura 7 - Esquema da lise alcalina de *Escherichia coli*

Fonte: Adaptado de Qiagen, 2016



**Figura 8 - Princípio de purificação de ácidos nucleicos em membrana de sílica**

Fonte: Adaptado de mn-net, 2016

As concentrações de DNA e RNA (ácido ribonucleico) são determinadas pela absorvância a 260 nm ( $A_{260}$ ) em espectrofotômetro. Para que se tenha precisão nas medições, as leituras a 260 nm devem ficar entre 0,15 e 1,0, sendo que para isso pode ser necessário realizar diluições do DNA a ser medido. Para DNA dupla fita em pH neutro, uma unidade de absorvância  $A_{260}$  equivale a 50 ng/ $\mu$ L (QIAGEN, 2016). A dosagem do DNA plasmidial do BCT é feita em espectrofotômetro NanoVue Plus™ (Biochrom US, Holliston MA, EUA).

Análise de restrição e avaliação plasmidial são dois testes utilizados no estabelecimento e estudo de estabilidade do BCT, que serão abordados na sequência. Na análise de restrição utiliza-se o plasmídeo a 100 ng/ $\mu$ L e na avaliação plasmidial a 200 ng/ $\mu$ L. Para o processo de transformação, segundo protocolo da transferência de tecnologia da empresa Qiagen (Hilden, Alemanha), a concentração

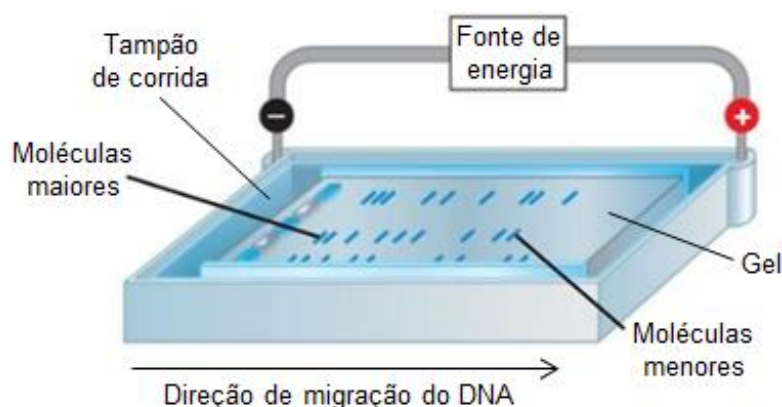
do plasmídeo usado é de 100 ng/ $\mu$ L (QIAGEN, 2009). Assim, padroniza-se que a concentração mínima aceitável para plasmídeos extraídos do BCT é 100 ng/ $\mu$ L.

#### 2.5.4 Análise de Restrição

Endonucleases são enzimas que quebram ligações fosfodiéster no interior da molécula de DNA. Endonucleases de restrição do tipo II clivam apenas nas sequências de reconhecimento, chamadas também de sítios-alvo ou sítios de restrição, e deixam as outras sequências intocadas (BROWN, 2003).

*In vivo*, o DNA plasmidial é circular e superenovelado (*supercoiled*) para que possa se encaixar no interior da célula. Em laboratório, após uma preparação plasmidial, o DNA permanece majoritariamente superenovelado, mas certa quantidade passa a ser linear (WAGENINGEN, 2016).

A eletroforese em gel de agarose para separação de moléculas de DNA (Figura 9) tem o mesmo princípio da eletroforese em gel de poliacrilamida para separação de proteínas, discutida no item 2.5.2. A concentração de agarose utilizada depende do tamanho dos fragmentos de DNA a serem analisados. Géis com baixa concentração de agarose possuem poros mais largos e são usados para separar grandes fragmentos de DNA enquanto que géis com alta concentração de agarose e poros mais estreitos permitem a separação de pequenos fragmentos de DNA (QIAGEN, 2016).

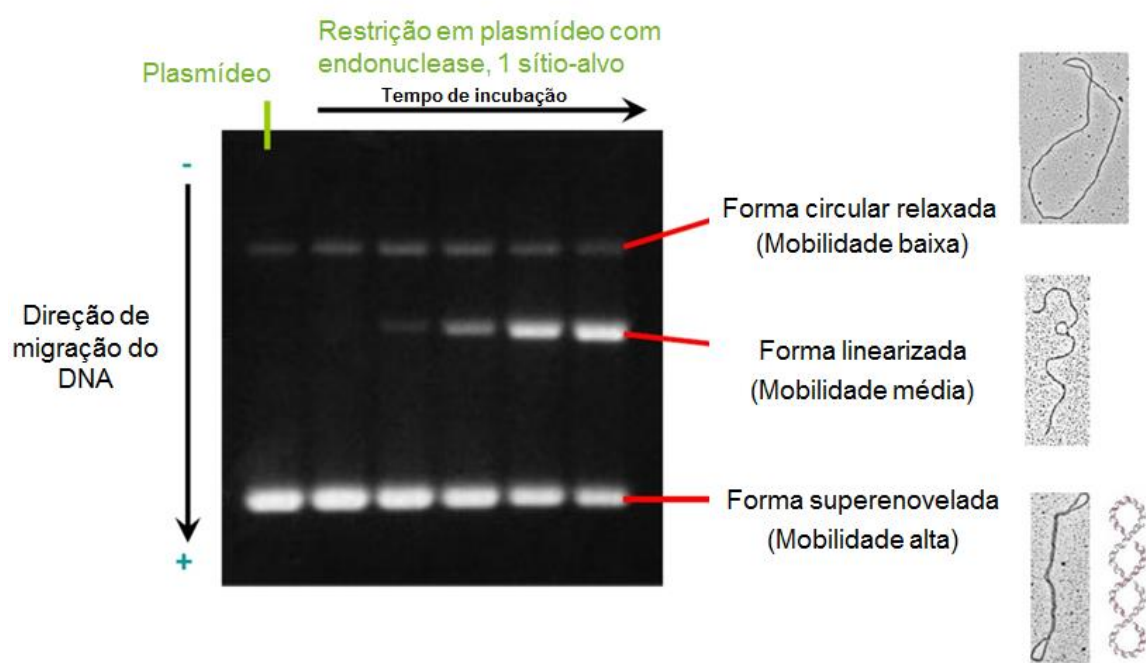


**Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose para separação de moléculas de DNA**

Fonte: Adaptado de Decoding DNA, 2016



A mobilidade eletroforética de moléculas de DNA é definida não apenas pelo número de pares de base (tamanho), mas também por sua forma. Um DNA plasmidial circular superenovelado possui uma estrutura compacta e por isso seu tamanho hidrodinâmico é muito menor, o que leva a uma mobilidade eletroforética muito maior que a de moléculas de DNA linear com mesmo número de pares de base. Há também a forma circular relaxada, que tem mobilidade eletroforética ainda menor que a forma linear, de acordo com o ilustrado na Figura 10 (KOVÁCS, 2013).



**Figura 10 - Migração das diferentes formas de DNA em gel de eletroforese**

Fonte: Adaptado de Kovács (2013)

O tratamento com uma enzima de restrição que clive em apenas um sítio gera uma forma linearizada do plasmídeo, que tem mobilidade média. A digestão com duas enzimas de restrição, portanto em duas sequências de reconhecimento, gera dois fragmentos de DNA linearizado. Além disso, pode restar uma quantidade de DNA que não foi completamente digerido, esta também fica linearizada (KOVÁCS, 2013).

A análise de restrição consiste em submeter o plasmídeo pBioMTaq, previamente extraído das células do BCT por Minipreparação Plasmidial, a uma digestão com as endonucleases de restrição EcoRI e XbaI. O objetivo do teste é verificar se o plasmídeo se mantém íntegro, através da eletroforese em gel de

agarose para a análise dos fragmentos gerados após a reação com as enzimas de restrição.

O plasmídeo pBioMTaq possui 7043 pb (Figura 2). As enzimas de restrição EcoRI e XbaI clivam nas extremidades do gene da BioMTaq, sendo que o sítio de restrição da EcoRI está em 2639 pb e da XbaI em 5146 pb. Portanto, ao clivar o plasmídeo pBioMTaq com essas enzimas, espera-se que haja liberação de dois fragmentos, um deles com 2507 pb (correspondente ao gene que codifica para a BioMTaq) e outro de 4536 pb, região complementar. O resultado das amostras incubadas com EcoRI e XbaI pode também apresentar migração de banda com tamanho de 7043 pb, que corresponde aos plasmídeos que não foram completamente digeridos. Nos controles negativos, espera-se a migração do DNA super enovelado na altura de aproximadamente 4500 pb.

## 2.6 CARACTERIZAÇÃO DO BANCO DE CÉLULAS DE TRABALHO

A caracterização do banco de células de trabalho aqui descrita consiste na avaliação mensal da estabilidade das células, através da realização dos testes apresentados para estabelecimento do BCT, com acréscimo dos seguintes: viabilidade celular, estabilidade plasmídica e avaliação plasmidial. Os próximos itens fundamentam os testes, com princípios e objetivos.

### 2.6.1 Viabilidade Celular

As células bacterianas perdem sua viabilidade celular, ou seja, sua capacidade de se reproduzirem e realizarem seu metabolismo normal, em decorrência de alterações no ambiente, como na temperatura, pH, pressão, fornecimento de fonte de energia entre outros fatores (DeCS, 2016). O método utilizado para congelamento e descongelamento das células pode afetar grandemente a sua viabilidade, conforme discutido no item 2.4.1. A queda na viabilidade celular pode afetar a capacidade de produção do produto de interesse. Por isso, é fundamental determinar a viabilidade celular do BCT e permanecer avaliando-a durante o estudo de estabilidade.

O teste realizado consiste em plaquear uma diluição seriada do BCT em meio Luria-Bertani (LB) agar com ampicilina. Como o plasmídeo de interesse possui em sua sequência um gene que lhe confere resistência à ampicilina, somente as células que contêm o plasmídeo são aptas a crescer nesse meio de cultura. O crescimento de unidades formadoras de colônias (UFC), portanto, comprova a identidade das células e sua pureza. O número de UFC crescidas e o fator de diluição utilizado permitem o cálculo da viabilidade celular, através da equação (3):

$$\text{Viabilidade Celular} \left( \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Média de UFCs}}{\text{Volume plaqueado} (\mu\text{L})} \cdot \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} \cdot (\text{fator de diluição}) \quad (3)$$

Em média  $10^7$  UFC/mL são requeridas para assegurar uma adequada recuperação após o descongelamento de bactérias (SIMIONE e BROWN, 1991).

Assim, a obtenção de viabilidade celular na ordem de grandeza de  $10^6$  UFC/mL ou superior é considerada satisfatória (MEZA et al, 2004).

### 2.6.2 Estabilidade Plasmídica

As células transformadas podem perder plasmídeos ou conter plasmídeos que tenham sido modificados ao longo das multiplicações celulares. Essa instabilidade plasmidial afeta diretamente a produção da proteína desejada, que depende da presença de plasmídeos íntegros no interior das células. Há a instabilidade plasmidial estrutural e a segregacional. A estrutural é causada pela deleção, inserção, recombinação ou outros eventos, ao nível de DNA; enquanto que a instabilidade segregacional é ocasionada pela partição desigual de plasmídeos durante a divisão celular (OLD e PRIMROSE, 1981). Depois que o plasmídeo é inserido na célula bacteriana, fatores genéticos e ambientais podem ocasionar sua expulsão ou alteração. Como fatores genéticos tem-se o arranjo do plasmídeo, número de cópias, nível de expressão, marca seletiva, propriedades das células hospedeiras. Alguns fatores ambientais são a formulação do meio de cultura, a quantidade de oxigênio dissolvido, a temperatura, o pH e a taxa de diluição. Assim, as interações entre plasmídeo e célula determinam a instabilidade plasmidial e o grau de expressão dos genes clonados (MÔO-YOUNG et al., 1996).

O teste de estabilidade plasmídica objetiva assegurar que o plasmídeo se mantém estável no interior das células e capaz de se replicar. Pacheco (2013) apresenta o método para determinação da estabilidade plasmídica utilizado durante o estabelecimento e estudo de estabilidade do Banco de Células Mestre. Ele consiste em cultivar um criotubo em meio de cultura acrescido de ampicilina, realizar uma diluição seriada desse cultivo e plaquear em placas de Petri com meio de cultura sólido com e sem ampicilina. A estabilidade plasmídica é determinada pela relação da quantidade de UFC crescidas em cada uma das placas, utilizando a equação (4).

$$\text{Estabilidade Plasmídica (\%)} = \frac{50 \text{ UFC crescidas em LB amp}}{50 \text{ UFC crescidas em LB}} \cdot 100 \quad (4)$$

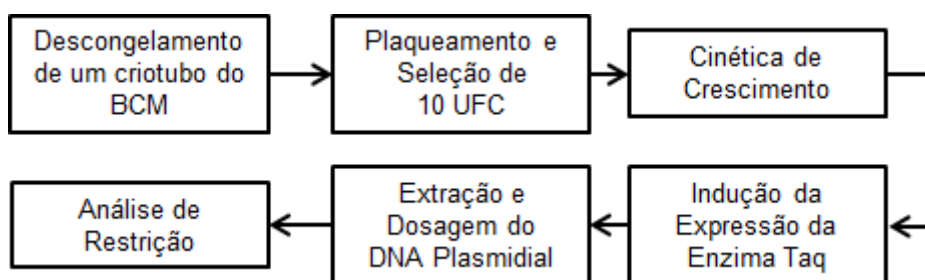
Outra técnica para avaliar a estabilidade plasmídica é o *Picking and Patching colonies* (KOENIG, 2003 e BISEN, 2014), menos sujeita a erros de procedimento, como pipetagem imprecisa ou falta de homogeneidade na diluição. Esta técnica consiste em, partindo de uma placa com colônias crescidas em meio de cultura sólido sem marcador de seleção, alçar um determinado número de UFC, uma a uma, e transferi-las para outras duas placas: uma contendo meio de cultura sólido com ampicilina e outra sem. A estabilidade plasmídica é calculada através da equação (4), acima descrita.

De acordo com Pacheco (2013), a estabilidade plasmídica deve ser superior a 85%. Ao longo dos meses de caracterização das células, foram utilizados os dois métodos citados, conforme detalhado no capítulo Metodologia, item 3.2.4.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 ESTABELECIMENTO DO BANCO DE CÉLULAS DE TRABALHO

O fluxograma ilustrado no Gráfico 2 apresenta a sequência dos testes realizados durante o estabelecimento do BCT.



**Gráfico 2 - Fluxograma dos testes realizados durante o estabelecimento do banco de células de trabalho**

**Fonte: Autoria própria**

##### 3.1.1 Abertura do Banco de Células Mestre

A abertura do BCM consistiu em descongelar um criotubo do Banco de Células Mestre de Bio-Manguinhos contendo 1 mL de cultura com glicerol 25% (500  $\mu$ L de cultura e 500  $\mu$ L de glicerol 50%). Para o descongelamento, o criotubo foi retirado do ultrafreezer (-80°C) e mantido por 25 minutos em caixa térmica com gelo seco e por 15 minutos em caixa térmica com gelo normal.

Foi realizado o espalhamento em placas de Petri contendo meio LB amp, dos seguintes volumes de cultura: 5  $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 30  $\mu$ L, 40  $\mu$ L, 50  $\mu$ L e 100  $\mu$ L. O plaqueamento de diferentes volumes teve como finalidade obter uma placa da qual se pudesse coletar 10 colônias bem distribuídas e isoladas, a serem avaliadas para eleição de uma delas para compor o Banco de Células de Trabalho (BCT). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16h.

### 3.1.2 Cinética de Crescimento dos Clones do BCM

A 10 erlenmeyers de 100 mL foram adicionados 40 mL de meio de cultura LB caldo e 80  $\mu$ L de ampicilina 50 mg/mL. Por análise visual, foi escolhida a placa com colônias mais distantes entre si. Desta, foram selecionadas 10 unidades formadoras de colônias (UFC) para serem inoculadas nos erlenmeyers de 100 mL. Cada UFC foi inoculada em um frasco erlenmeyer contendo meio de cultura LB caldo acrescido de ampicilina 50 mg/mL.

Os erlenmeyers já inoculados foram incubados a 37°C, 250 rotações por minuto (rpm), para o acompanhamento do crescimento através de medição da densidade óptica da cultura a 600 nm ( $DO_{600nm}$ ), em espectrofotômetro Thermo Scientific™ Genesys™ 10S UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

Quando a  $DO_{600nm}$  ultrapassou 0,450, a taxa específica de crescimento ( $\mu$ ,  $min^{-1}$ ) passou a ser calculada para intervalos de 30 minutos, utilizando a equação (5).

$$\mu = \frac{(DO_{600nm} \text{ Final}) / (DO_{600nm} \text{ Inicial})}{30 \text{ (min)}} \quad (5)$$

Na equação (5),  $DO_{600nm}$ Final se refere ao valor de  $DO_{600nm}$  ao final do intervalo de 30 minutos e  $DO_{600nm}$ Inicial ao valor no início desse intervalo. O cálculo foi feito para o máximo número de intervalos possíveis e então foi calculada a média entre os valores obtidos. As equações (6), (7) e (8) apresentam um exemplo de cálculo da taxa específica de crescimento.

$$\mu = \frac{\left( \frac{DO_{600nm} \text{ de 6h}}{DO_{600nm} \text{ de 5h30min}} \right)}{30 \text{ min}} = \frac{\left( \frac{0,695}{0,538} \right)}{30} = 0,0431 \text{ min}^{-1} \quad (6)$$

$$\mu = \frac{\left( \frac{DO_{600nm} \text{ de 6h30min}}{DO_{600nm} \text{ de 6h}} \right)}{30 \text{ min}} = \frac{\left( \frac{0,856}{0,695} \right)}{30} = 0,0411 \text{ min}^{-1} \quad (7)$$

$$\mu_{\text{média}} = \frac{(0,0431 + 0,0411)}{2} = 0,0421 \text{ min}^{-1} \quad (8)$$

O tempo de duplicação normal para a cepa de *E. coli* utilizada é de 40 minutos, por isso idealmente se teria uma variação de DO<sub>600nm</sub> de 0,05/min (QIAGEN, 2009), entretanto, com taxas superiores a 0,04/min o crescimento foi considerado adequado.

### 3.1.3 Indução da Expressão da Enzima Taq DNA Polimerase

Foram testadas três concentrações de IPTG para indução da expressão da Taq DNA Polimerase: 1 mM, 2 mM e 3 mM. Para isso, foram retirados 5 mL de cada cultivo após atingimento da DO<sub>600nm</sub> de 0,8 a 1,0, e colocados em três tubos Falcon de 50 mL estéreis, um para cada concentração. O IPTG foi adicionado e as amostras incubadas a 37°C, 250 rpm por 16 horas para a indução da expressão. Passada a incubação as amostras induzidas e não induzidas foram preparadas para análise em gel de poliacrilamida.

Em microtubos de 1,5 mL foram colocados 250 µL de cada um dos cultivos (induzidos e não induzidos), em seguida centrifugados por três minutos a 13000 rpm, temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram retirados e descartados. Os pellets das amostras foram ressuspensos em 125 µL de água ultrapura e 125 µL de tampão 2X de amostra para proteína (10% de DTT 1 M, 2 mg/mL de SDS, 2 ng/mL de azul de Bromofenol, 20% de glicerol estéril, q.s.p. água RNase Free). Para controle positivo da reação, a um microtubo de 1,5 mL foram adicionados 12 µL de Taq DNA Polimerase (Roche, Basileia, Suíça) e 12 µL de tampão 2X de amostra para proteína. Os microtubos preparados foram colocados em termobloco a 95°C por cinco minutos e em seguida em gelo.

Foram utilizados três géis de poliacrilamida comerciais, Criterion XT Precast Gel 12% Bis-tris (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), com cuba de eletroforese de proteína Power PAC Basic – Bio-Rad. Ao sistema de eletroforese de cada um dos géis foram adicionados 500 mL de 1X Tampão MOPS/SDS (trizma base 50 mM, MOPS 50 mM, EDTA 1 mM, SDS 3,4 mM, q.s.p. água ultrapura).



Foram aplicados os seguintes volumes: 20  $\mu$ L do marcador de peso molecular Mark 12 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); 24  $\mu$ L da Taq DNA Polimerase (Roche, Basileia, Suíça); 10  $\mu$ L de cada uma das amostras. No primeiro gel foram analisadas as amostras acrescidas de IPTG a 1 mM e a 2 mM, no segundo gel as amostras a 3 mM e no terceiro as amostras induzidas dos clones que apresentaram resultado menos satisfatório durante a cinética de crescimento.

A corrida foi configurada com tensão elétrica constante de 150 V. O tempo foi determinado por análise visual do quanto as amostras migraram no gel, sendo a corrida interrompida quando o corante azul estava a aproximadamente 1 cm do final do gel. Os géis foram corados com corante Sypro Orange (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), em ácido acético 7%, e fotografados em sistema de fotodocumentação UVP BioDoc-It<sup>®</sup> Imaging System (UVP, Upland, CA, EUA).

#### 3.1.4 Extração e Dosagem do DNA Plasmidial

A extração do DNA plasmidial do interior das células foi realizada por Minipreparação Plasmidial, utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep da empresa Qiagen e seguindo o protocolo preconizado pelo fabricante (Qiagen, Hilden, Alemanha, 2015). A dosagem foi feita em espectrofotômetro NanoVue Plus<sup>™</sup> (Biochrom US, Holliston MA, EUA).

#### 3.1.5 Análise de Restrição

As reações foram preparadas de acordo com as recomendações do fabricante (New England BioLabs, Ipswich, MA, EUA, 2012), com os volumes apresentados na Tabela 1. Foi utilizado o DNA utilizado proveniente dos cultivos e previamente extraído por Minipreparação Plasmidial. Adicionalmente, fez-se uso de um plasmídeo pBioMTaq padrão.

**Tabela 1 - Volumes de reagentes a serem adicionados para 1 reação de análise de restrição**

Reagentes	Volume – 1 reação (µL)
Eco RI	1
Xbal	1
Tampão NEBuffer 2.1 10 X	5
Água RNase Free	6
DNA (100 ng/µL)	2

**Fonte: A autoria própria**

Os tubos de reação foram incubados em estufa a 37°C por duas horas e então passaram por inativação enzimática a 65°C por 15 minutos. A reação foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,0%. A corrida foi configurada para ocorrer em 60 minutos, com tensão elétrica constante de 100 V.

### 3.1.6 Seleção do clone para compor o BCT

A seleção do clone para compor o Banco de Células de Trabalho (BCT) foi pautada nos seguintes critérios:

1. Cinética de crescimento, levando em conta o atingimento de  $DO_{600nm}$  de 0,8 a 1,0 em menor tempo e a maior taxa específica de crescimento ( $\mu$ );
2. Expressão da Taq DNA Polimerase, verificando presença da Taq;
3. Dosagem da concentração plasmidial, constatando que estivesse superior a 100 ng/µL;
4. Análise de restrição com as enzimas EcoRI e XbaI, verificando a correta digestão.

### 3.1.7 Cultura Preparatória para Congelamento

Em um erlenmeyer de 1000 mL estéril, foram adicionados 99 mL de meio 2 xYT caldo e 20 µL de ampicilina 50 mg/mL. Ao meio de cultura foi inoculado 1,0 mL do clone escolhido para compor o BCT. Realizou-se o acompanhamento da cinética de crescimento até o atingimento de  $DO_{600nm}$  entre 0,8 e 1,0.

Então, foi feita a aliquotagem de 500  $\mu$ L do cultivo para 100 criotubos, já contendo 500  $\mu$ L de glicerol 50% estéril e dispostos em caixas adequadas para criopreservação.

Os 100 criotubos seguiram para o congelamento rápido, em um banho com etanol absoluto e gelo seco. As culturas congeladas foram armazenadas em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2 ESTUDO DE ESTABILIDADE DO BANCO DE CÉLULAS DE TRABALHO

No tempo T0, ou seja, no estudo de estabilidade realizado no mês do congelamento do banco, os testes foram realizados com apenas um criotubo. A partir do T1 a avaliação passou a ser feita em triplicata (três criotubos) para dar maior robustez e confiança aos resultados obtidos. Os procedimentos aqui descritos consideram a triplicata.

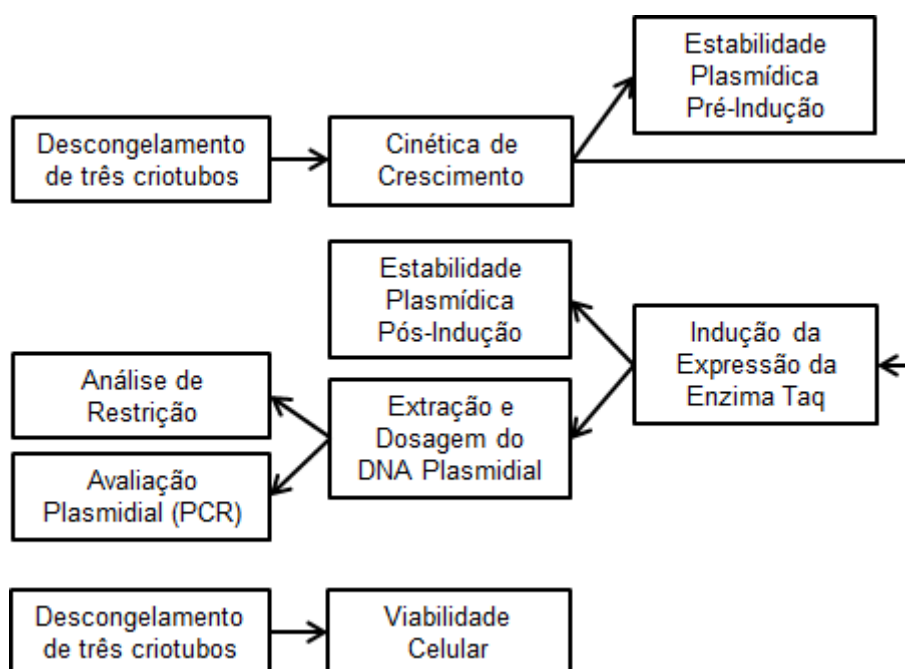
Ao longo das avaliações feitas mês a mês foram realizadas outras alterações de métodos, sintetizadas no Quadro 1 e detalhadas nos itens 3.2.1 a 3.2.7.

	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
Todos os procedimentos	Único criotubo	Triplicata									
Viabilidade Celular	Descongelamento lento										
Cinética de Crescimento	Descongelamento rápido										
Indução da Expressão da Taq	Tensão elétrica: 150 V	Tensão elétrica: 80 V									
Estabilidade Plasmídica	Método de PACHECO (2013)	Método <i>Picking and patching colonies</i>									
	Cultivo original com ampicilina	Cultivo original sem ampicilina									

**Quadro 1 - Alterações de procedimentos ao longo do estudo de estabilidade**

**Fonte: Autoria própria**

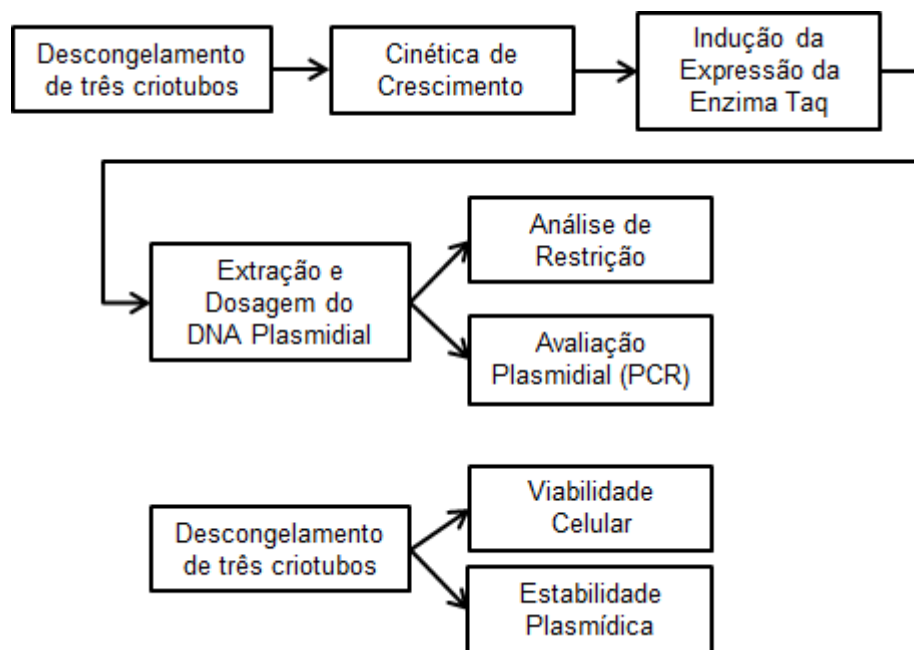
O Gráfico 3 apresenta o fluxograma com a sequência de testes realizados até o T6 do estudo de estabilidade.



**Gráfico 3 - Fluxograma dos testes realizados até o T6 do estudo de estabilidade do BCT**

Fonte: Autoria própria

O fluxograma ilustrado no Gráfico 4 apresenta a sequência de testes realizados a partir do T7 do estudo de estabilidade.



**Gráfico 4 - Fluxograma dos testes realizados a partir de T7 do estudo de estabilidade do BCT**

**Fonte: Autoria própria**

### 3.2.1 Viabilidade Celular

Desde o estabelecimento até o quinto mês (T5), o descongelamento dos criotubos do BCT foi feito deixando-os aproximadamente 40 minutos em gelo seco e então em gelo, seguindo o que foi realizado para o BCM (PACHECO, 2013). A partir do sexto mês (T6) foi adotado o descongelamento rápido, no qual os criotubos retirados do ultrafreezer foram postos em gelo seco somente para transporte e então foram incubados em banho de circulação a 37 °C, por cerca de dois minutos até descongelarem completamente. A adoção desse método teve como finalidade aumentar a viabilidade das células, conforme descrito no último parágrafo do item 2.4.1.

Após o descongelamento de três criotubos, uma diluição seriada de cada um deles foi feita até  $10^{-5}$ , em microtubos (Figura 11). Inicialmente, 900  $\mu\text{L}$  de meio de cultura 2 xYT foram adicionados a seis microtubos. Foram transferidos 100  $\mu\text{L}$  do criotubo para o primeiro microtubo, para compor a diluição  $10^{-1}$ , identificada como “A”. Do microtubo “A” foram transferidos 100  $\mu\text{L}$  para o “B”, referente à diluição  $10^{-2}$ , e assim sucessivamente até a diluição  $10^{-5}$ .

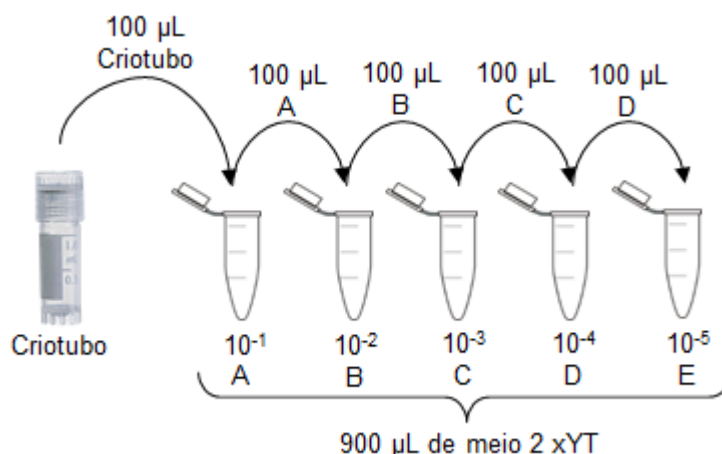


Figura 11 - Esquema de diluição seriada até  $10^{-5}$  para viabilidade celular

Fonte: Autoria própria

O plaqueamento foi feito para as três últimas diluições, ou seja,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  em triplicata para cada um dos três criotubos, totalizando 27 placas, conforme esquema da Figura 12. As linhas referem-se às diluições  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ , os números 1, 2 e 3 aos cultivos e as letras A, B e C às triplicatas de cada cultivo.

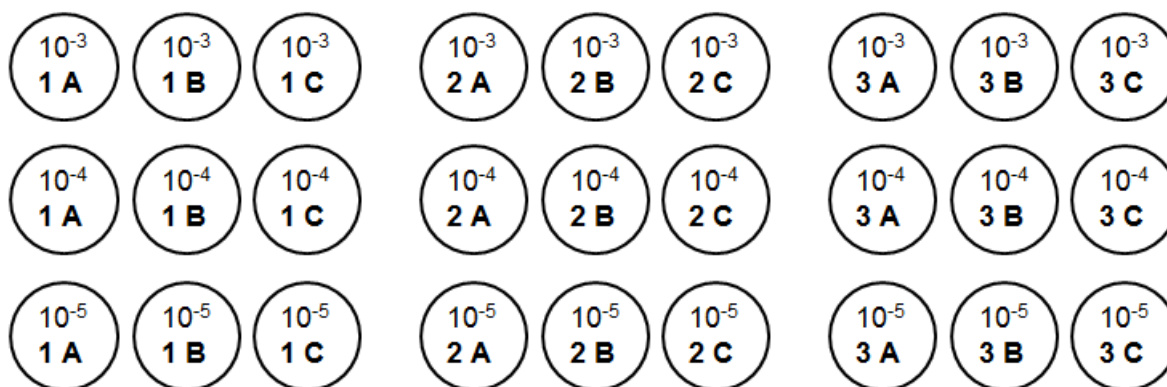


Figura 12 - Esquema de Placas de Petri para Viabilidade Celular

Fonte: Autoria própria

Para cada uma das diluições foi feito o espalhamento de 100 µL em cada placa de Petri, que ao final foram incubadas a 37 °C (+/- 1 °C) por 20 a 24 horas.

A viabilidade celular é dada em UFC/mL. Para obtê-la, foi selecionada a diluição com maior número de UFC contáveis e os cálculos foram feitos para transformar a média de UFC/placa para UFC/mL. Para isso, foram consideradas a diluição e a conversão para 1 mL, de acordo com a equação (3).

### 3.2.2 Cinética de Crescimento

Para os testes de cinética de crescimento foram descongelados três criotubos do Banco de Células de Trabalho (BCT), diferentes dos utilizados para o teste de viabilidade celular. O procedimento para o descongelamento foi modificado a partir de T6, conforme explanado no item 3.2.1.

A três erlenmeyers de 250 mL autoclavados foram adicionados 30 mL de meio de cultura 2 xYT e 60  $\mu$ L de ampicilina 50 mg/mL. O volume completo de um criotubo foi inoculado em cada um dos frascos. Os três cultivos foram incubados a 37°C, 250 rpm, para acompanhamento do crescimento por medição da densidade óptica a 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) em espectrofotômetro Thermo Scientific™ Genesys™ 10S UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), até que se atingisse  $DO_{600nm}$  entre 0,8 e 1,0.

A taxa específica de crescimento ( $\mu$ ,  $\text{min}^{-1}$ ) foi calculada através da equação (5), apresentada no item 3.1.2.

### 3.2.3 Indução da Expressão da Enzima Taq DNA Polimerase

Após atingirem  $DO_{600nm}$  entre 0,8 e 1,0, foram transferidos 5 mL de cada um dos cultivos para dois tubos Falcon de 50 mL, e então acrescidos de IPTG, para concentração final de 1 mM. Os tubos Falcon foram incubados a 37°C, 250 rpm por 16 horas, a fim de que os cultivos fossem induzidos.

As amostras foram preparadas conforme descrito no item 3.1.3. No gel foram aplicados: 20  $\mu$ L do marcador de peso molecular Mark 12 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); 12  $\mu$ L da Taq DNA Polimerase (Roche, Basileia, Suíça); 10  $\mu$ L de cada uma das amostras. Até o T2, a fonte de eletroforese foi configurada em 150 V e o tempo da corrida foi determinado por análise visual de quanto as amostras migraram no gel, sendo que a corrida foi interrompida quando o corante azul estava a aproximadamente 1 cm do final do gel. A partir do T2 a corrida foi ajustada para 260 minutos, 80 V, a fim de propiciar o espalhamento das bandas de proteína, conforme discutido no item 2.5.2. Ao final, os géis foram corados com corante Sypro Orange (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em ácido acético 7%, e fotografados



em sistema de fotodocumentação UVP BioDoc-It<sup>®</sup> Imaging System (UVP, Upland, CA, EUA).

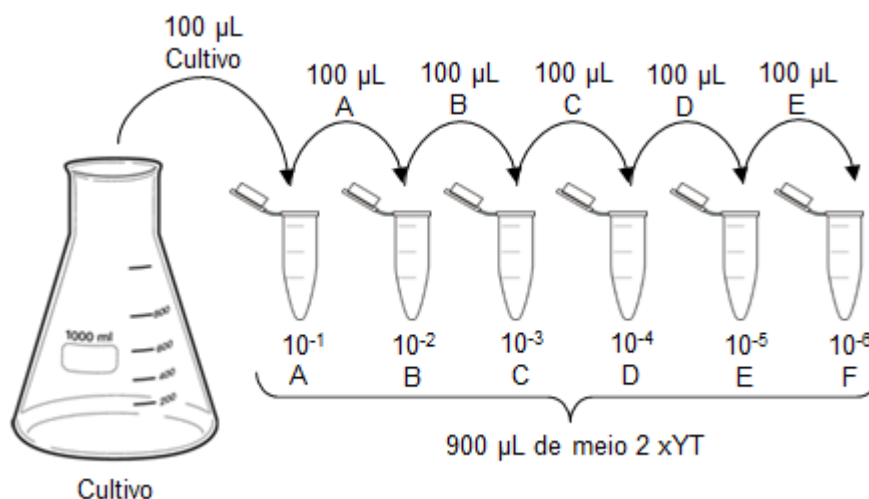
### 3.2.4 Estabilidade Plasmídica

Inicialmente, no mês do estabelecimento do BCT (T0) e no mês seguinte (T1), a determinação da estabilidade plasmídica foi feita com o método de Pacheco (2013), utilizado para o BCM. A partir de T2 foi adotada a técnica *Picking and Patching colonies* (KOENIG, 2003 e BISEN, 2014), que possibilita maior repetitividade nos resultados por ser menos vulnerável a erros aleatórios de procedimento, como os ocorridos na pipetagem. O capítulo Resultados e Discussão, item 4.2.5, explicita como a adoção do *Picking and Patching colonies* colaborou para melhores determinações da estabilidade plasmídica.

Até o sexto mês (T6) o teste foi feito a partir dos mesmos cultivos da cinética de crescimento, que contêm ampicilina. Adicionalmente, foi realizado antes e após a adição de IPTG.

A partir de T7, a estabilidade plasmídica passou a ser realizada com três cultivos líquidos sem ampicilina, portanto, avaliando somente sem indução com IPTG. Para tais cultivos, três criotubos foram descongelados em banho de circulação a 37°C e inoculados, cada um em um erlenmeyer de 250 mL contendo 30 mL de meio 2 xYT. Os frascos foram incubados a 37°C, 250 rpm, até o atingimento de  $DO_{600nm}$  entre 0,8 e 1,0.

Em todos os meses, para cada um dos cultivos pós atingimento da  $DO_{600nm}$  entre 0,8 e 1,0, foi feita uma diluição seriada até  $10^{-6}$ , em microtubos, conforme a Figura 13. Primeiramente adicionou-se 900  $\mu$ L de meio de cultura 2 xYT a seis microtubos. Do cultivo foram transferidos 100  $\mu$ L para o primeiro microtubo, para compor a diluição  $10^{-1}$ , identificada como “A”. Do microtubo “A” foram transferidos 100  $\mu$ L para o “B”, referente à diluição  $10^{-2}$ , e assim sucessivamente até a diluição  $10^{-6}$ .

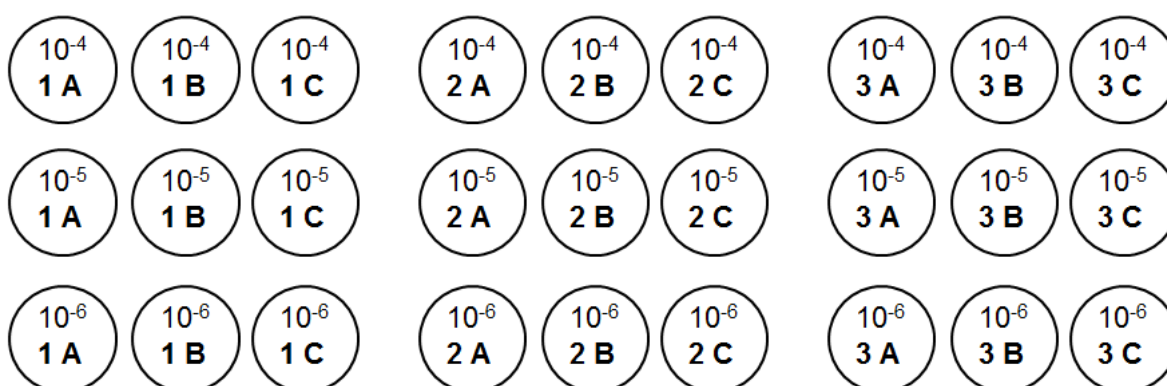


**Figura 13 - Esquema de diluição seriada até  $10^{-6}$**

Fonte: Autoria própria

O plaqueamento foi feito para as três últimas diluições, ou seja,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ , em triplicata para cada um dos três criotubos, totalizando 27 placas, conforme a Figura 14. As linhas referem-se às diluições  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ , os números 1, 2 e 3 aos cultivos e as letras A, B e C às triplicatas de cada cultivo.

Nos tempos T0 e T1, o plaqueamento foi feito em placas com e sem ampicilina, duplicando o ilustrado na Figura 14, completando 54 placas.



**Figura 14 - Esquema de Placas de Petri para Estabilidade Plasmídica**

Fonte: Autoria própria

Para cada uma das diluições, foi feito o espalhamento de 100 µL em cada placa de Petri, e todas foram incubadas a 37 °C por 20 a 24 horas.

Nos meses T0 e T1 a estabilidade plasmídica foi calculada diretamente a partir do resultado do crescimento dessas placas, através da equação (4), apresentada no item 2.6.2.

### *Picking and patching colonies*

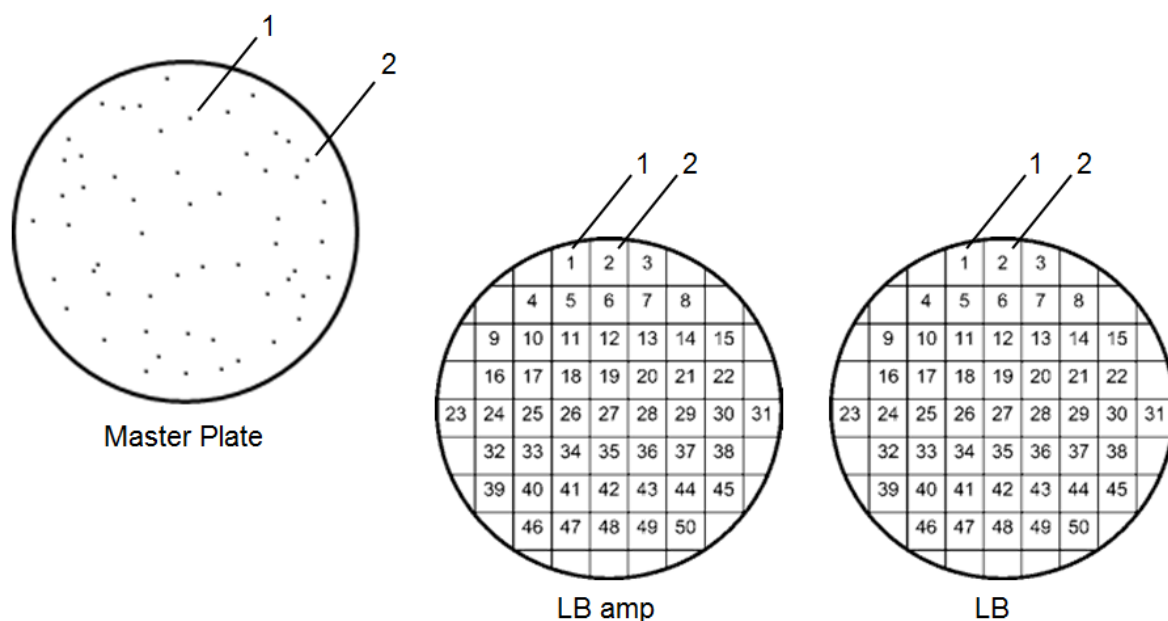
Para cada um dos cultivos, a partir de T2, foi selecionada uma placa com mais de 50 UFC de cerca de 1 mm<sup>2</sup> cada uma, e distantes entre si o suficiente para permitir a alçada de uma por vez. Esta placa foi denominada Master. Foram separadas três placas de Petri contendo meio LB agar amp e três placas de Petri contendo meio LB agar, identificadas conforme a Figura 15. A cada uma delas foi inserida na parte inferior uma grade com 50 espaços.



**Figura 15 - Esquema para identificação das placas para *picking and patching colonies***

**Fonte: Aatoria própria**

Da placa Master, com um palito de dente estéril, foi coletada uma única colônia, que foi transferida primeiramente para o espaço “1” da placa com ampicilina (LB amp) e então para o espaço “1” da placa sem ampicilina (LB). Essa transferência foi feita comprimindo suavemente o palito de dente sobre o espaço “1” de cada placa, de modo que a mesma colônia pudesse ser transferida para duas placas. O procedimento foi repetido com uma segunda colônia da placa Master, transferindo-a para o espaço “2” de cada uma das placas LB amp e LB, nessa ordem. Essa técnica foi feita para as 50 colônias e para as três placas Master, lembrando que cada placa Master se refere a um dos cultivos 1, 2 e 3. O esquema da Figura 16 ilustra o *picking and patching colonies*. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C de 16 a 20 horas.



**Figura 16 - Esquema de realização do *picking and patching colonies***

Fonte: Autoria própria

A estabilidade plasmídica foi calculada a partir da contagem de colônias do *picking and patching colonies*, de acordo com a equação (4), apresentada no item 2.6.2.

Até o sexto mês (T6), foi feita avaliação da estabilidade plasmídica antes e após a adição do IPTG aos cultivos. Assim, após a indução foram repetidos os procedimentos descritos para diluição seriada, espalhamento em placa e *picking and patching colonies*.

### 3.2.5 Extração e Dosagem do DNA plasmidial

Da mesma forma que no item 3.1.4, a extração do DNA plasmidial foi feita seguindo o protocolo do kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN, 2015), e a leitura das concentrações plasmidiais foi realizada em espectrofotômetro NanoVue Plus™ (Biochrom US, Holliston MA, EUA).

### 3.2.6 Análise de Restrição

As reações foram preparadas de acordo com as recomendações do fabricante (New England BioLabs, Ipswich, MA, EUA, 2012) e conforme descrito no item 3.1.5. No estudo de estabilidade foram feitas também reações para controle negativo, nas quais todos os reagentes foram adicionados, exceto as enzimas de restrição. A configuração utilizada para a corrida de eletroforese foi de 80 V, por 90 minutos.

### 3.2.7 Avaliação Plasmidial por PCR

A avaliação plasmidial foi realizada através de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores específicos para amplificar uma região do plasmídeo pBioMTaq, o POL2000F e o POL2500R, cujas sequências de nucleotídeos estão no Quadro 2 (PACHECO, 2013). Os números 2000 e 2500 dos iniciadores são referentes à posição, em pares de base, nas quais eles se anelam ao plasmídeo pBioMTaq. As letras F e R se referem a “*forward*” e a “*reverse*”, respectivamente. Desse modo, espera-se que os fragmentos amplificados com POL2000F e POL2500R possuam 500 pares de base.

**Quadro 2 - Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados na avaliação plasmidial**

Iniciador	Sequência
POL2000F	5' CTACGGCATGTCGGCCCACCGCCTCTCCCA 3'
POL2500R	5' TCACTCCTTGGCGGAGAGCCAGTCCTCCCCTAT 3'

Fonte: Pacheco (2013)

Na Tabela 2 (PACHECO, 2013) estão os volumes utilizados para o preparo das reações. Foram avaliados os plasmídeos dos cultivos induzidos, previamente extraídos por Minipreparação Plasmidial. No controle negativo não foi adicionado DNA plasmidial.

**Tabela 2 - Reagentes necessários para 1 PCR da avaliação plasmidial**

Reagentes	Volume - 1 reação (µL)
Água RNase Free	38,4
Tampão 10 X PCR	5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4
10 mM dNTPs	1
100 µM POL2000F	0,2
100 µM POL2500R	0,2
Taq Roche	0,2
DNA plasmidial (200 ng/µL)	1

Fonte: Adaptado de Pacheco (2013)

O termociclador foi programado para aquecer a 94°C e permanecer nessa temperatura por dois minutos para uma desnaturação inicial, e a partir de então realizar 35 ciclos, que ocorreram de acordo com o apresentado na Tabela 3. Ao final da ciclagem os tubos foram resfriados a 4°C (PACHECO, 2013).

**Tabela 3 - Programação de 35 ciclos no termociclador**

Etapa	Temperatura	Tempo
Desnaturação	94°C	30 segundos
Anelamento	55°C	30 segundos
Alongamento	68°C	60 segundos

Fonte: Pacheco (2013)

Os tubos de reação foram retirados do termociclador e preparados com 5X Tampão de amostra para DNA (2,5 mg/mL de Orange G, 25% de glicerol estéril, q.s.p. água ultrapura). Os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0%, utilizando o marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder. A corrida foi configurada em 80 V, por 90 minutos.

### 3.3 BCT APLICADO EM PROCESSO PRODUTIVO DA TAQ DNA POLIMERASE

#### 3.3.1 Processo Produtivo

Seis meses após o estabelecimento do BCT, o mesmo foi testado como substrato para um processo fabril típico do IBMP para produção da Taq DNA polimerase.

##### 3.3.1.1 Pré-Inóculo

Para cultivar o pré-inóculo dois criotubos do BCT passaram por descongelamento rápido de cerca de dois minutos em banho de circulação a 37 °C. Em dois erlenmeyers de 250 mL autoclavados foram adicionados 30 mL de meio de cultura 2 xYT e 60 µL de ampicilina 50 mg/mL. A cada um deles foi inoculado o volume completo de um criotubo. Os dois cultivos foram incubados a 37°C, 250 rpm, para acompanhamento do crescimento por medição da densidade óptica a 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) em espectrofotômetro BioPhotometer plus (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), até que se atingisse  $DO_{600nm}$  entre 0,8 e 1,0. A taxa específica de crescimento ( $\mu, \text{min}^{-1}$ ) foi calculada através da equação (5), apresentada no item 3.1.2.

Após o atingimento da  $DO_{600nm}$  entre 0,8 e 1,0 selecionou-se o cultivo com maior taxa específica de crescimento e dele foram feitas alíquotas de 500 µL em criotubos contendo 500 µL de glicerol 50%, em seguida congelados em banho de gelo seco e etanol absoluto para posterior caracterização das células.

##### 3.3.1.2 Cultura preparatória

O cultivo selecionado foi diluído 1:10 em meio de cultura 2 xYT, sendo que em um microtubo contendo em 90 µL do meio foram adicionados 10 µL do cultivo. A cultura preparatória a ser inoculada em biorreator Wave foi cultivada em cinco erlenmeyers de 2 L autoclavados, acrescidos de 500 mL de meio de cultura 2 xYT e 1 mL de ampicilina 50 mg/mL. A cada um dos erlenmeyers foram inoculados 10 µL do cultivo diluído. Os frascos foram incubados a 25°C, 60 rpm por 16 horas para não

haver multiplicação das células. Após esse período, foram incubados a 37°C, 175 rpm para acompanhamento do crescimento por medição da  $DO_{600nm}$  até estar entre 0,8 e 1,0.

### 3.3.1.3 Cultivo em biorreator

Quando os cinco cultivos de 2,5 L atingiram  $DO_{600nm}$  entre 0,8 e 1,0 eles foram inoculados em biorreator Wave contendo 22,5 L de meio de cultura 2 xYT e ampicilina (100 µg/mL). O cultivo foi mantido a 37°C, 25 rpm, ângulo de agitação de 9° e aeração de 0,4 L/min. Novamente fez-se o acompanhamento do crescimento até  $DO_{600nm}$  entre 0,8 e 1,0.

Ao atingir a  $DO_{600nm}$  desejada, foram feitas alíquotas de 500 µL do cultivo em 12 criotubos contendo 500 µL de glicerol 50%, que foram congelados em banho de gelo seco e etanol absoluto para posterior caracterização das células. A cultura foi acrescida de IPTG 1 mM, a agitação foi alterada para 30 rpm e mantida por 16 horas para a indução da expressão da enzima Taq.

Após o período de indução, a  $DO_{600nm}$  foi medida, 5 mL do cultivo foram coletados, centrifugados, o sobrenadante foi descartado e o pellet bacteriano foi congelado a -20°C para posterior caracterização. Coletaram-se 100 mL do cultivo para o teste de atividade do lisado clarificado (item 3.3.2) e 100 mL do cultivo para a determinação do peso seco (item 3.3.4).

Os 25 litros de cultivo foram retirados do biorreator e centrifugados a 6000 g, 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e a biomassa obtida foi transferida para pacotes plásticos que foram então selados e pesados em balança de precisão, para subsequente armazenamento em ultrafreezer a -80°C.

### 3.3.2 Caracterização das células

Os criotubos congelados provenientes das etapas de produção acima descritas foram caracterizados através dos mesmos testes realizados no estudo de estabilidade a partir do T7 (i.e., viabilidade celular, estabilidade plasmídica, cinética de crescimento, indução da expressão, extração e dosagem do DNA plasmidial, análise de restrição e avaliação plasmidial). Os *pellets* originados do cultivo pós-



indução com IPTG foram utilizados para teste da indução da expressão, extração e dosagem do DNA plasmidial, análise de restrição e avaliação plasmidial.

### 3.3.3 Lisado clarificado

Os itens a seguir descrevem o procedimento para obtenção do lisado clarificado a partir do cultivo induzido em biorreator e o teste para verificação da atividade da enzima Taq DNA polimerase nesse lisado.

#### 3.3.3.1 Lise e clarificação das células

Esta etapa consistiu em tratar a amostra do cultivo induzido com tampões adequados, lisozima e alta temperatura a fim de lisar as células, realizando uma purificação prévia para com esse lisado testar a atividade da enzima Taq DNA polimerase.

Os 100 mL do cultivo induzido em biorreator foram divididos em quatro tubos com 25 mL em cada, dois deles identificados como “1” e dois como “2”. Os quatro foram centrifugados a 4°C, por 15 minutos, 5000 g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* bacteriano foi armazenado em freezer de -30°C a -15°C por duas horas. Em seguida, um dos tubos “1” foi ressuspensão ao adicionar 1 mL de tampão A (Trizma base 50 mM, D(+)Glicose Monohidratada 50 mM, EDTA 1 mM, HCl 25%, q.s.p. água ultrapura) e homogeneizá-lo em vórtex. O conteúdo foi transferido para o outro tubo “1”, que também foi ressuspensão em vórtex. O procedimento foi repetido com os tubos “2”.

Adicionou-se 20 µL de lisozima 50 mg/mL em cada um dos tubos “1” e “2”, que foram homogeneizados gentilmente com movimentos circulares e incubados por 15 minutos em temperatura ambiente. Então, 1 mL do tampão B (Trizma base 10 mM, KCl 50 mM, EDTA 1 mM, Tween 20 0,5%, Nonidet P-40 0,5%, HCl 25%, q.s.p. água ultrapura) foi adicionado ao tubo “1” e 1 mL do tampão B ao tubo “2”. Após homogeneizar novamente, os tubos foram incubados por 45 minutos em banho de circulação a 75°C. Passado o período de incubação, foram centrifugados por 30 minutos, 39800 g, 4°C. O sobrenadante foi testado quanto à atividade da enzima Taq.

### 3.3.3.2 Teste de atividade da enzima Taq

O teste verificou a atividade da enzima Taq presente no lisado clarificado. Para isso, fez-se uma PCR para a Taq polimerizar a fita simples de DNA M-13 na presença do iniciador M-13. A atividade foi observada em comparação com enzimas Taq referência de duas empresas, a Roche, Basileia, Suíça (ao longo do texto abreviada como R) e a GE, Little Chalfont, Reino Unido.

As enzimas comerciais, inicialmente a 5 U/ $\mu$ L foram diluídas com tampão de diluição BSA (10X PCR Buffer 10%, BSA 10  $\mu$ g/mL, q.s.p. água RNase Free) para 0,5 U/ $\mu$ L, 0,05 U/ $\mu$ L, 0,03 U/ $\mu$ L e 0,01 U/ $\mu$ L. A Tabela 4 esquematiza como foram feitas as diluições. Já o lisado clarificado foi diluído em 1:10, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000, 1:10000 também com tampão de diluição BSA, conforme Tabela 5.

**Tabela 4 - Diluição das enzimas referência Roche (R) e GE**

Diluição	U/ $\mu$ L	Fator de Diluição	Taq DNA Polimerase	Tampão de Diluição BSA
R1/GE1	0,5	1:10	2 $\mu$ L R <sub>original</sub> /GE <sub>original</sub>	18 $\mu$ L
R2/GE2	0,05	1:100	2 $\mu$ L R1/GE1	18 $\mu$ L
R3/GE3	0,03	1:167	2 $\mu$ L R2/GE2	4 $\mu$ L
R4/GE4	0,01	1:500	2 $\mu$ L R3/GE3	8 $\mu$ L

Fonte: IBMP, 2016.

**Tabela 5 - Diluição das amostras A e B do lisado clarificado**

Diluição	Fator de Diluição	Lisado Clarificado	Tampão de Diluição BSA
A1/B1	1:10	2 $\mu$ L A <sub>original</sub> /B <sub>original</sub>	18 $\mu$ L
A2/B2	1:100	2 $\mu$ L A1/B1	18 $\mu$ L
A3/B3	1:200	5 $\mu$ L A2/B2	5 $\mu$ L
A4/B4	1:500	2 $\mu$ L A3/B3	8 $\mu$ L
A5/B5	1:1000	2 $\mu$ L A4/B4	18 $\mu$ L
A6/B6	1:10000	2 $\mu$ L A5/B5	18 $\mu$ L

Fonte: IBMP, 2016.

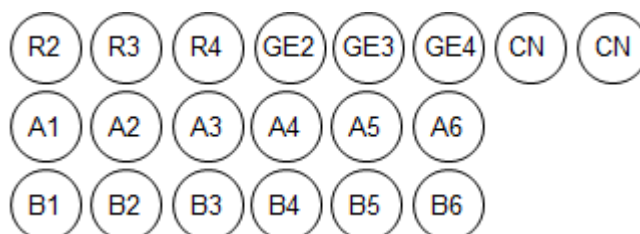
Na Tabela 6 são apresentados os volumes utilizados para o preparo das reações.

**Tabela 6 - Reagentes necessários para uma reação do teste de atividade da enzima Taq no lisado clarificado**

Reagentes	Volume - 1 reação (µL)
Água RNase Free	14,2
10 X Tampão Teste de Atividade	2
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,2
10 mM dNTPs	0,1
1 µM Iniciador M13	2

Fonte: IBMP, 2016.

Um tubo para 22 reações foi preparado com os reagentes da Tabela 6 e 11 µL do DNA molde M-13 a 200 ng/µL. Esse tubo foi denominado Mastermix. Em 20 microtubos de PCR foram adicionados 20 µL de Mastermix, sendo dois microtubos para controle negativo (CN), nos quais enzima Taq não foi adicionada. Nos demais 18 tubos adicionou-se 2 µL de enzima das diluições realizadas, conforme esquema da Figura 17.



**Figura 17 - Esquema de identificação dos tubos de reação seguindo as diluições das enzimas, onde R se refere à empresa Roche, GE à empresa de mesmo nome, CN é o controle negativo, A e B são as amostras em teste. Os números se referem às diluições, seguindo o apresentado na Tabela 4 e na Tabela 5**

Fonte: IBMP, 2016.

Os tubos foram colocados no termociclador para a realização da PCR. A programação utilizada foi a apresentada na Tabela 7 sendo realizado um único ciclo. Ao final da ciclagem os tubos foram resfriados a 4°C (IBMP, 2016).

**Tabela 7 - Programação do termociclador para teste de atividade de Taq no lisado clarificado**

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
Desnaturação	94°C	30 segundos
Anelamento	55°C	30 segundos
Alongamento	68°C	60 segundos

**Fonte: IBMP, 2016**

Os tubos de reação foram retirados do termociclador e preparados com 10X Tampão de amostra para DNA (5 mg/mL de Orange G, 50% de glicerol estéril, q.s.p. água ultrapura). Os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,75%, utilizando o marcador de peso molecular  $\lambda$ /HindIII. A corrida foi configurada em 100 V, 60 minutos.

#### 3.3.4 Determinação do peso seco

Esse teste objetivou determinar o peso seco da biomassa obtida com a fermentação de 25 litros, a fim de comparar com os resultados anteriores do mesmo processo e verificar se havia repetitividade.

Os 100 mL do cultivo induzido em biorreator foram divididos em quatro tubos com 25 mL em cada, dois deles identificados como “A” e dois como “B”. Os tubos foram centrifugados a 5000 g, 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e os pellets foram ressuspensos em água ultrapura, colocando 20 mL de água em cada tubo e homogeneizando-os em vórtex.

Os tubos foram novamente centrifugados a 5.000 g, 4°C por 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante e foram adicionados 5 mL de água ultrapura a um dos tubos “A”, que foi homogeneizado em vórtex. O conteúdo desse tubo “A” foi transferido para o outro “A”, sendo em seguida também vortexado para completa ressuspensão. Procedeu-se da mesma forma para os tubos “B”. O peso seco e a porcentagem de umidade das amostras foram determinados em analisador halógeno de umidade HB 43-S Halogen (Mettler Toledo, Columbus, OH, EUA).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ESTABELECIMENTO DO BANCO DE CÉLULAS DE TRABALHO

#### 4.1.1 Abertura do Banco de Células Mestre

Da Figura 18 à Figura 21 são apresentadas as colônias bacterianas crescidas a partir da inoculação dos diferentes volumes de cultivo ao meio de cultura LB agar amp: 5  $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 30  $\mu$ L, 40  $\mu$ L, 50  $\mu$ L e 100  $\mu$ L.

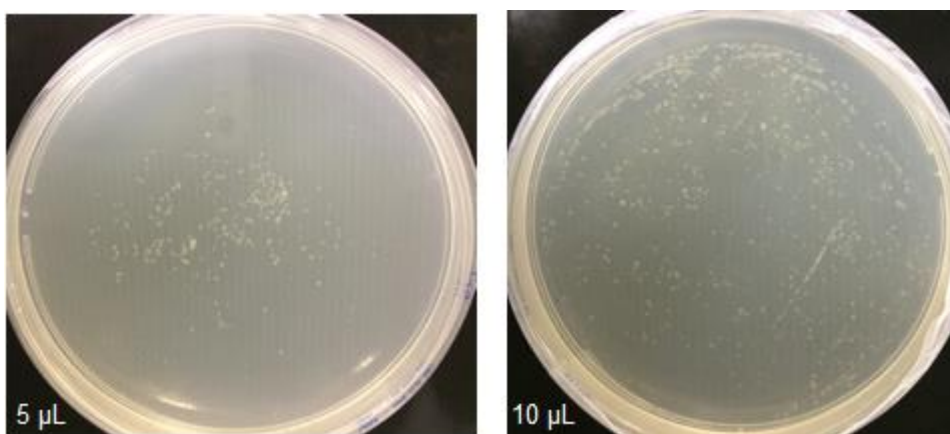


Figura 18 - Colônias crescidas a partir da inoculação de 5  $\mu$ L e 10  $\mu$ L de cultivo

Fonte: Autoria própria

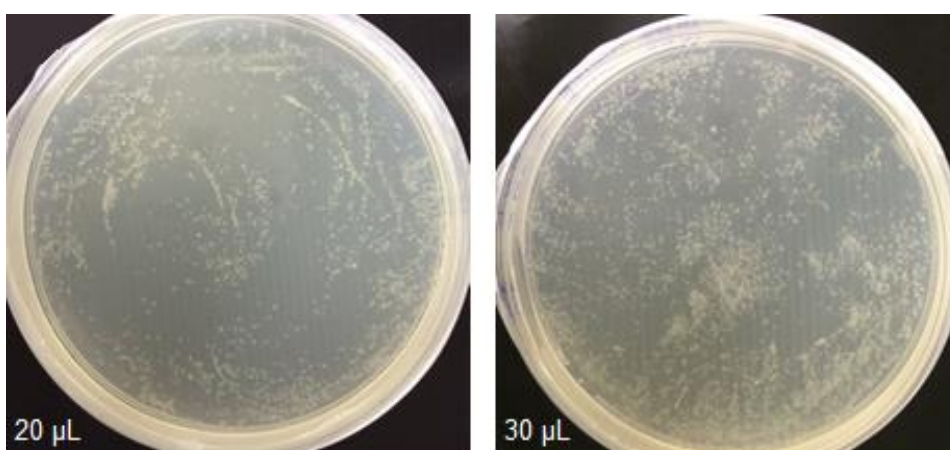
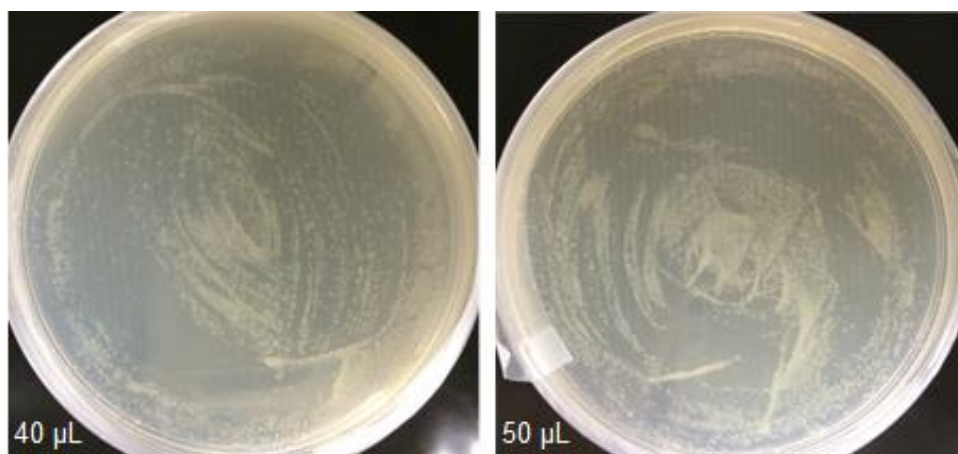


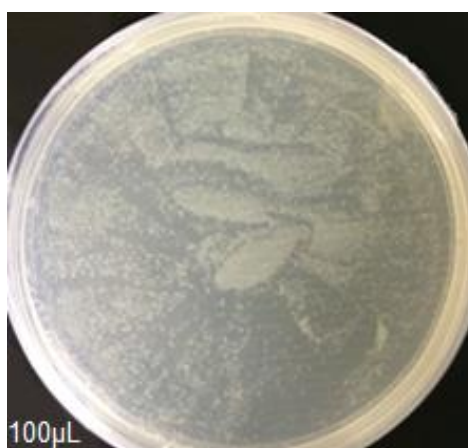
Figura 19 - Colônias crescidas a partir da inoculação de 20  $\mu$ L e 30  $\mu$ L de cultivo

Fonte: Autoria própria



**Figura 20 - Colônias crescidas a partir da inoculação de 40 µL e 50 µL de cultivo**

**Fonte: Aatoria própria**



**Figura 21 - Colônias crescidas a partir da inoculação de 100 µL de cultivo**

**Fonte: Aatoria própria**

Escolheu-se a placa inoculada com 5 µL de cultura, pois pela análise visual foi ela que apresentou colônias mais distantes entre si.

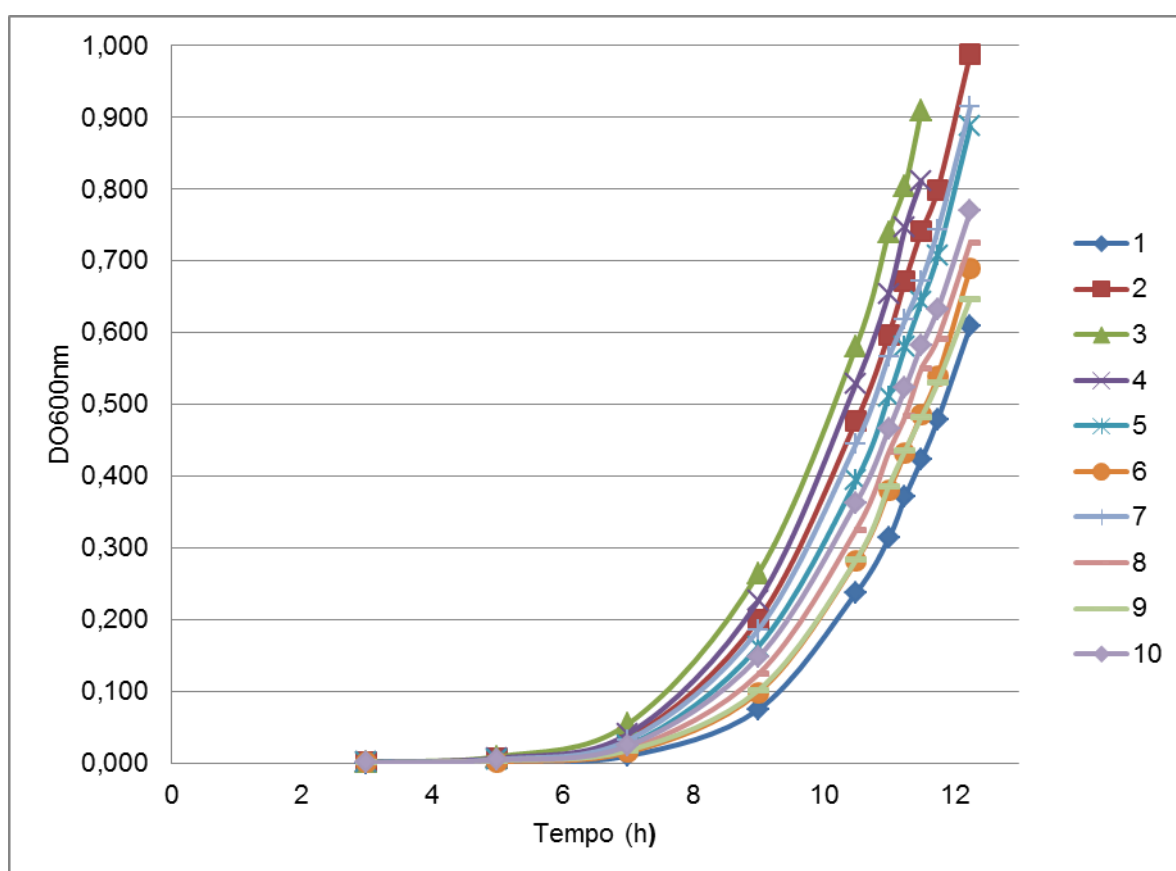
#### 4.1.2 Cinética de crescimento dos clones do BCM

Os resultados das medições de  $DO_{600nm}$  durante o acompanhamento do crescimento são apresentados na Tabela 8 e no Gráfico 5. Os clones 3 e 4 atingiram  $DO_{600nm}$  de 0,8 a 1,0 em menor tempo, sendo assim candidatos a compor o BCT. Entretanto, os demais clones continuaram a ser submetidos aos outros testes a fim de escolher um dos clones com base no conjunto dos resultados.

**Tabela 8 - Cinética de crescimento dos clones avaliados para o BCT. Os valores mostrados são de densidade óptica a 600 nm ( $DO_{600nm}$ )**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>3 h</b>	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
<b>5 h</b>	0,001	0,006	0,009	0,007	0,004	0,002	0,005	0,004	0,004	0,004
<b>7 h</b>	0,010	0,035	0,055	0,041	0,025	0,015	0,032	0,020	0,018	0,024
<b>9 h</b>	0,075	0,200	0,265	0,227	0,163	0,099	0,186	0,124	0,102	0,148
<b>10,5 h</b>	0,238	0,477	0,581	0,530	0,394	0,282	0,446	0,326	0,284	0,363
<b>11 h</b>	0,314	0,598	0,740	0,655	0,512	0,380	0,566	0,434	0,386	0,466
<b>11,25 h</b>	0,371	0,673	<b>0,805</b>	0,746	0,580	0,433	0,618	0,484	0,436	0,523
<b>11,5 h</b>	0,423	0,741	0,910	<b>0,812</b>	0,643	0,487	0,672	0,550	0,483	0,582
<b>11,75 h</b>	0,479	0,800	-	-	0,708	0,540	0,743	0,592	0,531	0,633
<b>12,25 h</b>	0,609	0,989	-	-	0,888	0,690	0,915	0,726	0,648	0,770

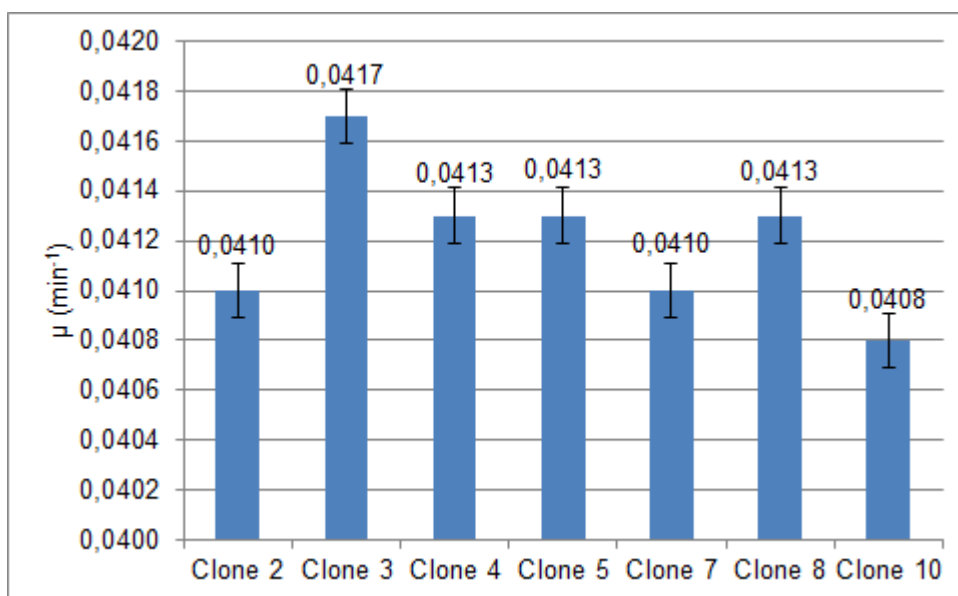
Fonte: Autoria própria



**Gráfico 5 - Cinética de crescimento dos clones avaliados**

Fonte: Autoria própria

As taxas específicas de crescimento microbiano médias ( $\mu$ ,  $\text{min}^{-1}$ ) foram calculadas somente para os clones que atingiram  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  superior a 0,7 durante o acompanhamento do crescimento e são apresentadas no Gráfico 6. O clone que apresentou maior  $\mu$  foi o 3, destacando-se dos demais.



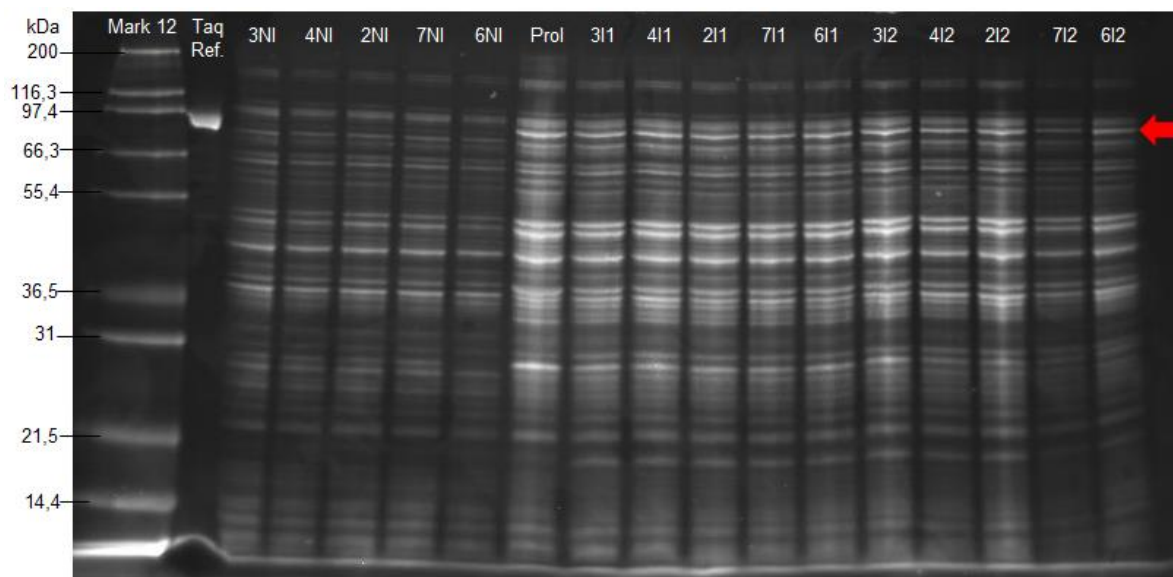
**Gráfico 6 - Taxas específicas de crescimento microbiano dos clones avaliados, com barras de erro padrão**

**Fonte: Autoria própria**

#### 4.1.3 Indução da Expressão da enzima Taq DNA Polimerase

A Figura 22 apresenta o resultado da expressão dos clones 3, 4, 2, 7 e 6, expondo os não induzidos e induzidos com 1 mM e 2 mM de IPTG. Na primeira coluna foi aplicado o marcador de peso molecular Mark 12 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), seguido da Taq DNA Polimerase Referência, clones não induzidos (NI), amostra referência induzida (Prol), clones induzidos com 1 mM de IPTG (I1) e clones induzidos com 2 mM de IPTG (I2). A altura da banda referente à Taq está assinalada com uma seta vermelha.

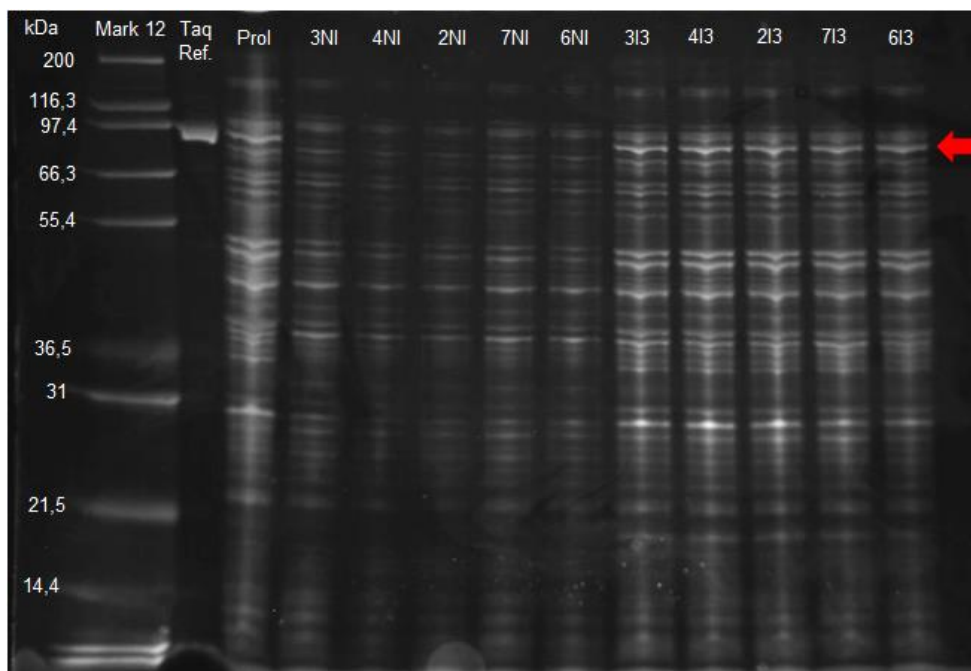




**Figura 22 - Resultado da indução da expressão dos clones avaliados, não induzidos e induzidos com 1 mM e 2 mM de IPTG**

**Fonte: Autoria própria**

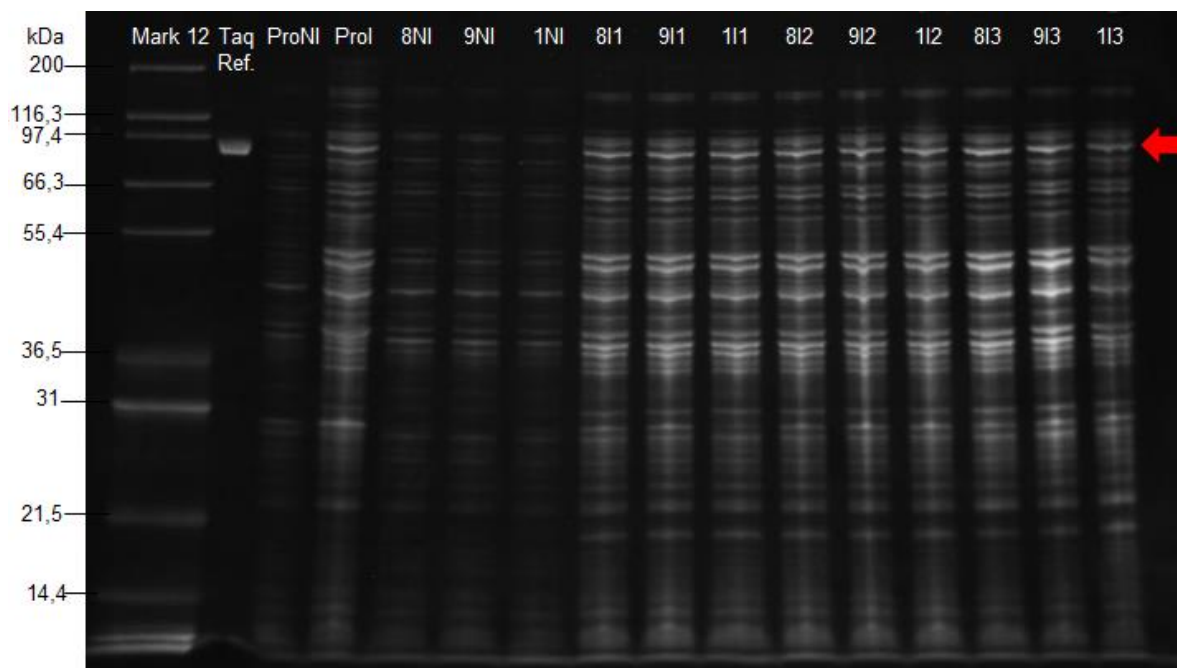
A Figura 23 apresenta o resultado da indução da expressão dos clones 3, 4, 2, 7 e 6, não induzidos e induzidos com 3 mM de IPTG. O marcador de peso molecular Mark 12 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foi aplicado na primeira coluna, seguido da Taq DNA Polimerase Referência (Roche, Basileia, Suíça), amostra referência induzida (Prol), clones não induzidos (NI) e clones induzidos com 3 mM de IPTG (I3). A seta vermelha assinala a altura da banda referente à Taq.



**Figura 23 - Resultado da indução da expressão dos clones avaliados, não induzidos e induzidos com 3 mM de IPTG**

**Fonte: A autoria própria**

A Figura 24 apresenta o resultado da indução da expressão dos clones 8, 9 e 1, não induzidos e induzidos com 1 mM, 2 mM e 3 mM de IPTG. Na primeira coluna foi aplicado o marcador de peso molecular Mark 12 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), seguido da Taq DNA Polimerase Referência (Roche, Basileia, Suíça), amostra referência não induzida (ProNI), amostra referência induzida (Prol), clones não induzidos (NI), clones induzidos com 1 mM de IPTG (I1), clones induzidos com 2 mM de IPTG (I2) e clones induzidos com 3 mM de IPTG (I3). A altura da banda referente à Taq está assinalada com uma seta vermelha.



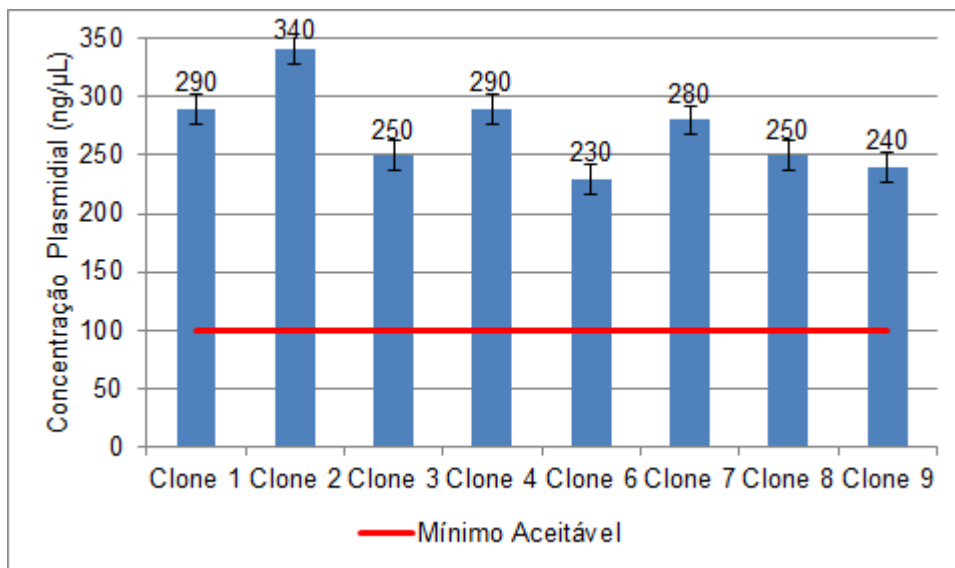
**Figura 24 - Resultado da indução da expressão dos clones avaliados, não induzidos e induzidos com 1 mM, 2 mM e 3 mM de IPTG**

**Fonte: Aatoria própria**

Foi demonstrado que todos os clones induzidos apresentaram a banda de 95 kDa referente à enzima Taq, ausente nos clones não induzidos, o que comprova a identidade do banco e sua qualificação para o fim proposto. Além disso, a variação na concentração de IPTG não evidenciou mudança na expressão. Os clones entre si apresentaram resultado muito similar, não sendo distinguível qual expressou mais a Taq. Assim, optou-se por fazer a extração de dosagem do DNA plasmidial somente das amostras induzidas a 1 mM de IPTG.

#### 4.1.4 Extração e Dosagem do DNA Plasmidial

O Gráfico 7 apresenta a dosagem plasmidial dos clones avaliados. Os plasmídeos extraídos de todos eles tiveram concentração superior a 100 ng/μL. O clone 2 teve maior concentração plasmidial dentre os clones avaliados, entretanto, não foi adequado para compor o BCT devido à sua baixa taxa específica de crescimento. De acordo com o teste de Grubbs (1969), com nível de significância 0,05, não há nenhum *outlier* entre as concentrações plasmidiais obtidas dos diferentes clones.

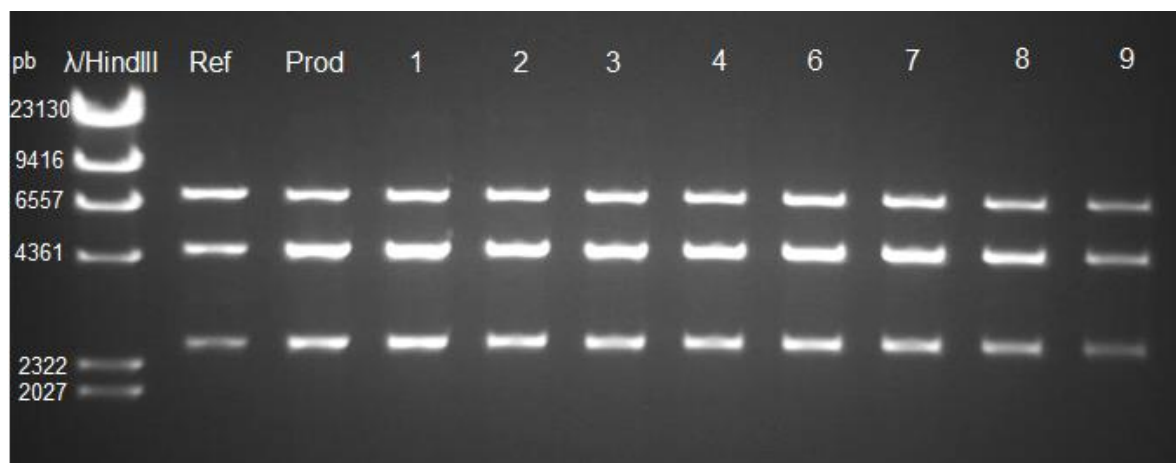


**Gráfico 7 - Concentração plasmidial dos clones avaliados, com barras de erro padrão**

**Fonte: Autoria própria**

#### 4.1.5 Análise de Restrição

A Figura 25 apresenta o resultado da digestão dos plasmídeos previamente extraídos dos clones avaliados, por minipreparação plasmidial. Em todos eles houve clivagem adequada, pois as bandas são de mesmo tamanho das obtidas pela clivagem do pBioMTaq referência, identificado como “Ref”. O plasmídeo pBioMTaq possui 7043 pb e o gene que codifica para a Taq tem 2507pb (Figura 2). Como as enzimas EcoRI e XbaI clivam nas extremidades do gene da Taq, resultam dois fragmentos, um de 2507 pb, e outro de 4536 pb, referente à região complementar. Os plasmídeos que não foram completamente digeridos ficam linearizados e aparecem na altura de 7043 pb.



**Figura 25 - Resultado da análise de restrição do plasmídeo pBioMTaq com as enzimas EcoRI e XbaI**

**Fonte: A autoria própria**

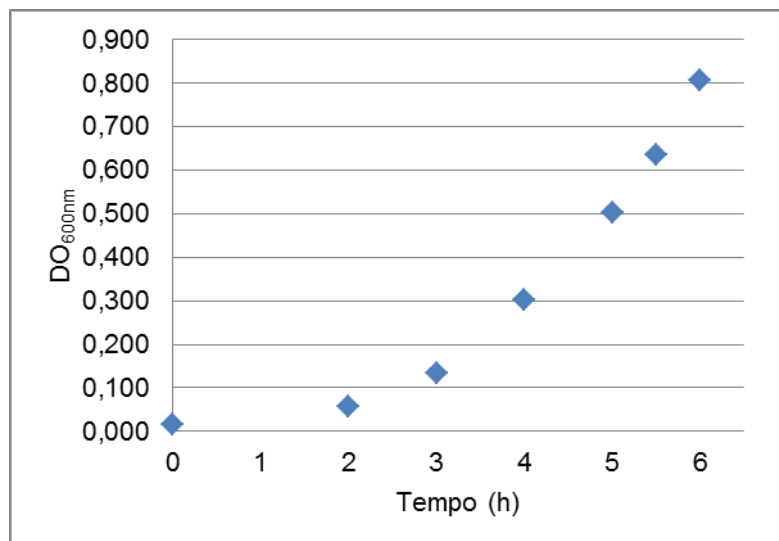
#### 4.1.6 Seleção do clone para compor o BCT

Quanto à cinética de crescimento, os clones que primeiro atingiram  $DO_{600nm}$  de 0,8 a 1,0 foram o 3 e o 4, nessa ordem. O clone 3 atingiu maior taxa específica de crescimento. Na indução da expressão da enzima Taq DNA Polimerase, o gel de eletroforese mostra que todos os clones expressaram a enzima, mas, não é possível distinguir visualmente quais expressaram mais. De acordo com o Teste de Grubbs (1969), com nível de significância 0,05, não há diferença significativa entre as concentrações plasmidiais obtidas dos diferentes clones. Assim, a dosagem plasmidial foi satisfatória, porém não auxilia no processo de seleção do clone para compor o BCT. Por fim, na análise de restrição todos os clones foram clivados corretamente, o que indica que as sequências de nucleotídeos que flanqueiam o gene estão corretas para os clones avaliados. Com isso, o clone 3 foi eleito para compor o BCT, sendo que o critério decisivo para isso foi a cinética de crescimento.

#### 4.1.7 Cultura Preparatória para Congelamento do BCT

O acompanhamento do crescimento do clone 3 para cultura preparatória do BCT apresentou resultado adequado, atingindo  $DO_{600nm}$  entre 0,8 e 1,0 após 6 horas de cultivo, conforme o Gráfico 8. A taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) foi de

0,0423/min. A  $\mu$  ideal seria 0,05/min (QIAGEN, 2009). Como a  $\mu$  obtida foi maior que 0,04/min, é considerada satisfatória.



**Gráfico 8 - Cinética de crescimento do clone 3 para cultura preparatória**

**Fonte: Autoria própria**

## 4.2 ESTUDO DE ESTABILIDADE DO BANCO DE CÉLULAS DE TRABALHO

### 4.2.1 Viabilidade Celular

O Gráfico 9 apresenta os valores de viabilidade celular de todos os cultivos ao longo dos meses.

Desde o estabelecimento (T0) até o quinto mês (T5) a viabilidade apresentou-se oscilante e aproximando-se do limiar de aceitação, pois metade das medições resultou em uma ordem de grandeza de  $10^6$  UFC/mL.

A partir do sexto mês (T6) foi adotado o método de descongelamento celular rápido, descrito no item 3.2.1, objetivando causar menos danos às células e com isso aumentar sua viabilidade, conforme explanado no item 2.4.1. Desde então a viabilidade celular se manteve superior a  $10^7$  UFC/mL. Com isso, infere-se que o novo método contribuiu positivamente para a reativação, metabolismo e reprodução das células.

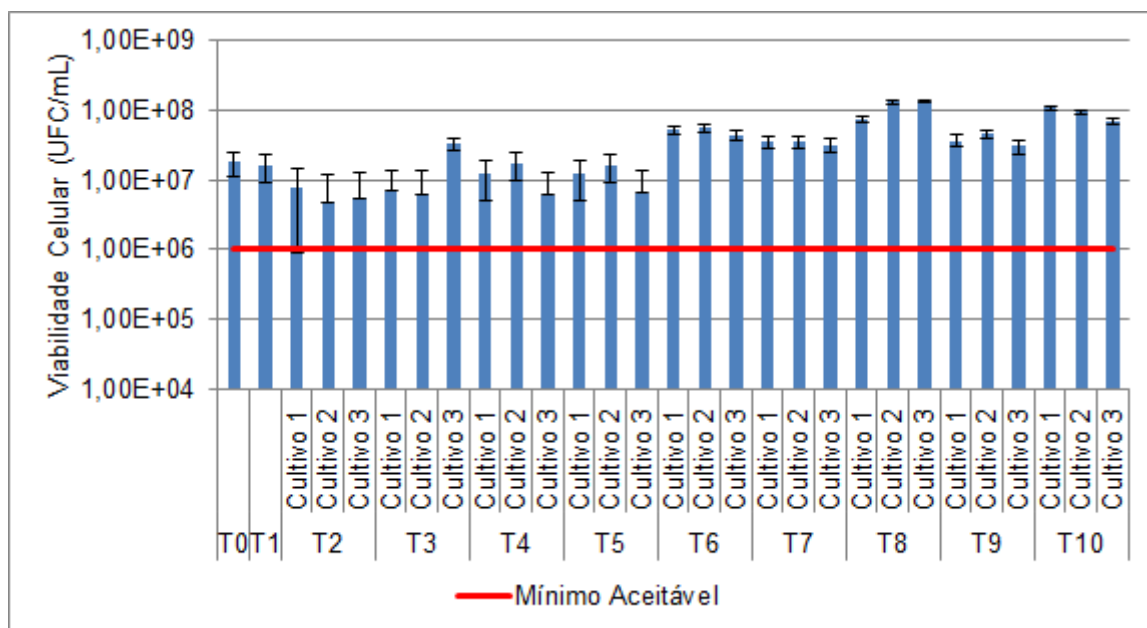
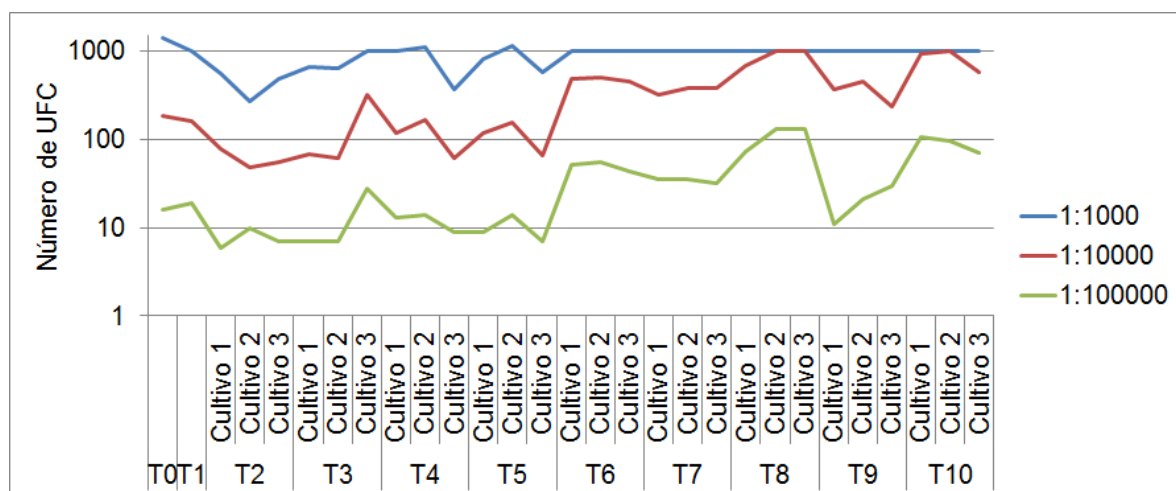


Gráfico 9 - Viabilidade celular ao longo do estudo de estabilidade, com barras de erro padrão

Fonte: Autoria própria

O Gráfico 10 apresenta o número médio de unidades formadoras de colônia (UFC) crescidas para a triplicata de cultivos avaliada em cada mês do estudo de estabilidade. Por motivos operacionais, fez-se somente a contagem até 1000 UFC. Houve uma flutuação na quantidade de UFC entre os cultivos avaliados. Entretanto, em relação às diluições os resultados são coerentes, pois na maioria dos cultivos, diluindo de  $10^{-3}$  para  $10^{-4}$  ou de  $10^{-4}$  para  $10^{-5}$  há uma queda de aproximadamente 10 vezes no número de UFC crescidas.



**Gráfico 10 - Número médio de UFC crescidas para a triplicata de cultivos avaliada em cada mês**

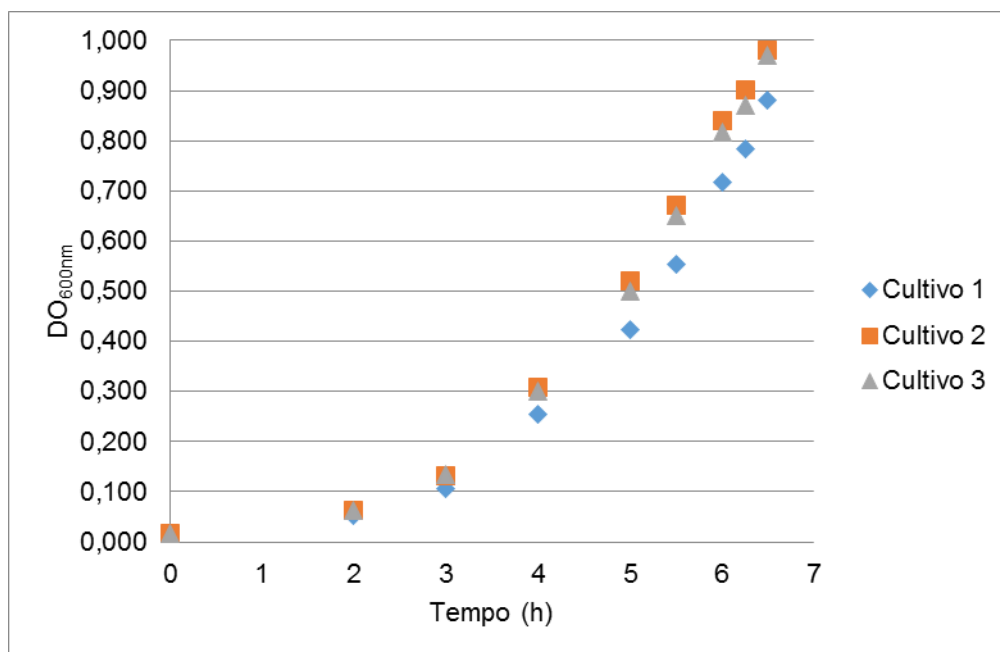
**Fonte: Autoria própria**

O fato de as colônias crescerem em placas de Petri com meio de cultura LB agar acrescido de ampicilina comprova a identidade e a pureza das células, visto que o plasmídeo possui em sua sequência um gene que lhe confere resistência à ampicilina, e somente as células que contêm o plasmídeo são aptas a crescer nesse meio de cultura. A viabilidade celular se manteve superior ao mínimo aceitável ( $1,0 \times 10^6$  UFC/mL) em todos os meses do estudo de estabilidade, o que comprova que as células permanecem com capacidade de realizar seu metabolismo e se reproduzir, assim sendo adequadas para uso no processo produtivo da enzima Taq.

#### 4.2.2 Cinética de Crescimento

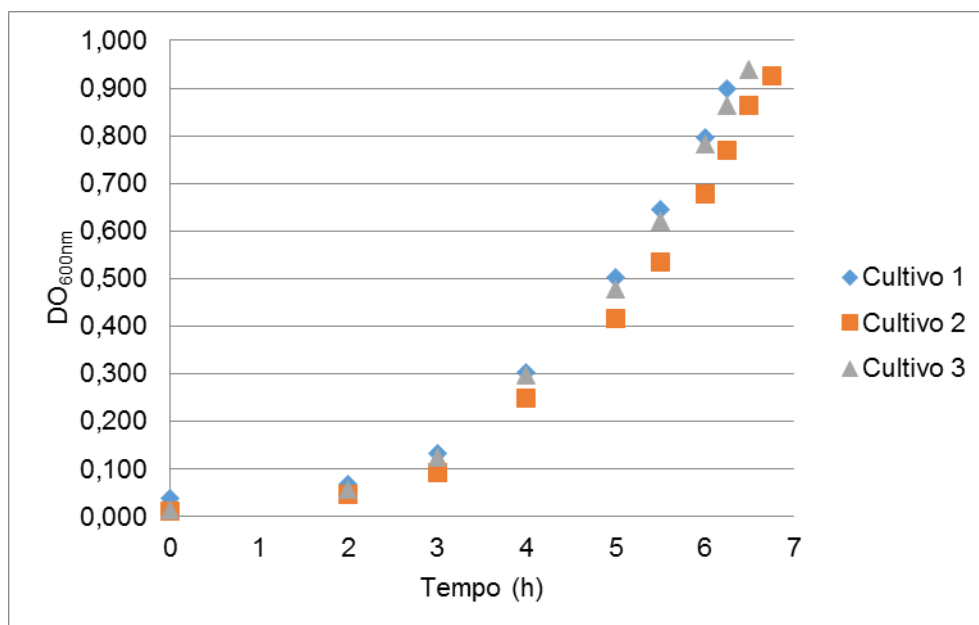
Ao longo dos 10 meses de estudo de estabilidade, o tempo para atingimento da densidade óptica a 600 nm de 0,8 a 1,0 se manteve entre 6 e 7 horas. Algumas curvas de crescimento são apresentadas do Gráfico 11 ao Gráfico 14. O Gráfico 11 apresenta a curva para a avaliação de T2, o Gráfico 12 a de T6, o Gráfico 13 a de T10 e o Gráfico 14 a junção das curvas de crescimento da triplicata de cultivos de cada mês de estudo, lembrando que em T0 e T1 os testes ainda não eram feitos em triplicata. No APÊNDICE A - são apresentados os Gráficos das curvas de crescimento de todos os meses avaliados.





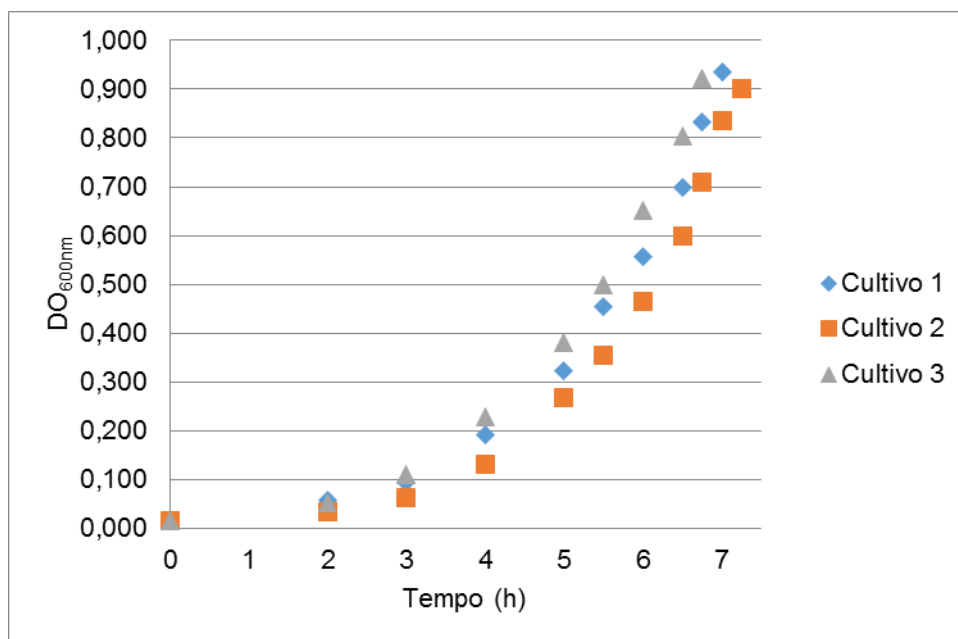
**Gráfico 11 - Curva de crescimento de T2**

Fonte: Autoria própria



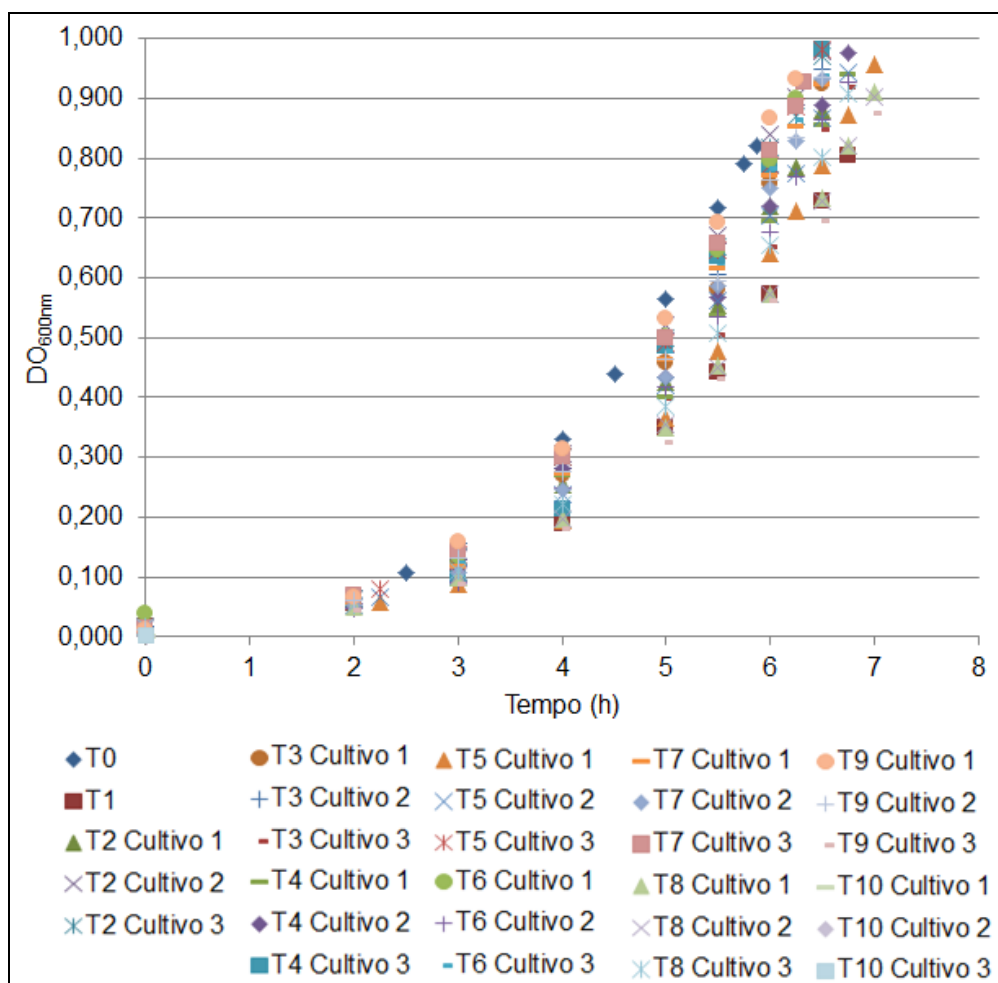
**Gráfico 12 - Curva de crescimento de T6**

Fonte: Autoria própria



**Gráfico 13 - Curva de crescimento de T10**

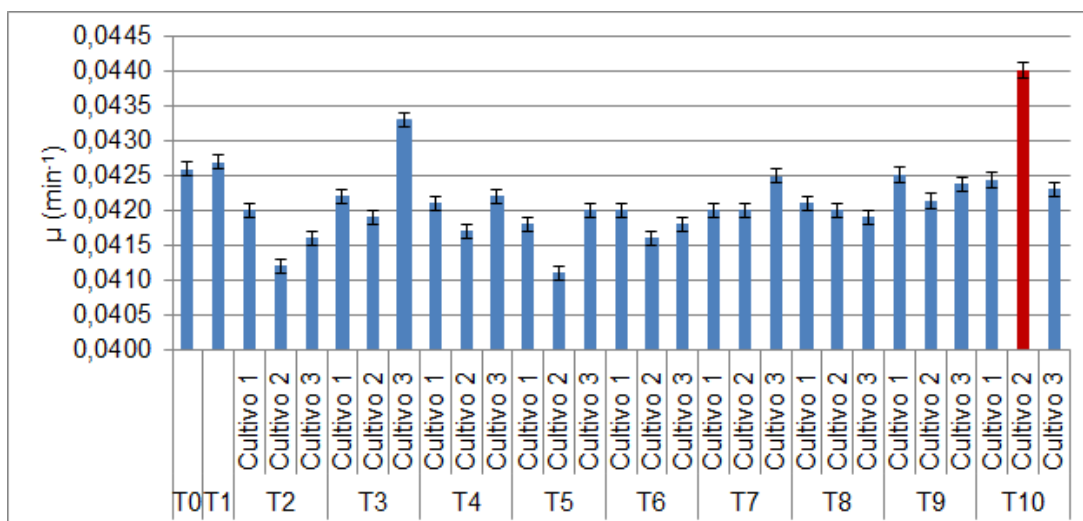
**Fonte: Autoria própria**



**Gráfico 14 - Curvas de Crescimento de T0 a T10**

**Fonte: Autoria própria**

A taxa específica de crescimento foi superior a  $0,04 \text{ min}^{-1}$  para a triplicata de cultivos em todos os meses (Gráfico 15). O teste de Grubbs (1969), com nível de significância 0,05, foi aplicado sobre todas as velocidades específicas de crescimento, de T0 a T10, e apontou somente um valor *outlier*, o  $0,0440 \text{ min}^{-1}$ , referente a um dos cultivos do décimo mês de estudo e sinalizado em vermelho no Gráfico 15. Tais resultados asseguram a homogeneidade e a repetitividade do crescimento das células. Como os cultivos crescem em meio 2 xYT acrescido de ampicilina, tem-se também a comprovação da identidade e da pureza das células.



**Gráfico 15 - Taxas Específicas de Crescimento de T0 a T10, com barras de erro padrão**

**Fonte: Autoria própria**

#### 4.2.3 Indução da Expressão da enzima Taq DNA Polimerase

A Figura 26 apresenta o resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida, com o marcador de peso molecular Mark 12 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), uma enzima Taq DNA Polimerase referência, produzida no IBMP e já purificada, e as amostras da triplicata de cultivos avaliados no sexto mês do estudo de estabilidade (T6). As setas vermelhas sinalizam a altura da banda referente à enzima Taq, com aproximadamente 95 kDa. Cada cultivo da triplicata, 1, 2 e 3, foi avaliado em sua forma não induzida (NI) e induzida (I) e em duplicata para cada uma das formas. No T6, e em todos os demais meses do estudo de estabilidade, os cultivos acrescidos de 1 mM de IPTG expressaram a enzima Taq DNA Polimerase, enquanto nos cultivos sem IPTG houve ausência de expressão. Esse resultado revela a qualificação das células para o fim proposto e assegura sua identidade, pois somente as que possuem o plasmídeo pBioMTaq em seu interior têm a capacidade de expressar a enzima Taq quando acrescidas de IPTG.

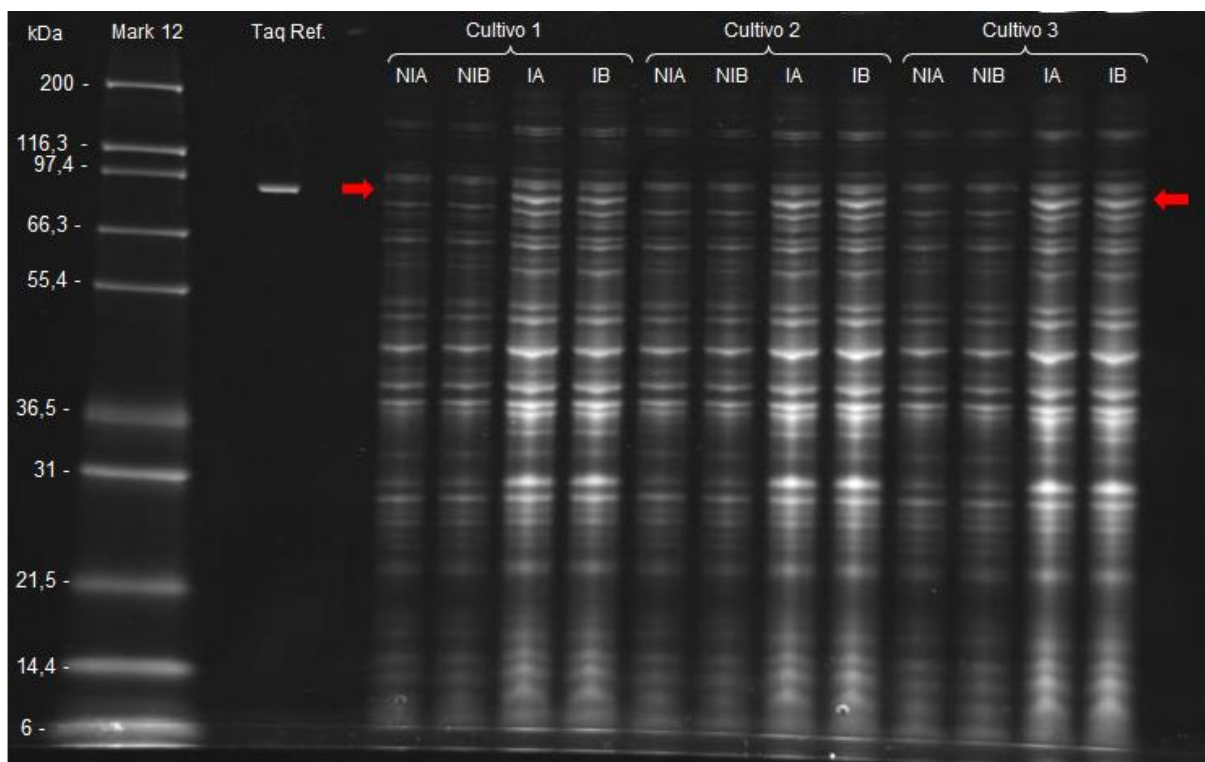


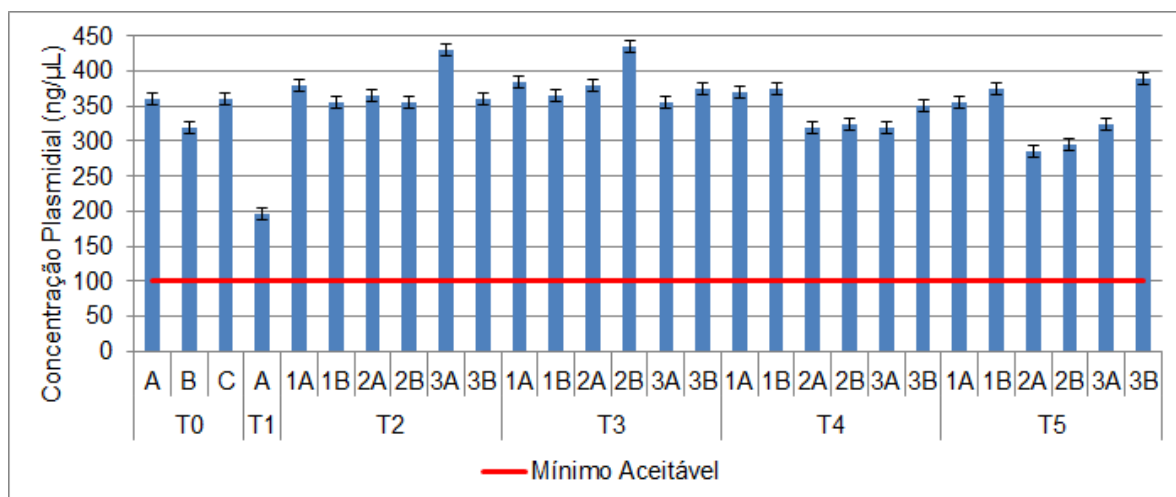
Figura 26 - Resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida para indução da expressão da enzima Taq DNA Polimerase

Fonte: Autoria própria

#### 4.2.4 Extração e Dosagem do DNA Plasmidial

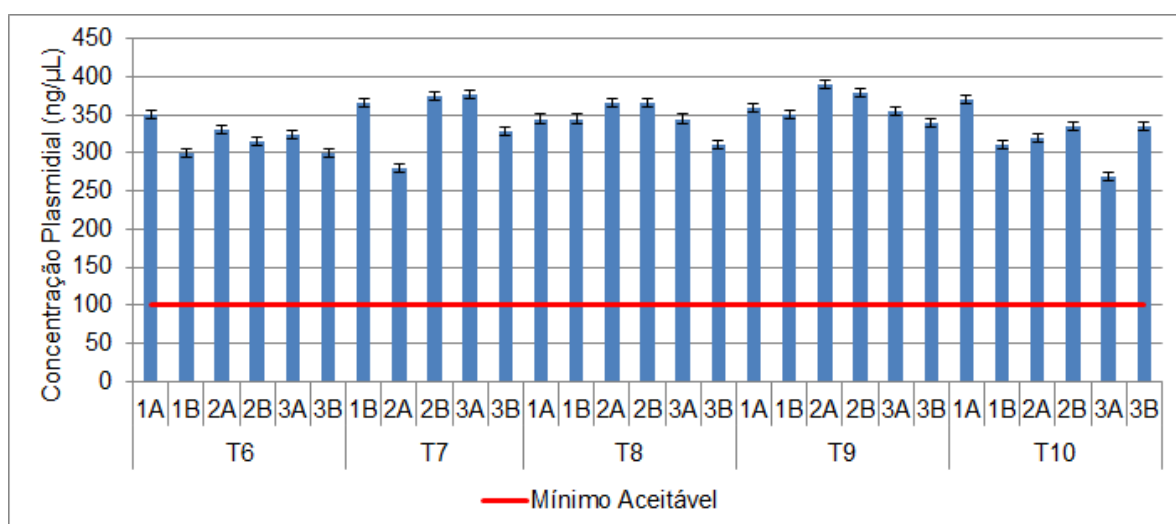
Todas as concentrações plasmidiais obtidas foram superiores a 100 ng/ $\mu$ L, portanto adequadas para utilização nos testes posteriores de avaliação da estabilidade do BCT e no processo produtivo. A dosagem plasmidial média ao longo dos 10 meses de estudo de estabilidade foi de 338 ng/ $\mu$ L.

Ao aplicar o teste de Grubbs (1969) para as concentrações obtidas, somente duas dentre as 59 avaliadas foram consideradas *outliers*, 126 ng/ $\mu$ L no T1 e 673 ng/ $\mu$ L em um dos cultivos de T7. No Gráfico 16 e no Gráfico 17 os resultados estão expostos excluindo os dois *outliers*.



**Gráfico 16 - Concentrações plasmidiais de T0 a T5, com barras de erro padrão**

Fonte: Autoria própria



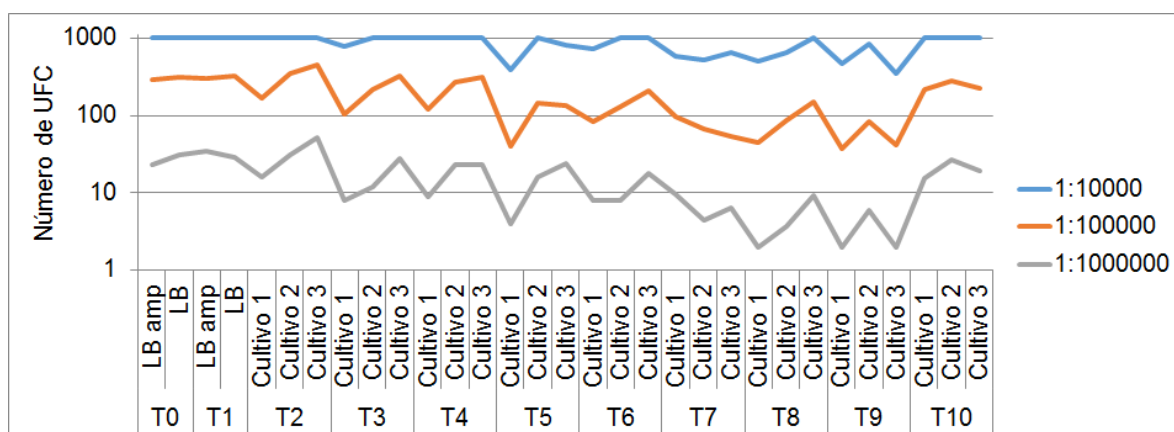
**Gráfico 17 - Concentrações plasmidiais de T6 a T10, com barras de erro padrão**

Fonte: Autoria própria

#### 4.2.5 Estabilidade Plasmídica

O Gráfico 18 mostra o número de UFC crescidas a partir dos cultivos sem indução com IPTG. A contagem é feita somente até 1000 UFC por motivos operacionais. Vale lembrar que em T0 e T1 o plaqueamento foi feito em LB agar e LB agar amp, calculando a estabilidade plasmídica diretamente desse resultado, sem o *picking and patching colonies*. Além disso, do T7 em diante os três cultivos líquidos avaliados foram crescidos em meio de cultura 2 xYT sem acréscimo de ampicilina.

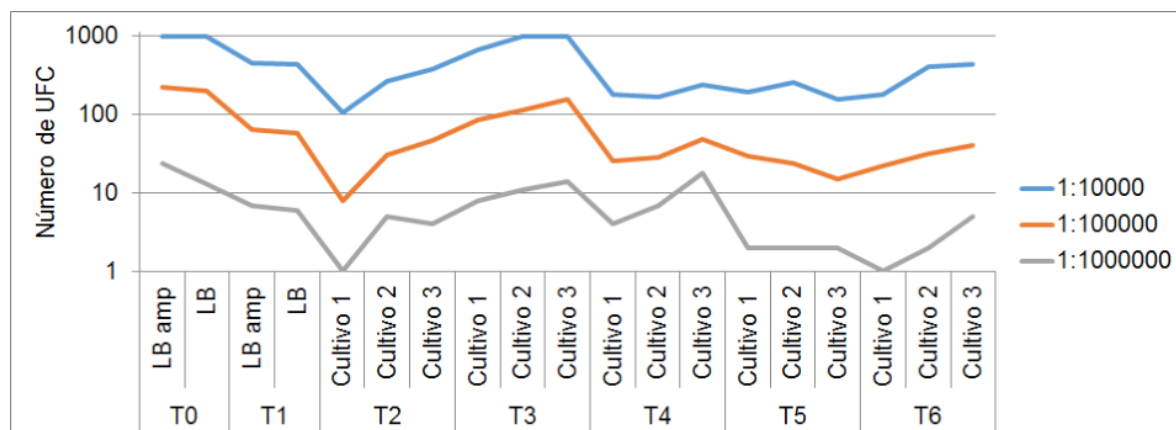
Apesar das flutuações nos valores de UFC obtidos de um cultivo para outro, em relação às diluições os resultados são coerentes, pois ao diluir 10 vezes (de  $10^{-4}$  para  $10^{-5}$  ou de  $10^{-5}$  para  $10^{-6}$ ) há uma respectiva queda de aproximadamente 10 vezes no número de UFC.



**Gráfico 18 - Número de UFC crescidas a partir dos cultivos sem indução com IPTG**

**Fonte: Autoria própria**

O Gráfico 19 apresenta o número de UFC crescidas a partir dos cultivos pós-indução com IPTG, até o T6, visto que após esse mês o estudo foi modificado, conforme citado anteriormente. As flutuações nos valores de UFC obtidos de um cultivo para outro são maiores que nos cultivos sem indução (Gráfico 18). Isso provavelmente é devido à própria adição de IPTG ao meio (CHAVES et al, 1999) e às 16 horas de indução, que acontecem depois de o cultivo ter atingido  $DO_{600nm}$  entre 0,8 e 1,0, ou seja, as 16 horas se iniciam na fase exponencial e seguem para as fases estacionária e de declínio. O cultivo nessas fases finais possui células antigas, sem boa capacidade metabólica, e células mortas, fazendo com que, ao serem espalhadas em placas de Petri com meio LB, resultem em crescimento de UFC sem padrão definido. Quanto às diluições, os resultados permanecem relativamente coerentes, havendo diminuição de cerca de 10 vezes na quantidade de UFC crescidas ao diluir de  $10^{-4}$  para  $10^{-5}$  ou de  $10^{-5}$  para  $10^{-6}$ .



**Gráfico 19 - Número de UFC crescidas a partir dos cultivos pós-indução com IPTG**

Fonte: Autoria própria

A estabilidade plasmídica foi calculada de acordo com a equação (4), apresentada no item 2.6.2. A Tabela 9 apresenta os resultados dos tempos T0 e T1, calculados diretamente a partir das UFC crescidas nas placas dos cultivos, sem o *picking and patching colonies*.

**Tabela 9 - Estabilidade plasmídica em T0 e T1**

	T0	T1
<b>Pré-indução com IPTG</b>	91,2%	94,2%
<b>Pós-indução com IPTG</b>	112,7%	110,4%

Fonte: Autoria própria

Os resultados foram satisfatórios, pois a estabilidade plasmídica foi superior a 85% tanto antes quanto após a indução com IPTG, nos dois meses avaliados. A estabilidade plasmídica ideal é de 100%, ou seja, na placa com ampicilina deve crescer o mesmo número de colônias da placa sem ampicilina. Pois, na placa sem ampicilina todas as bactérias são aptas a crescer, tanto as resistentes à ampicilina quanto as não resistentes. E, na placa com ampicilina crescem somente as bactérias que permanecem com o plasmídeo em seu interior, visto que nele há uma sequência genética que confere resistência à ampicilina. Assim, o crescimento de igual número de colônias em uma e outra placa indicam que todas elas possuem o plasmídeo pBioMTaq. O crescimento de mais colônias na placa sem ampicilina que na placa com ampicilina indica que houve perda plasmidial, resultando em porcentagem inferior a 100%. De acordo com PACHECO (2013), estabilidades plasmídicas



superiores a 85% são consideradas satisfatórias. Entretanto, porcentagens que ultrapassam 100% são devidas ao maior número de UFCs crescidas na placa com ampicilina em relação à sem ampicilina, o que, conforme explanado, é um resultado fora do esperado. A seguir são apresentadas algumas possíveis causas para esse acontecimento:

- Diferentes lotes de meio de cultura. Os lotes de LB agar e de LB agar amp são distintos e há a possibilidade de que o LB agar amp estivesse mais propício ao crescimento bacteriano, ou o LB agar menos propício, devido à forma como foram preparados, ou seja, composição, qualidade dos reagentes, entre outros fatores.

- Imprecisão na pipetagem do cultivo na placa. A pipetagem realizada inadequadamente, por erro de operador ou falta de calibração da micropipeta, pode levar a aspiração e dispensa de volumes diferentes do ajustado. Com isso, a placa LB agar amp pode ter recebido mais colônias que a LB agar.

- Falta de homogeneidade na cultura pipetada. O cultivo original passou por uma diluição seriada antes de ser plaqueado. Os microtubos contendo o cultivo diluído possuem número muito menor de células que o frasco original, e, para que em duas pipetagens distintas com mesmo volume ajustado seja aspirada uma quantidade relativamente igual de células, é necessário que a cultura esteja completamente homogênea. Isso pode não ter acontecido, já que as células precipitam, e pode ter sido pipetado um maior número de bactérias no meio LB agar amp que no LB agar. Além disso, outros fatores relacionados à execução do procedimento podem ter ocasionado esse resultado.

A partir do segundo mês (T2), o método para determinação da estabilidade plasmídica foi alterado com o propósito de obter resultados mais coerentes e repetitivos. A técnica *picking and patching colonies* adotada (descrita no item 3.2.4) se mostrou menos vulnerável a erros aleatórios de procedimento. Desde então, houve crescimento das 50 colônias transferidas para as duas placas, LB agar amp e LB agar, em todos os cultivos da triplicata de todos os meses subsequentes do estudo. A Figura 27 apresenta o resultado do sétimo mês de estudo, com o crescimento de 50 UFC em ambas as placas LB agar, com e sem ampicilina, sendo que esse resultado foi o mesmo para todos os demais meses, de T2 a T10.

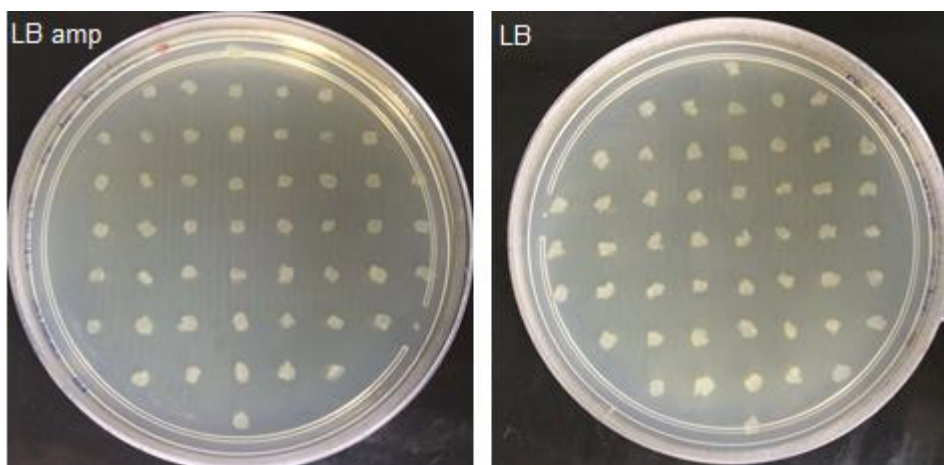


Figura 27 – Crescimento de 50 UFC em ambas as placas LB agar com e sem ampicilina.

Fonte: Autoria própria

Assim, o cálculo passou a ser o exposto na equação (9):

$$\text{Estabilidade Plasmídica (\%)} = \frac{50 \text{ UFC crescidas em LB amp}}{50 \text{ UFC crescidas em LB}} \cdot 100 \quad (9)$$

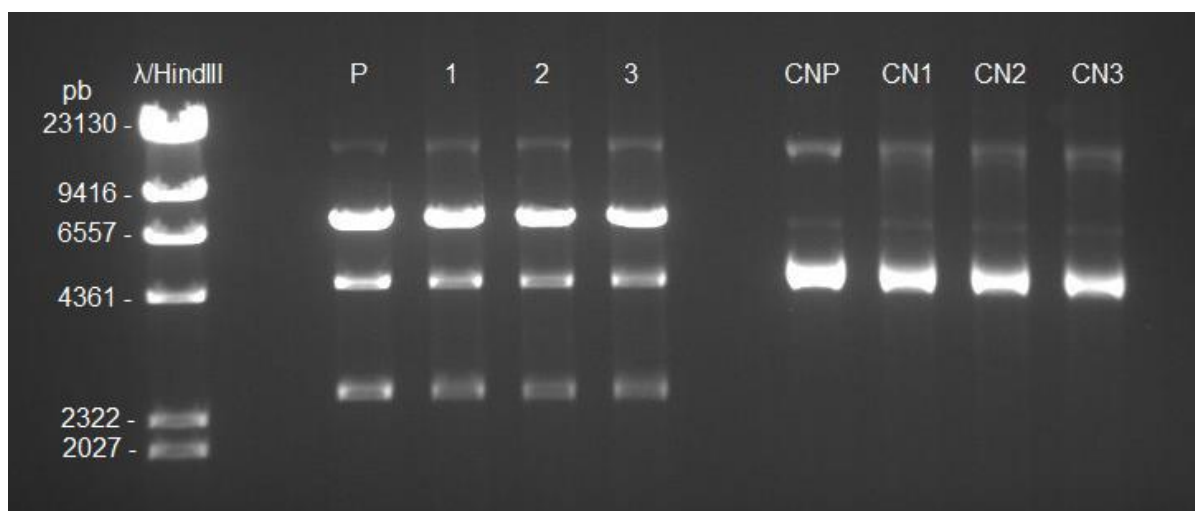
Com isso, a estabilidade plasmídica de T2 a T10 se manteve em 100%, indicando que o plasmídeo pBioMTaq permanece estável no interior das células e com boa capacidade de replicação.

#### 4.2.6 Análise de Restrição

A Figura 28 é o resultado da análise de restrição do nono mês (T9) do estudo de estabilidade, sendo que para os demais meses obteve-se o mesmo resultado. Utiliza-se o marcador de peso molecular  $\lambda$ HindIII; as quatro primeiras amostras aplicadas no gel de agarose são os plasmídeos tratados com EcoRI e XbaI. Na Figura 28, “P” se refere ao plasmídeo referência e “1”, “2”, “3” aos plasmídeos extraídos dos respectivos cultivos (triplicata do estudo de estabilidade). As quatro últimas amostras aplicadas são os controles negativos do plasmídeo referência (“CNP”) e dos plasmídeos extraídos dos cultivos (“CN1”, “CN2”, “CN3”). A digestão dos plasmídeos com as endonucleases EcoRI e XbaI resultou na liberação dos dois fragmentos esperados: um de 2507 pb, referente ao gene que codifica a BioMTaq, e outro de 4536 pb, referente à região complementar (Figura 2). Os plasmídeos que não foram completamente digeridos ficam linearizados e aparecem

com 7043 pb. Nos controles negativos as bandas na altura de 4500 pb evidenciam o DNA plasmidial super enovelado.

Durante os 10 meses de estudo de estabilidade, os plasmídeos foram corretamente clivados pelas enzimas de restrição, comprovando que as sequências flanqueadoras do gene que expressa a enzima Taq estão íntegras e que o plasmídeo permanece com seu tamanho original.

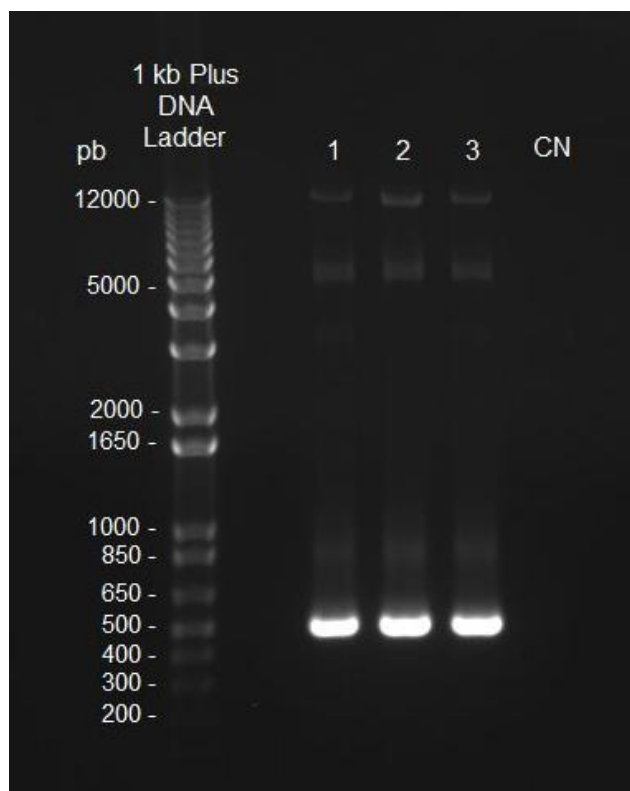


**Figura 28 - Resultado da análise de restrição dos plasmídeos pBioMTaq**

**Fonte: Autoria própria**

#### 4.2.7 Avaliação Plasmidial por PCR

A Figura 29 apresenta o resultado da eletroforese em gel de agarose do nono mês do estudo de estabilidade, sendo que nos demais meses o resultado foi igualmente satisfatório. Utiliza-se o marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder. Na Figura 29, “1”, “2” e “3” são os produtos da amplificação dos plasmídeos extraídos dos cultivos induzidos 1, 2 e 3; e “CN” é o controle negativo da reação. Ao longo dos 10 meses do estudo de estabilidade, a reação em cadeia da polimerase apresentou repetibilidade nos resultados, pois em todos os testes ocorreu a correta amplificação do fragmento de 500 pares de base do plasmídeo pBioMTaq, com o uso dos iniciadores POL2000F e o POL2500R. Assim, demonstra-se que o plasmídeo se mantém íntegro e estável, com sequências compatíveis com sua construção original.



**Figura 29 - Resultado da Avaliação Plasmidial**

**Fonte: Autoria própria**

### 4.3 BCT APLICADO EM PROCESSO PRODUTIVO DA TAQ DNA POLIMERASE

#### 4.3.1 Processo Produtivo

Nos itens a seguir são apresentados os resultados do processo de fermentação da enzima Taq DNA Polimerase utilizando como substrato o BCT.

##### 4.3.1.1 Pré-inóculo

O crescimento bacteriano do pré-inóculo foi acompanhado através de uma cinética, por medição da  $DO_{600nm}$ , e os resultados são apresentados na Tabela 10 e no Gráfico 20.

Tabela 10 - Crescimento dos dois cultivos avaliados para pré-inóculo

Tempo (h)	DO <sub>600nm</sub>	
	Cultivo 1	Cultivo 2
0	0,020	0,012
2	0,100	0,085
3	0,209	0,189
4	0,449	0,424
4,2	0,486	0,469
4,5	0,601	0,586
4,7	0,652	0,641
5	0,817	0,774
5,2	0,883	0,859

Fonte: Autoria própria

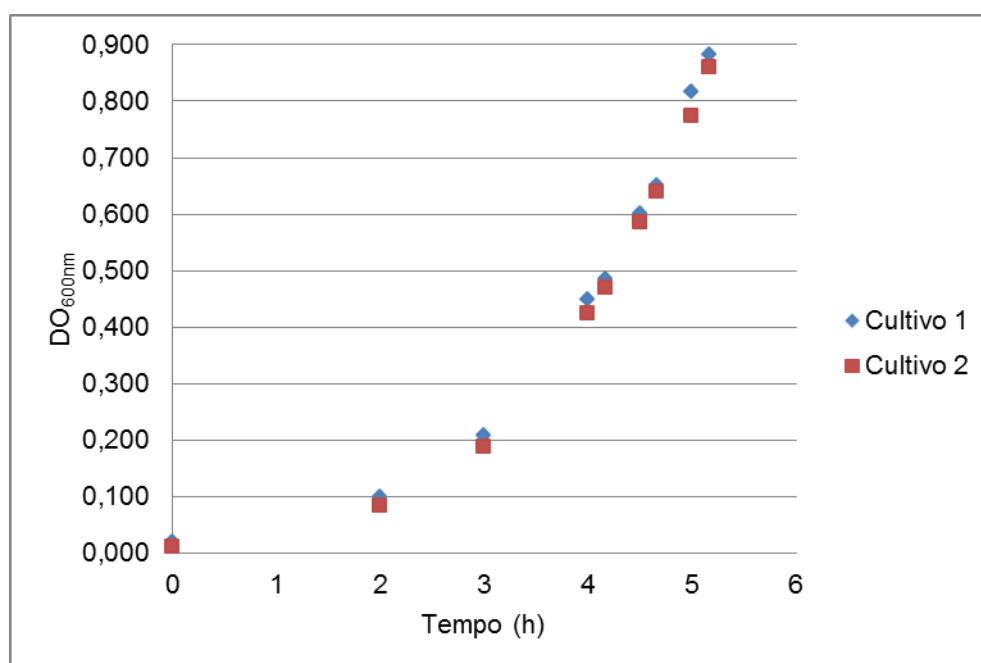


Gráfico 20 - Curva de crescimento dos dois cultivos avaliados para pré-inóculo

Fonte: Autoria própria

As velocidades específicas de crescimento da duplicata de cultivos estão expostas na Tabela 11. Em relação aos resultados do estabelecimento e estudo de estabilidade do BCT, a DO<sub>600nm</sub> entre 0,8 e 1,0 do pré-inóculo foi atingida mais rapidamente e as velocidades específicas de crescimento foram superiores. Isso pode ter ocorrido devido: à alteração no modelo da incubadora utilizada, que pode ter promovido maior estabilidade na temperatura; ao lote do meio de cultura e/ou a outros fatores relacionados às condições de cultivo.

**Tabela 11 - Taxas específicas de crescimento do pré-inóculo**

	<b>Cultivo 1</b>	<b>Cultivo 2</b>
<b><math>\mu</math> (min<sup>-1</sup>)</b>	0,0452	0,0443

Fonte: Autoria própria

O cultivo 1 foi escolhido para ser utilizado como inóculo para a cultura preparatória devido ao fato de ter atingido a  $DO_{600nm}$  entre 0,8 e 1,0 em menor tempo e por ter apresentado taxa específica de crescimento superior ao cultivo 2.

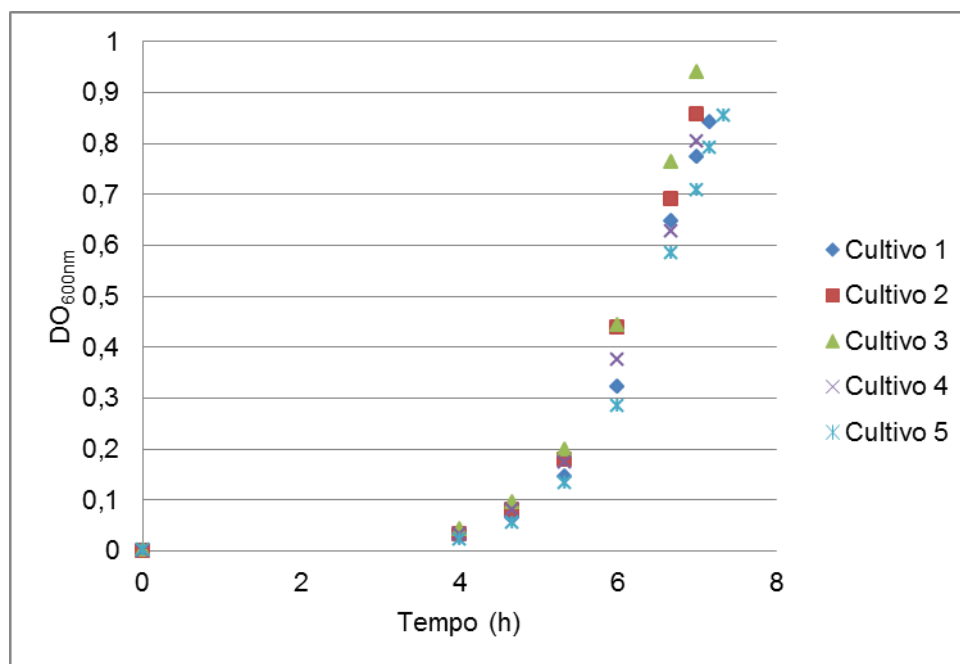
#### 4.3.1.2 Crescimento da cultura preparatória

De acordo com o procedimento operacional padrão do IBMP, para que o crescimento da cultura preparatória seja considerado satisfatório, o atingimento da  $DO_{600nm}$  entre 0,8 e 1,0 deve ocorrer em até 9 horas de cultivo (IBMP, 2016). A Tabela 12 e o Gráfico 21 apresentam o crescimento dos cinco cultivos da cultura preparatória, sendo que o tempo para atingir a  $DO_{600nm}$  desejada variou de 7 horas a 7 horas e 20 minutos, sendo, portanto, satisfatório.

**Tabela 12 - Densidades ópticas a 600 nm da cultura preparatória**

<b>Tempo (h)</b>	<b><math>DO_{600nm}</math></b>				
	<b>Cultivo 1</b>	<b>Cultivo 2</b>	<b>Cultivo 3</b>	<b>Cultivo 4</b>	<b>Cultivo 5</b>
0	0,000	0,000	0,002	0,000	0,002
4	0,028	0,034	0,044	0,034	0,023
4,7	0,066	0,081	0,096	0,081	0,056
5,3	0,146	0,178	0,200	0,174	0,134
6	0,323	0,438	0,443	0,377	0,286
6,7	0,647	0,692	0,765	0,629	0,584
7	0,773	0,858	0,941	0,804	0,708
7,2	0,842	-	-	-	0,793
7,3	-	-	-	-	0,855

Fonte: Autoria própria



**Gráfico 21 - Curvas de crescimento dos cultivos da cultura preparatória**

Fonte: Autoria própria

#### 4.3.1.3 Crescimento em biorreator Wave

O cultivo de 25 litros em biorreator teve seu crescimento acompanhado através da medição da  $DO_{600nm}$ . O tempo para atingir a densidade óptica equivalente à fase exponencial do crescimento foi de 2 horas e 30 minutos, conforme evidenciado na Tabela 13. Esse tempo condiz com o esperado, de acordo com resultados anteriormente obtidos no IBMP em processos fermentativos nas mesmas condições (IBMP, 2016).

**Tabela 13 - Acompanhamento da densidade óptica a 600nm do cultivo em biorreator**

Tempo (h)	$DO_{600nm}$
0	0,120
2	0,706
2,25	0,769
2,5	0,873

Fonte: Autoria própria

A  $DO_{600nm}$  da cultura ao término do período de 16 horas de indução da expressão da enzima Taq com IPTG foi de 3,27. A Tabela 14 apresenta a pesagem

dos pacotes plásticos contendo biomassa. Os resultados condizem com os previamente obtidos em fermentações de 25 litros sob as mesmas condições, no IBMP (IBMP, 2016).

**Tabela 14 - Pesagem dos pacotes plásticos contendo biomassa**

	<b>Pacote 1</b>	<b>Pacote 2</b>	<b>Pacote 3</b>
<b>Massa (g)</b>	32,3	33,0	31,4

Fonte: Autoria própria

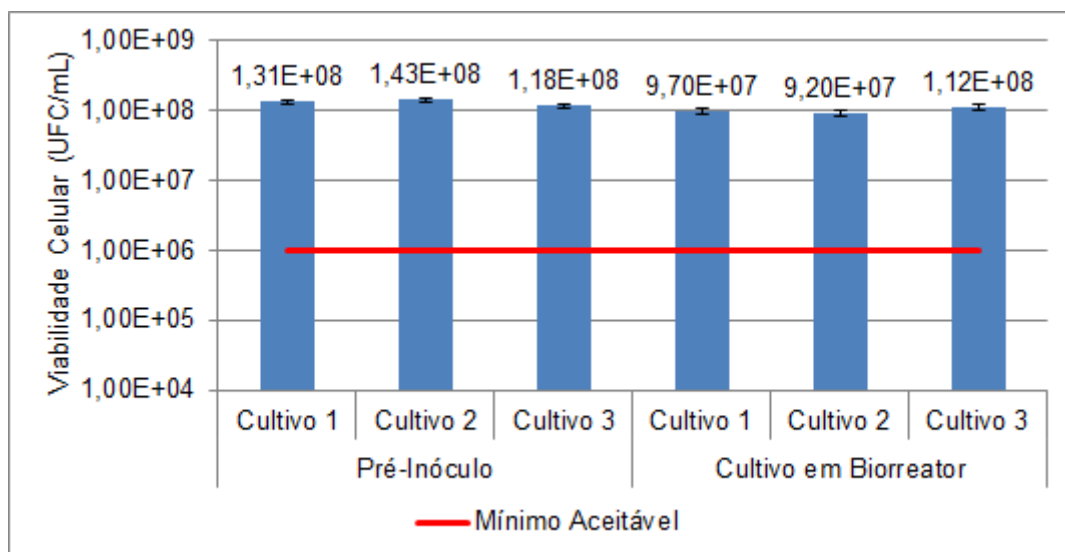
#### 4.3.2 Caracterização das células

A seguir são apresentados e discutidos os resultados da caracterização das células do BCT durante as etapas do processo fermentativo fabril típico do IBMP.

##### 4.3.2.1 Viabilidade Celular

O Gráfico 22 apresenta os valores de viabilidade celular da triplicata de cultivos provenientes do pré-inóculo e do cultivo em biorreator. Obteve-se viabilidade celular superior ao mínimo aceitável ( $1,0 \times 10^6$  UFC/mL) para todos os cultivos avaliados, comprovando que as células permanecem com capacidade de realizar seu metabolismo e se reproduzir. Conforme exposto no item 4.2.1, o resultado satisfatório do teste de viabilidade celular confirma a identidade e a pureza das células.

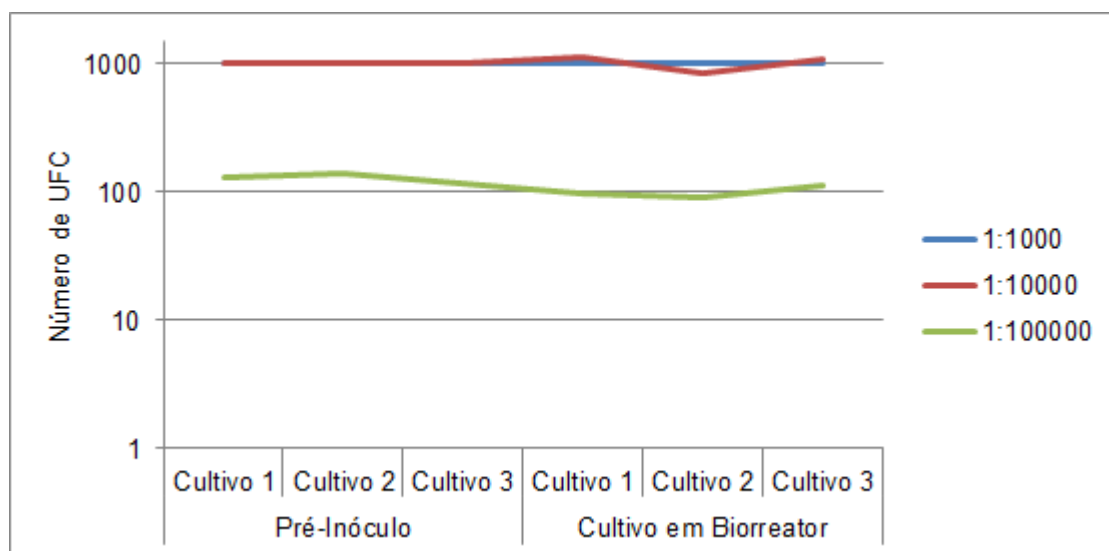




**Gráfico 22 - Viabilidade celular da triplicata de cultivos provenientes do pré-inóculo e do cultivo em biorreator, com barras de erro padrão**

Fonte: Autoria própria

O Gráfico 23 apresenta o número médio de unidades formadoras de colônia (UFC) crescidas para a triplicata de cultivos provenientes do pré-inóculo e do cultivo em biorreator. A contagem é feita somente até 1000 UFC por motivos operacionais. Nota-se que a quantidade de UFC crescidas é muito similar entre a triplicata de cultivos, e que praticamente não varia entre os provindos do pré-inóculo e do cultivo em biorreator. Além disso, em relação às diluições os resultados também são coerentes, pois, diluindo de  $10^{-3}$  para  $10^{-4}$  ou de  $10^{-4}$  para  $10^{-5}$  há uma queda de aproximadamente 10 vezes no número de UFC.

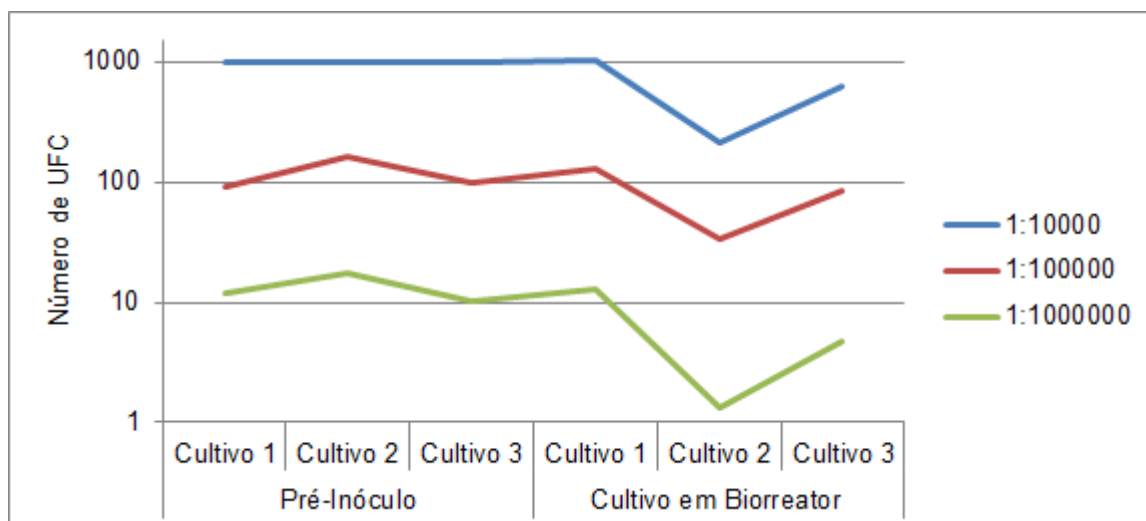


**Gráfico 23 - Número médio de UFC crescidas no teste de viabilidade celular na triplicata de cultivos provenientes do pré-inóculo e do cultivo em biorreator**

Fonte: A autoria própria

#### 4.3.2.2 Estabilidade Plasmídica

O Gráfico 24 mostra o número de UFC crescidas da triplicata de cultivos provenientes do pré-inóculo e do cultivo em biorreator. Por motivos operacionais, faz-se somente a contagem até 1000 UFC. Apesar das flutuações nos valores de UFC obtidos de um cultivo para outro, em relação às diluições os resultados são coerentes, pois ao diluir 10 vezes (de  $10^{-4}$  para  $10^{-5}$  ou de  $10^{-5}$  para  $10^{-6}$ ) há uma respectiva queda de aproximadamente 10 vezes no número de UFC.



**Gráfico 24 - Número médio de UFC crescidas no teste de estabilidade plasmídica na triplicata de cultivos provenientes do pré-inóculo e do cultivo em biorreator**

Fonte: Autoria própria

Após o *picking and patching colonies*, a estabilidade plasmídica é calculada de acordo com a equação (9), apresentada no item 4.2.5. Houve crescimento das 50 colônias transferidas para as duas placas - LB agar e LB agar amp - em todos os cultivos avaliados, resultando em estabilidade plasmídica de 100%. Com isso, infere-se que o plasmídeo pBioMTaq se mantém estável no interior das células e com boa capacidade de replicação.

#### 4.3.2.3 Cinética de Crescimento

O Gráfico 25 e o Gráfico 26 apresentam as curvas de crescimento das triplicatas de cultivos provenientes dos criotubos congelados após o atingimento da  $DO_{600nm}$  entre 0,8 e 1,0 do pré-inóculo e do cultivo em biorreator, respectivamente. Em ambos, o crescimento se deu em 6 horas e 30 minutos, condizendo com os resultados obtidos mensalmente no estudo de estabilidade do BCT.

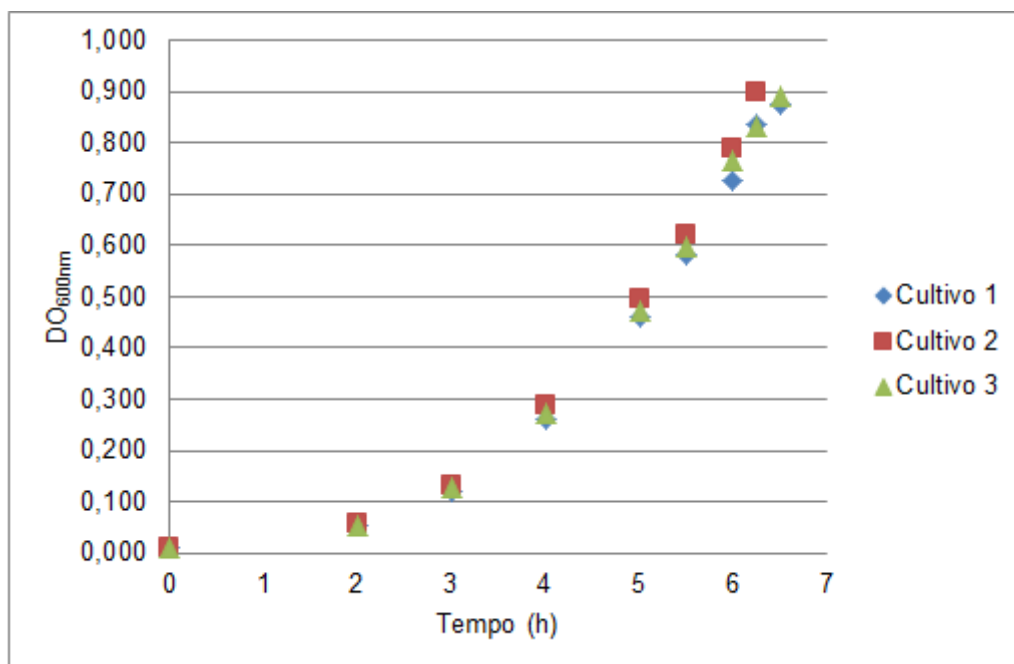


Gráfico 25 - Curva de crescimento da triplicata de cultivos provenientes do pré-inóculo

Fonte: Autoria própria

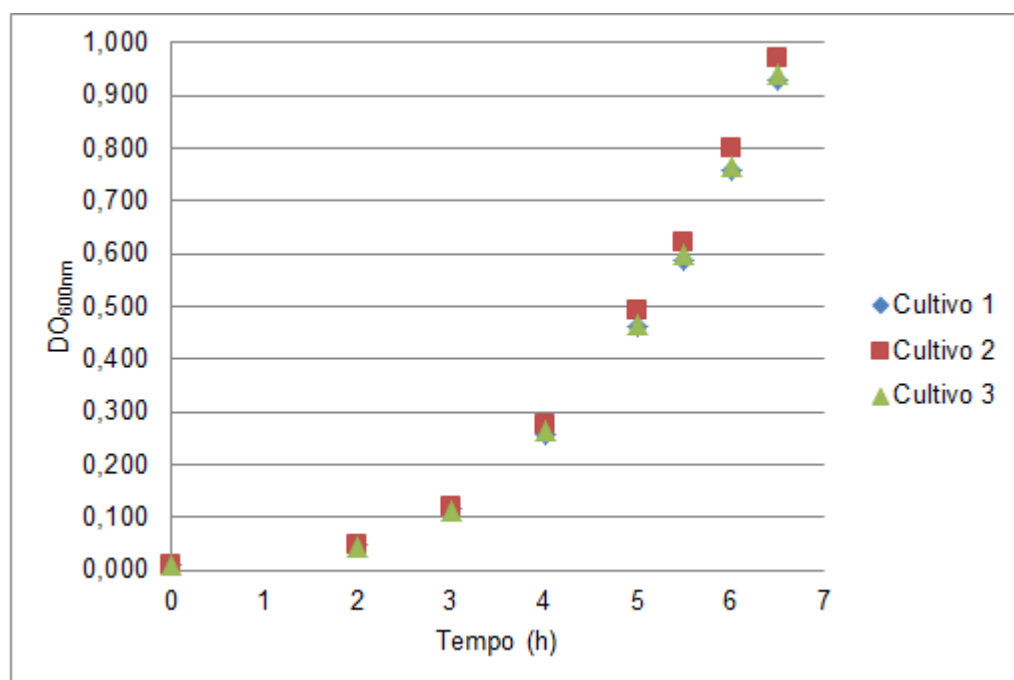


Gráfico 26 - Curva de crescimento da triplicata de cultivos provenientes do cultivo em biorreator

Fonte: Autoria própria

A Tabela 15 mostra as velocidades específicas de crescimento obtidas. Como todas foram superiores a  $0,04 \text{ min}^{-1}$ , são consideradas satisfatórias (QIAGEN, 2009).

**Tabela 15 - Velocidades específicas de crescimento da triplicata de cultivos provenientes do pré-inóculo e do cultivo em biorreator, em  $\text{min}^{-1}$**

	$\mu \text{ (min}^{-1}\text{)}$		
	Cultivo 1	Cultivo 2	Cultivo 3
<b>Pré-Inóculo</b>	0,0414	0,0420	0,0413
<b>Cultivo em Biorreator</b>	0,0421	0,0418	0,0421

Fonte: Autoria própria

#### 4.3.2.4 Indução da expressão da enzima Taq DNA Polimerase

Em todas as etapas em que foram avaliados, os cultivos que foram acrescidos de 1 mM de IPTG expressaram a enzima Taq DNA Polimerase, já nos cultivos sem esse acréscimo houve ausência de expressão.

A Figura 30 e a Figura 31 apresentam os resultados da eletroforese em gel de poliacrilamida da etapa do pré-inóculo e em biorreator pré-indução com IPTG, respectivamente. O marcador de peso molecular Mark 12 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foi aplicado na primeira coluna, seguido da enzima Taq DNA Polimerase referência, já purificada, e das amostras da triplicata de cultivos provenientes do pré-inóculo. As setas vermelhas sinalizam a altura da banda referente à enzima Taq, com aproximadamente 95 kDa. Os cultivos foram avaliados antes (NI) e após a adição de IPTG (I) e em duplicata.

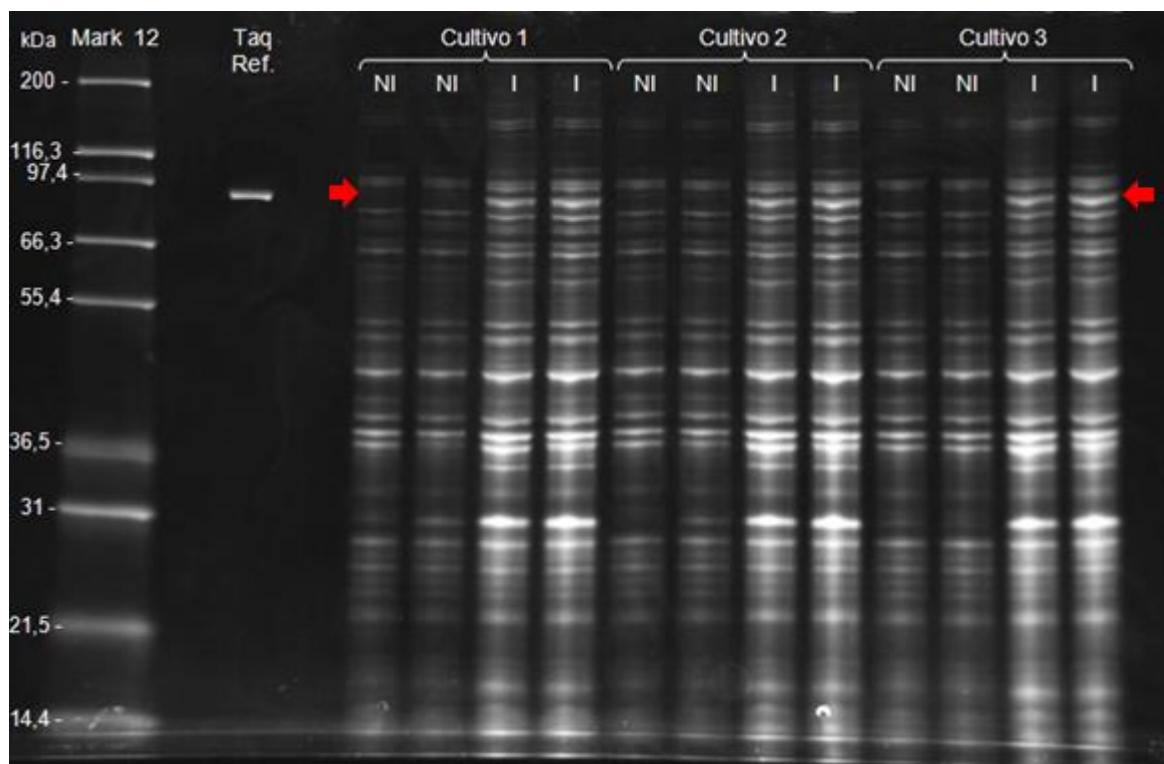
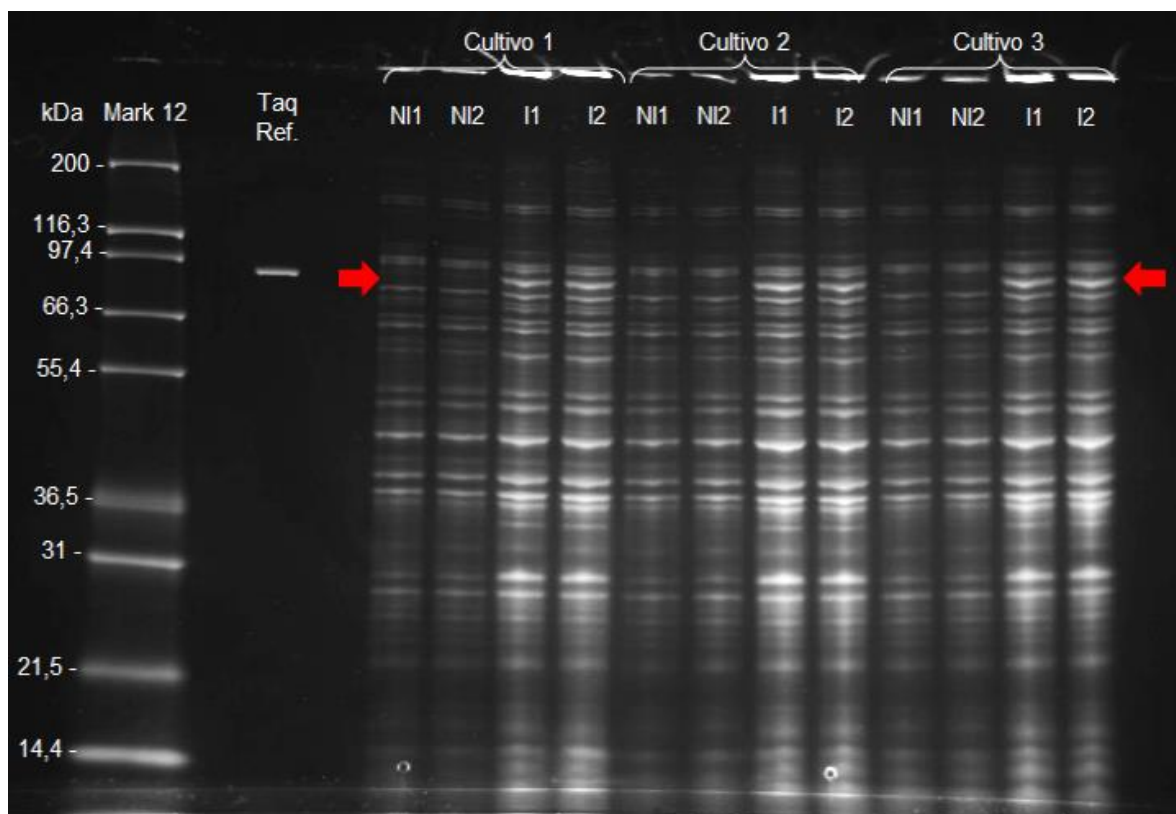


Figura 30 - Resultado da indução da expressão da enzima Taq DNA Polimerase na etapa Pré-Inóculo

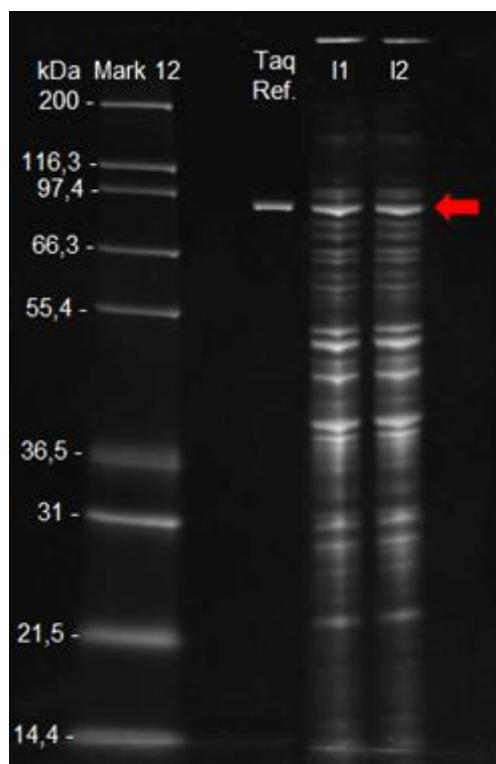
Fonte: Autoria própria



**Figura 31 - Resultado da indução da expressão da enzima Taq DNA Polimerase na etapa do cultivo em biorreator pré-indução com IPTG**

**Fonte: Autoria própria**

A Figura 32 apresenta o resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida da etapa em biorreator pós-indução com IPTG, com adequada expressão da enzima Taq DNA Polimerase. O marcador de peso molecular Mark 12 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foi aplicado na primeira coluna, seguido da enzima Taq referência, já purificada, e das amostras do cultivo. A seta vermelha sinaliza a altura da banda referente à enzima Taq, com aproximadamente 95 kDa.



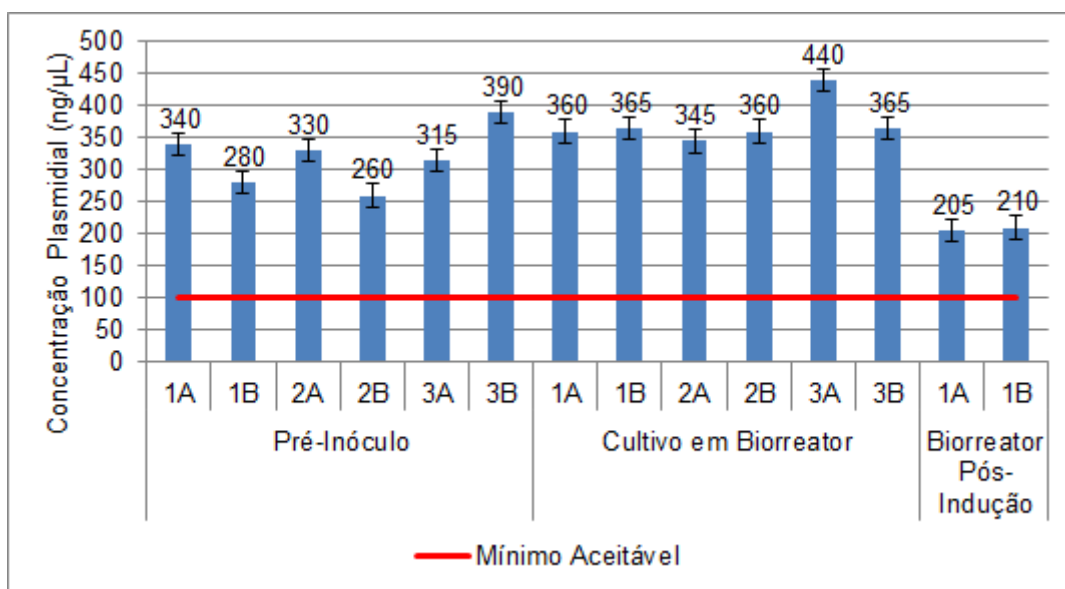
**Figura 32 - Resultado da indução da expressão da enzima Taq DNA Polimerase na etapa do cultivo em biorreator pós-indução com IPTG**

**Fonte: Autoria própria**

#### 4.3.2.5 Extração e Dosagem do DNA Plasmidial

O Gráfico 27 apresenta as concentrações plasmidiais da triplicata de cultivos provenientes do pré-inóculo e dos cultivos em biorreator antes e após a indução com IPTG. De acordo com o teste de Grubbs (1969), com nível de significância 0,05, não há nenhum *outlier* entre as concentrações plasmidiais. Todas foram superiores a 100 ng/ $\mu$ L, valor definido como mínimo aceitável. As concentrações do DNA plasmidial da etapa pós-indução com IPTG em biorreator foram menores que as demais provavelmente devido às distintas condições de cultivo. Apesar disso, permanecem superiores ao mínimo aceitável e, portanto, satisfatórias.



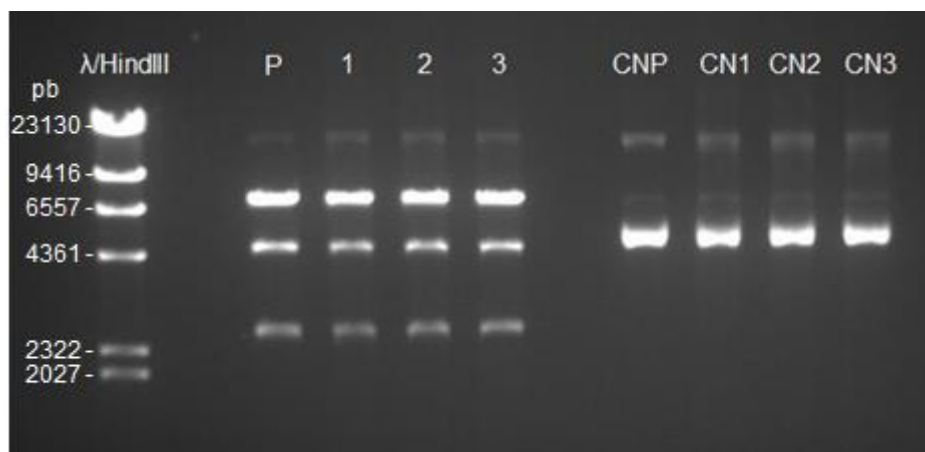


**Gráfico 27 - Dosagem do DNA plasmidial da triplicata de cultivos provenientes do pré-inóculo e dos cultivos em biorreator antes e pós-indução com IPTG, com barras de erro padrão**

Fonte: Autoria própria

#### 4.3.2.6 Análise de Restrição

A Figura 33 é o resultado da análise de restrição da triplicata proveniente do cultivo em biorreator antes da adição de IPTG, sendo que para o pré-inóculo e para o cultivo induzido em biorreator os resultados obtidos foram os mesmos. Utiliza-se o marcador de peso molecular  $\lambda$ HindIII; as quatro primeiras amostras aplicadas no gel de agarose são os plasmídeos tratados com EcoRI e XbaI. Na Figura 33, “P” se refere ao plasmídeo referência e “1”, “2”, “3” aos plasmídeos extraídos dos respectivos cultivos. As quatro últimas amostras aplicadas são os controles negativos do plasmídeo referência (“CNP”) e dos plasmídeos extraídos dos cultivos (“CN1”, “CN2”, “CN3”). Como as endonucleases EcoRI e XbaI clivam nas extremidades do gene da Taq, resultam em dois fragmentos, um de 2507 pb, referente ao gene que codifica a BioMTaq, e outro de 4536 pb, referente à região complementar (Figura 2). Assim, o resultado foi satisfatório e confirma que as sequências flanqueadoras do gene de interesse estão íntegras e que o plasmídeo permanece com seu tamanho original.



**Figura 33 - Resultado da análise de restrição dos plasmídeos pBioMTaq da triplicata proveniente do cultivo em biorreator pré-indução**

**Fonte: Autoria própria**

#### 4.3.2.7 Avaliação Plasmidial

A Figura 34 apresenta o resultado da eletroforese em gel de agarose da etapa pré-inóculo, com o marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder; “1”, “2” e “3” são os produtos da amplificação dos plasmídeos extraídos dos cultivos induzidos 1, 2 e 3; e “CN” é o controle negativo da reação. O fragmento de 500 pares de base do plasmídeo pBioMTaq foi corretamente amplificado com o uso dos iniciadores POL2000F e o POL2500R, evidenciando que o mesmo se mantém íntegro e estável.

Os resultados obtidos a partir das células coletadas nas etapas do cultivo em biorreator antes e após a indução com IPTG são apresentados na Figura 35 e Figura 36, respectivamente.

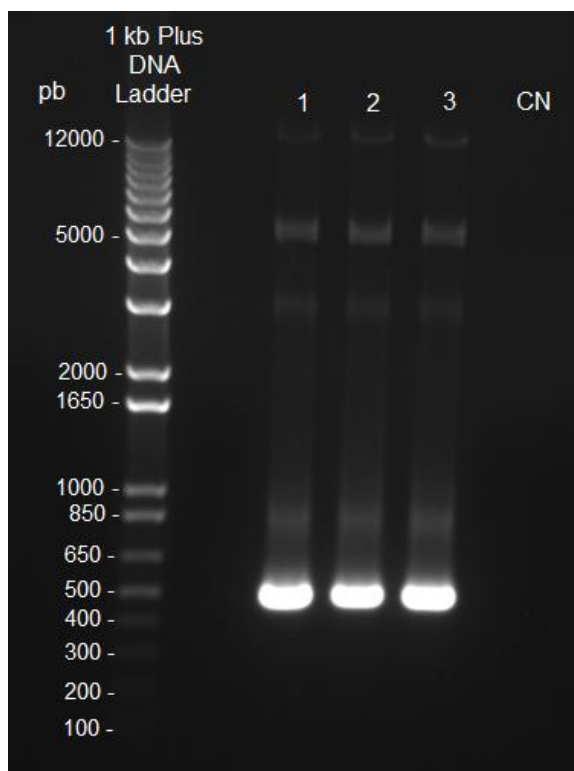
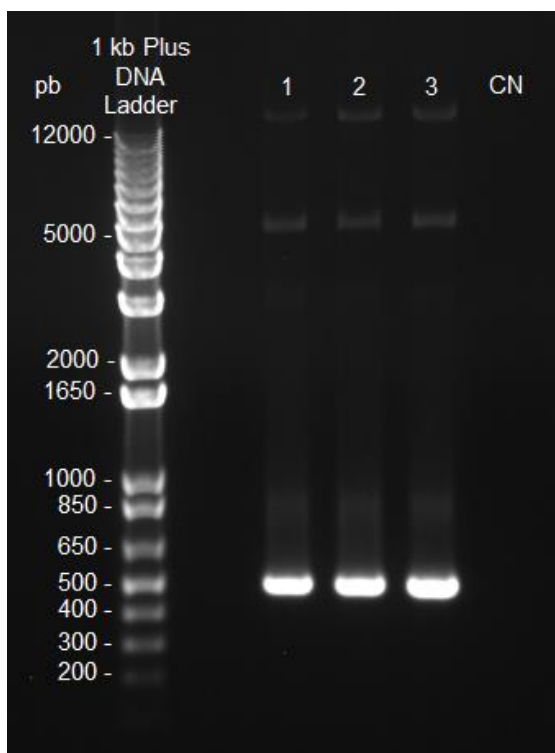


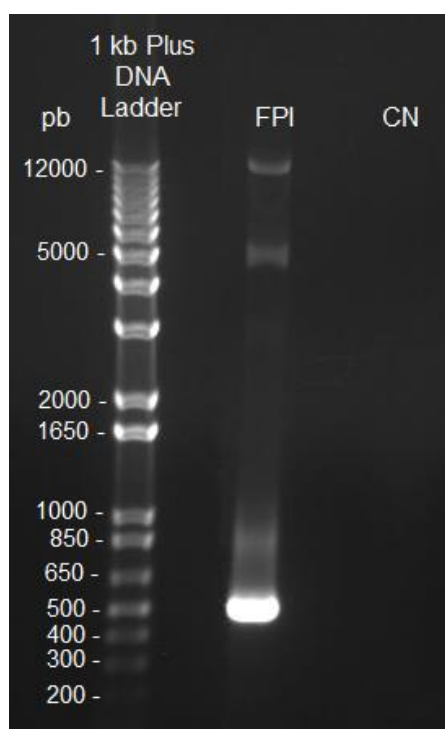
Figura 34 - Resultado da avaliação plasmidial da triplicata de cultivos da etapa do pré-inóculo

Fonte: Autoria própria



**Figura 35 - Resultado da avaliação plasmidial da triplicata de cultivos da etapa em biorreator pré-indução com IPTG**

Fonte: Autoria própria



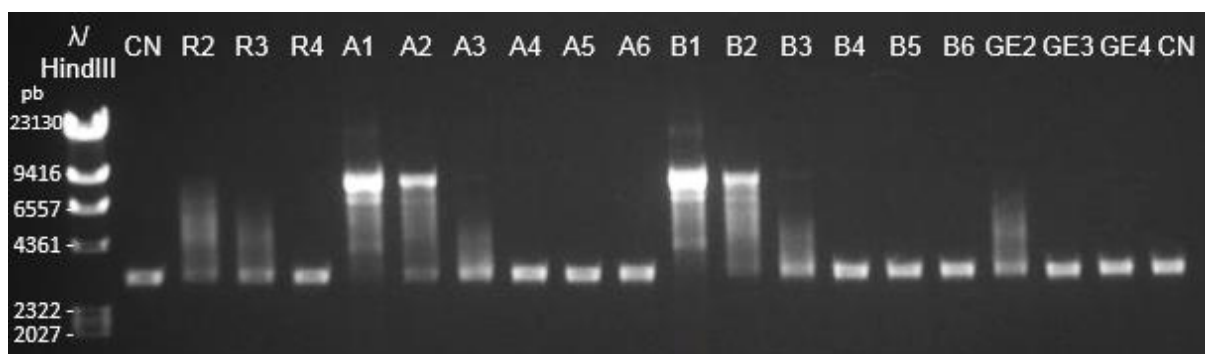
**Figura 36 - Resultado da avaliação plasmidial da triplicata de cultivos da etapa de fermentação em biorreator pós-indução com IPTG**

Fonte: Autoria própria

#### 4.3.3 Lisado clarificado

A Figura 37 mostra o resultado da eletroforese em gel de agarose da PCR realizada para testar a atividade da enzima Taq DNA polimerase no lisado clarificado. Na figura, CN são os controles negativos; R2 é a enzima Taq do fabricante Roche diluída a 0,05 U/ $\mu$ L; R3 é a Taq Roche a 0,03 U/ $\mu$ L; R4 é a Taq Roche a 0,01 U/ $\mu$ L; A1 a A6 são as amostras do lisado clarificado, diluídas em 1:10, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000 e 1:10000, respectivamente; B1 a B6 tem identificação análoga à de A1 a A6; GE2 é a enzima Taq do fabricante GE diluída a 0,05 U/ $\mu$ L; GE3 é a Taq GE a 0,03 U/ $\mu$ L; GE4 é a Taq GE a 0,01 U/ $\mu$ L.

Houve adequada amplificação do fragmento de 7250 pb, referente à simples fita do DNA molde M-13, nas amostras menos diluídas tanto das enzimas referência Roche (R2 e R3) e GE (GE2) quanto do lisado clarificado (A1, A2 e B1, B2). As demais amplificações são distintas devido às amostras estarem mais diluídas e ao fato de ter ocorrido um único ciclo de amplificação. O resultado condiz com o esperado, que é a visualização do arraste da amplificação desde 2322 pb (QIAGEN, 2009).



**Figura 37 - Resultado do teste de atividade da Taq DNA polimerase no lisado clarificado.**

Fonte: IBMP, 2016

#### 4.3.4 Determinação do Peso Seco

A Tabela 16 apresenta os resultados da determinação do peso seco da biomassa obtida do processo fermentativo da enzima Taq DNA polimerase. O peso úmido inicial, umidade, peso seco final e conteúdo seco são valores fornecidos pelo analisador halógeno de umidade. O peso seco total é calculado considerando que o

peso seco obtido é referente aos 50 mL de cultivo amostrados do total de 25 litros. O peso seco por litro, por conseguinte, calcula-se pela divisão do peso seco total pelos 25 litros de cultivo.

**Tabela 16 - Resultado da determinação do peso seco da biomassa**

	<b>Amostra A</b>	<b>Amostra B</b>	<b>Média</b>
Peso úmido (g)	5,385	5,328	5,357
Umidade (%)	99,48	99,12	99,30
Peso seco (g)	0,028	0,048	0,038
Conteúdo seco (%)	0,52	0,90	0,71
Peso seco total (g)	14	24	19
Peso seco/litro	0,56	0,96	0,76

**Fonte: IBMP, 2016**

Os valores condizem com o esperado, de acordo com resultados anteriormente obtidos no IBMP em processos fermentativos nas mesmas condições (IBMP, 2016).

## 5 CONCLUSÕES

Realizou-se o estabelecimento de um processo para geração de banco de células de trabalho (BCT) eficiente para a produção da enzima Taq DNA polimerase no IBMP. Tal estabelecimento consistiu em testes para selecionar um dentre 10 clones do banco de células mestre (BCM) para compor o BCT. Os testes utilizados foram cinética de crescimento, indução da expressão da enzima Taq, extração e dosagem do DNA plasmidial, e análise de restrição. Na cinética de crescimento os clones apresentaram maior distinção entre si, sendo que o clone 3 se destacou dos demais pela maior taxa específica de crescimento e pelo menor tempo para atingimento de  $DO_{600nm}$  entre 0,8 e 1,0. Todos os clones avaliados expressaram a enzima Taq DNA Polimerase quando induzidos com IPTG e tiveram concentração plasmidial próxima a 300 ng/ $\mu$ L. A análise de restrição comprovou que os clones possuem o plasmídeo com estabilidade em sua construção gênica. Assim, o clone 3 foi eleito para compor o BCT, tendo como critério decisivo a cinética de crescimento. A partir da cultura preparatória do clone três foram congelados 100 criotubos de BCT.

O estudo de estabilidade contemplou 10 avaliações realizadas mês a mês que comprovaram que o banco de células de trabalho se mantém estável e indicaram que é viável a sua utilização pelo setor de produção do IBMP para fabricação da enzima Taq DNA Polimerase. Em todos os meses de estudo:

- A viabilidade celular foi superior a  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL, mostrando que as células permanecem com capacidade de realizar seu metabolismo e reprodução.

- O tempo para atingimento da densidade óptica a 600 nm de 0,8 a 1,0 se manteve entre 6 e 7 horas. A taxa específica de crescimento foi superior a  $0,04 \text{ min}^{-1}$  para a triplicata de cultivos. Tais resultados asseguram a homogeneidade e a repetitividade do crescimento das células.

- Os cultivos acrescidos de 1 mM de IPTG expressaram a enzima Taq DNA Polimerase, revelando a qualificação das células para o fim proposto.

- A estabilidade plasmídica foi superior a 90%, sendo que após a alteração de método a partir do segundo mês (T2), a estabilidade plasmídica passou a ser de 100% em todos os meses subsequentes e em todos os cultivos avaliados. Esse

resultado indica que o plasmídeo pBioMTaq se mantém estável no interior das células e com capacidade de replicação satisfatória.

- As concentrações plasmidiais obtidas foram superiores a 100 ng/μL, por isso adequadas ao processo produtivo do IBMP, e a média ao longo dos 10 meses de avaliação de estabilidade foi de 338 ng/μL.

- Os plasmídeos foram corretamente clivados pelas enzimas de restrição, comprovando que as sequências flanqueadoras do gene que expressa a enzima Taq estão íntegras e que o plasmídeo permanece com seu tamanho original.

- Na PCR ocorreu a correta amplificação do fragmento de 500 pares de base do plasmídeo pBioMTaq, com o uso dos iniciadores POL2000F e o POL2500R. Assim, foi demonstrado que esse segmento do plasmídeo se mantém íntegro e estável, com sequências compatíveis com sua construção.

A identidade e a pureza do BCT são confirmadas nos testes de viabilidade celular e cinética de crescimento ao cultivar as células em meio de cultura acrescido de ampicilina, visto que o plasmídeo possui em sua sequência um gene que lhe confere resistência à ampicilina, e somente as células que o contêm são aptas a crescer nesse meio de cultura.

A utilização do BCT como substrato para um processo fabril típico do IBMP de produção da Taq DNA polimerase apresentou sucesso em todas as etapas em que foi avaliada. As células do pré-inóculo atingiram a densidade óptica de interesse mais rapidamente e as velocidades específicas de crescimento foram superiores em relação aos resultados do estabelecimento e estudo de estabilidade do BCT. A massa em gramas de biomassa obtida ao término da fermentação foi condizente com as previamente obtidas em fermentações de 25 litros sob as mesmas condições. A caracterização das células provenientes das etapas do processo exibiu resultados satisfatórios em todos os testes realizados. Destarte, aumenta-se a segurança na afirmação de que o BCT é apto a ser utilizado no processo produtivo e que provê resultados promissores.

O presente BCT foi um protótipo para o estabelecimento de um novo BCT, em conformidade com as Boas Práticas de Fabricação (BPF), a ser efetivamente usado para a produção comercial da enzima Taq DNA Polimerase pelo IBMP. Foram sugeridas e implementadas alterações de métodos ao longo das avaliações, que possibilitaram a otimização e padronização de procedimentos, com obtenção de



melhores resultados, conforme discutido ao longo da seção 4.2. Ao avaliar mensalmente foi obtida uma base de dados bastante relevante para futuras comparações.

Para o novo BCT a ser estabelecido em BPF, sugere-se realizar o estudo de estabilidade de longa duração, com 24 meses, conforme preconizado pela ANVISA na RDC nº 45 (BRASIL, 2012). Como principal vantagem de se fabricar produtos biotecnológicos como a enzima Taq DNA polimerase a partir de um banco de células, tem-se que todas as células nele contidas provêm de um mesmo clone, o que permite que a fabricação tenha homogeneidade e reprodutibilidade.

## REFERÊNCIAS

BIO-RAD, **A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection**, Hercules, 2016, 47 p. Disponível em: <[http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_6040.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf)>. Acesso em: 2 Dezembro 2016.

BIRNBOIM, H. C. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. **Methods in Enzymology**, v. 100, p. 243-255, 1983. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6353143>>. Acesso em: 6 Novembro 2016.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, Paris, v. 7, n. 6, p. 1513-1523, Nov 1979.

BISEN, P. S. **Laboratory Protocols in Applied Life Sciences**. Gwalior: CRC Press, 2014. ISBN 978-1-4665-5314-9.

BRASIL, Resolução ANVISA RDC nº. 55, de 16 de dezembro de 2010. Registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF Poder Executivo de 17 de dezembro de 2010.

BRASIL, Resolução ANVISA RDC nº. 49, de 20 de setembro de 2011. Realização de alterações e inclusões pós-registro, suspensão e reativação de fabricação e cancelamentos de registro de produtos biológicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF Poder Executivo de 22 de setembro de 2011.

BRASIL, Resolução ANVISA RDC nº. 45, de 9 de agosto de 2012. A realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF Poder Executivo, de 10 de agosto de 2012.

BRASIL, Resolução ANVISA RDC nº. 16, de 28 de março de 2013. Regulamento Técnico de Boas Práticas de Fabricação de Produtos Médicos e Produtos para Diagnóstico de Uso In Vitro e dá outras providências, **Diário Oficial da União**, Brasília, DF Poder Executivo, de 01 de abril de 2013.

BRASIL, Resolução ANVISA RDC nº. 69, de 08 de dezembro de 2014. Boas práticas de fabricação de insumos farmacêuticos ativos, **Diário Oficial da União**, Brasília, DF Poder Executivo, de 09 de dezembro de 2014.

BROCK, T. D. The value of basic research: discovery of *Thermus aquaticus* and other extreme thermophiles. **Genetics**, Madison, v. 146, p. 1207-1210, Agosto 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1208068/pdf/ge14641207.pdf>>. Acesso em: 7 Novembro 2016.

BROWN, T. A. **Clonagem Gênica e Análise de DNA**. Tradução de Henrique Bunselmeyer Ferreira e Luciane Maria Pereira Passaglia. 4a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. ISBN 0-632-05901-X.

BUSCH, M. P. et al. Committee report. Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases: Report of the Interorganizational Task Force on Nucleic Acid Amplification Testing of Blood Donors. **Transfusion**, Baltimore, v. 40, n. 2, p. 143-159, Fevereiro 2000. ISSN 1537-2995. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10685998>>. Acesso em: 1 Novembro 2016.

CHAVES, A. C. et al. Studies on growth kinetics and plasmid stability of a recombinant *Escherichia coli* expressing a *Schistosoma mansoni* antigen. **Bioprocess Engineering**, v. 21, n. 4, p. 355-361, 1999. ISSN 1615-7605. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/PL00009079>>. Acesso em: 13 Outubro 2016.

CK-12. Imagem: The Polymerase Chain Reaction – Advanced. **CK-12**, 2016. Disponível em: <<http://www.ck12.org/book/CK-12-Biology-Advanced-Concepts/section/9.3/>>. Acesso em: 6 Novembro 2016.

DECODING DNA. Figura: Gel Electrophoresis. **Decoding DNA**, 2016. Disponível em: <<http://decodingdna.yolasite.com/capillary-electrophoresis.php>>. Acesso em: 12 Outubro 2016.

DECS. Descritores em Ciência da Saúde, 2016. Disponível em: <[http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/?IsisScript=../cgi-bin/decserver/decserver.xis&path\\_database=/home/decs2016/www/bases/&path\\_cginbin=/home/decs2016/www/cgi-bin/decserver/&path\\_data=/decserver/&temp\\_dir=/tmp&debug=&clock=&client=&search\\_language=>](http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/?IsisScript=../cgi-bin/decserver/decserver.xis&path_database=/home/decs2016/www/bases/&path_cginbin=/home/decs2016/www/cgi-bin/decserver/&path_data=/decserver/&temp_dir=/tmp&debug=&clock=&client=&search_language=>)>. Acesso em: 17 Outubro 2016.

FIOCRUZ. Perfil Institucional. **Portal da Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz**, 2016. Disponível em: <<http://portal.fiocruz.br/pt-br/content/perfil-institucional>>. Acesso em: 2 Dezembro 2016.

GEIGERT, J. **The Challenge of CMC Regulatory Compliance for Biopharmaceuticals and Other Biologics**. 2a. ed. New York: Springer Science and Business Media, 2013. ISBN 978-1-4614-6916-2.

GRUBBS, F. E. Procedures for detecting outlying observations in samples. **Technometrics**, Aberdeen Proving Ground, v. 11, n. 1, p. 1-21, Fevereiro 1969.

HECKLY, R. J. Preservation of microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, v. 24, p. 1-53, 1978.

IBMP. **Documentação de domínio interno do instituto**. Instituto de Biologia Molecular do Paraná. Curitiba. 2016.

IBMP. **Instituto de Biologia Molecular do Paraná**, 2017. Disponível em: <<http://www.ibmp.org.br>>. Acesso em: 4 Janeiro 2017.

ICH, *International Conference of Harmonisation*, topic Q Qualidade dos produtos biotecnológicos, topic Q5 Derivação e Caracterização de Substratos Celulares para Produção de Produtos Biotecnológicos, **European Medicines Agency** 1998.

KOENIG, G. L. Viability of and Plasmid Retention in Frozen Recombinant *Escherichia coli* over Time: a Ten-Year Prospective Study. *Applied and Environmental Microbiology*. **Applied and Environmental Microbiology**, Alameda, v. 69, n. 11, p. 6605-6609, Novembro 2003. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/69/11/6605.full.pdf+html>>. Acesso em: 14 Outubro 2016.

KOVÁCS, M. Recombinant DNA technology. In: HEGYI, G. **Introduction to Practical Biochemistry**. Budapeste: Eötvös Loránd University, 2013. Cap. 10, p. 149-152. Disponível em: <<http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/IntroductionToPracticalBiochemistry/book.pdf>>. Acesso em: 15 Outubro 2016.

LAWYER, F. C. et al. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. **The Journal of Biological Chemistry**, Emeryuille, v. 264, p. 6427-6437, 15 Abril 1989. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2649500>>. Acesso em 12 Novembro 2016.

MATLOCK, B. C. et al. Analyzing Differences in Bacterial Optical Density Measurements between Spectrophotometers. **Bio Innovation**, Wilmington, n. 8, p. 30-33, 2013. Disponível em: <<http://www.thermofisher.co.nz/Uploads/file/Scientific/Bio-Innovation/Bio-Innovation-Magazine-Issue-8.pdf>>. Acesso em: 1 Outubro 2016.

MEZA, R. A. et al. Study of the Stability in Real Time of Cryopreserved Strain Banks. **Universitas Scientiarum**, Bogotá, v. 9, n. 2, p. 35-42, Julho 2004. ISSN 0122-7483. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/pdf/499/49990204.pdf>>. Acesso em: 29 Setembro 2016.

MN-NET. Imagem: Princípio de purificação de ácidos nucleicos em membrana de sílica, 2016. Disponível em: <<http://www.mn-net.com/tabid/10745/default.aspx>>. Acesso em: 14 Dezembro 2016.

MOLDENHAUER, J. R. Cell Culture Preservation and Storage for Industrial Bioprocesses. In: VINCI, V. A.; PAREKH, S. R. **Handbook of Industrial Cell Culture Mammalian, Microbial, and Plant Cells**. Totowa: Humana Press, 2003. Cap. 18, p. 483-514. ISBN 1-59259-346-1.

MÔO-YOUNG, M. et al. Bioprocessing with genetically modified and other organisms: case studies in processing constraints. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Waterloo, v. 782, p. 391-401, Maio 1996. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.1996.tb40577.x/pdf>>. Acesso em: 3 Dezembro 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. ISBN 978-85-363-2418-0.

NEW ENGLAND BIOLABS. **Optimizing Restriction Endonuclease Reactions**. Ipswich, 2012. Disponível em: <<https://www.neb.com/protocols/2012/12/07/optimizing-restriction-endonuclease-reactions>>. Acesso em: 4 Outubro 2016.

OLD, R. W.; PRIMROSE, S. B. **Principles of gene manipulation**. 4a. ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1990.

OMS. **Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks.** Organização Mundial da Saúde. Genebra, p. 1-94. 2010.

PACHECO, V. S. S. **Estabelecimento do Banco de Células Mestre para Produção da Taq DNA Polimerase para o Kit NAT HIV/HCV de Bio-Manguinhos/Fiocruz.** 2013. 119 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Rio de Janeiro, 2013.

PGCC. Figura: Bacterial Growth Curve. **Academic Prince George's Community College,** 2016. Disponível em: <<http://academic.pgcc.edu/~kroberts/Lecture/Chapter%206/growth.html>>. Acesso em: 5 Dezembro 2016.

QIAGEN. **Transferência de Tecnologia para produção da Taq DNA Polimerase.** Qiagen. Hilden. 2009.

QIAGEN. QIAprep® Miniprep Handbook. For purification of molecular biology grade DNA. Hilden, 4<sup>a</sup>. ed. Junho 2015, 44 p. Disponível em: <<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=22df6325-9579-4aa0-819c-788f73d81a09&lang=en>>. Acesso em: 3 Novembro 2016.

QIAGEN. **Molecular Biology Methods: DNA,** 2016. Disponível em: <<https://www.qiagen.com/us/resources/molecular-biology-methods/dna>>. Acesso em: 5 Novembro 2016.

SIMIONE, F. P.; BROWN, E. M. Principles of freezing and freeze-drying. In: BUCK, C. **ATCC Preservation Methods: Freezing and Freeze-Drying.** 2a. ed. Rockville: American Type Culture Collection, 1991. p. 1-4. ISBN 9780930009410.

SIMIONE, F.P. Cryopreservation Guide. Penfield. Thermo Scientific Nalgene and Nunc, 2009. 16 p. Disponível em: <[https://www.atcc.org/~media/PDFs/Cryopreservation\\_Technical\\_Manual.ashx](https://www.atcc.org/~media/PDFs/Cryopreservation_Technical_Manual.ashx) Thermo Scientific Nalgene and Nunc Cryopreservation Guide>. Acesso em: 6 Dezembro 2016.

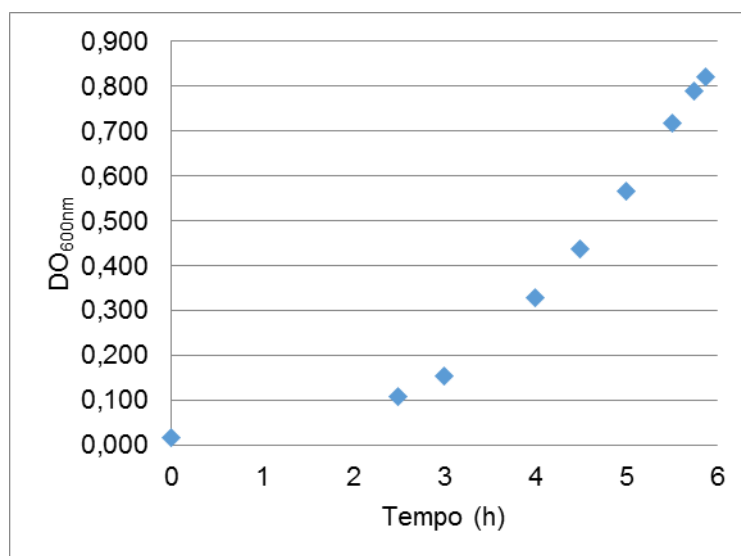
TEDESCHI, R.; DE PAOLI, P. Collection and Preservation of Frozen Microorganisms. In: DILLNER, J. **Methods in Biobanking**. Estocolmo: Humana Press, v. 675, 2011. Cap. 18, p. 313-326.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. ISBN 9788536326061.

WAGENINGEN UNIVERSITY. Agarose gel electrophoresis. **Bioinformatics: Simple Cloning Lab**, 2016. Disponível em: <<http://www.bioinformatics.nl/molbi/SimpleCloningLab/electrophoresis.htm>>. Acesso em: 11 Outubro 2016.

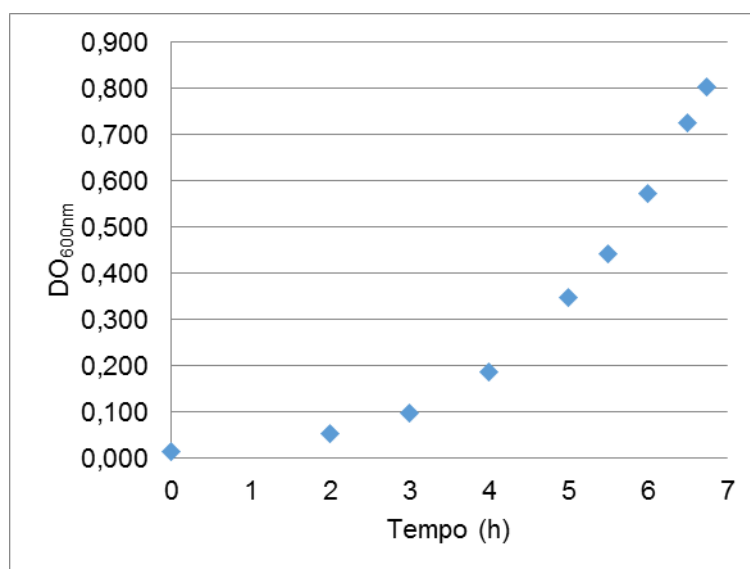


**APÊNDICE A - Curvas de Crescimento do Estudo de Estabilidade do BCT**



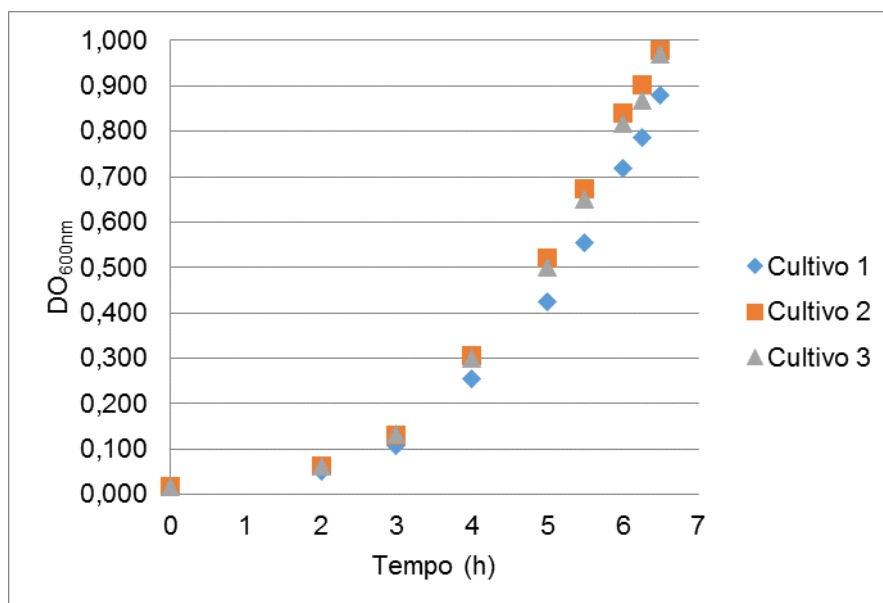
**Gráfico 28 - Curva de crescimento do cultivo de T0**

Fonte: Autoria própria



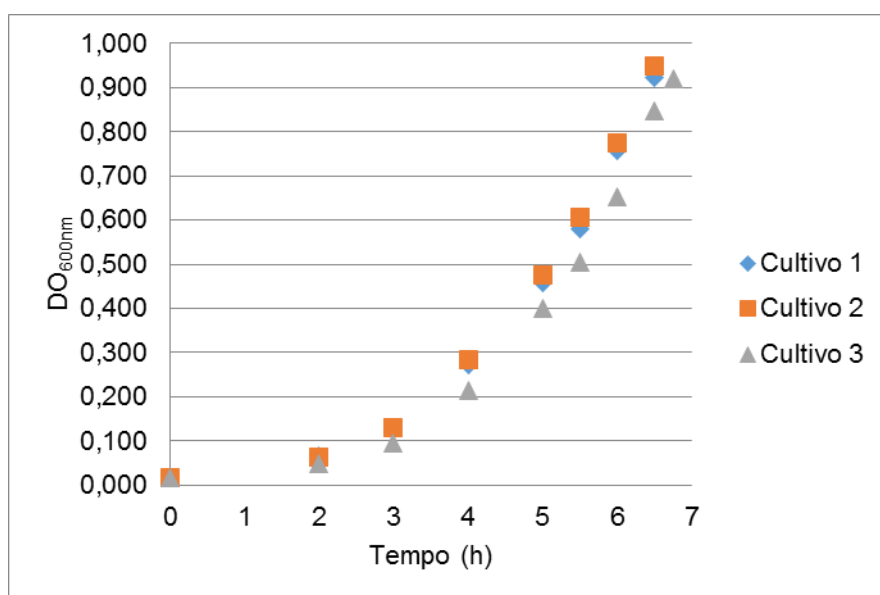
**Gráfico 29 - Curva de crescimento do cultivo de T1**

Fonte: Autoria própria



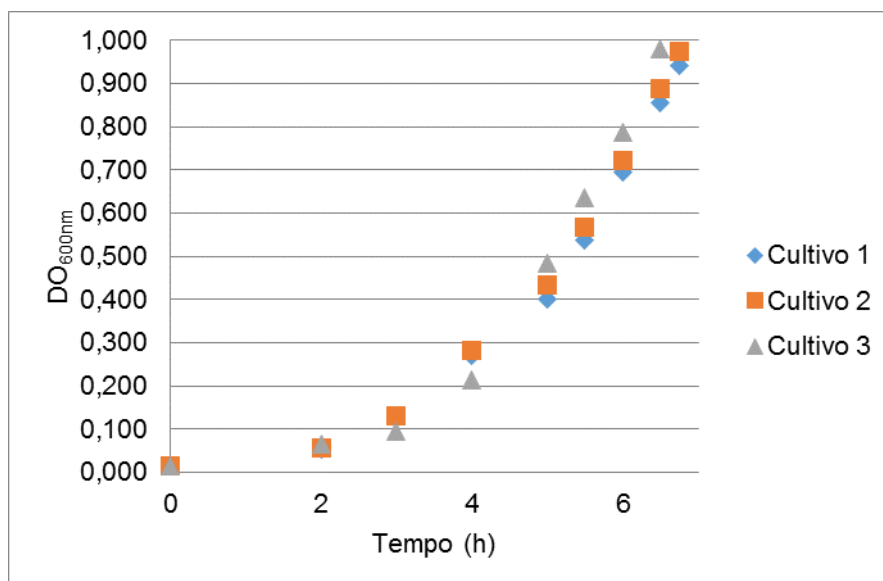
**Gráfico 30 - Curvas de crescimento da triplicata de cultivos de T2**

Fonte: Autoria própria



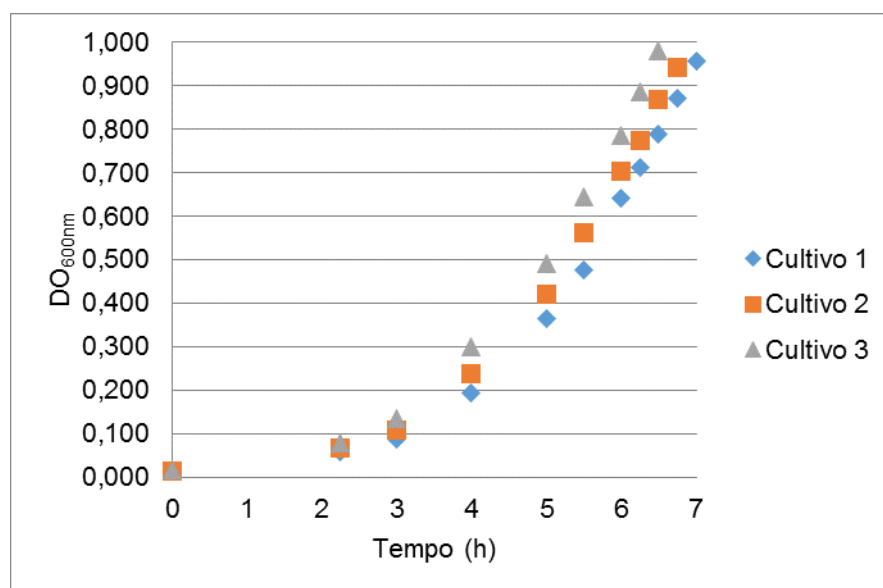
**Gráfico 31 - Curvas de crescimento da triplicata de cultivos de T3**

Fonte: Autoria própria



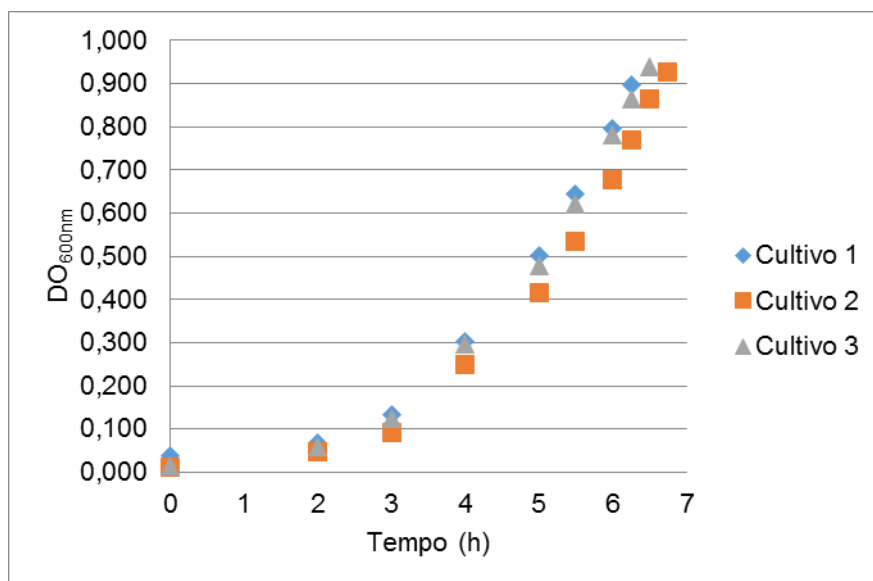
**Gráfico 32 - Curvas de crescimento da triplicata de cultivos de T4**

Fonte: Autoria própria



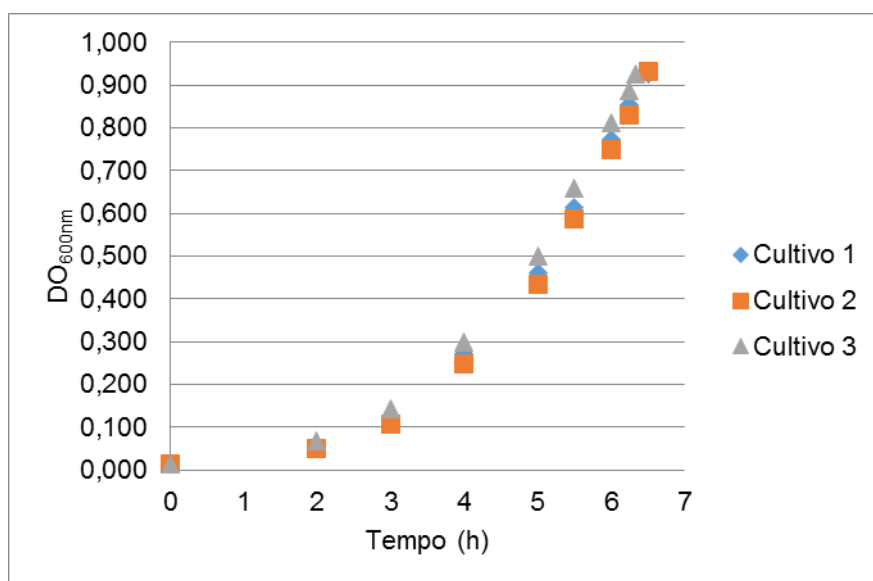
**Gráfico 33 - Curvas de crescimento da triplicata de cultivos de T5**

Fonte: Autoria própria



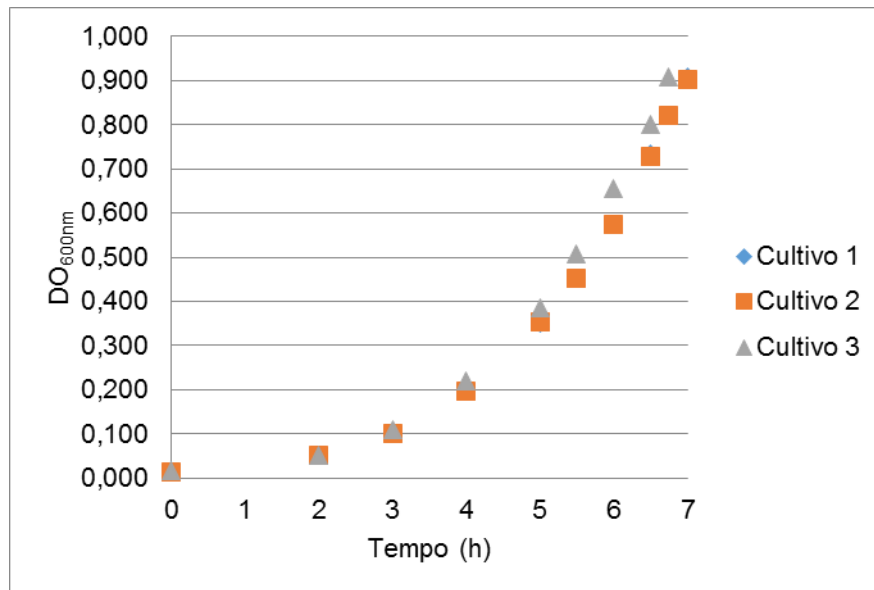
**Gráfico 34 - Curvas de crescimento da triplicata de cultivos de T6**

Fonte: Autoria própria



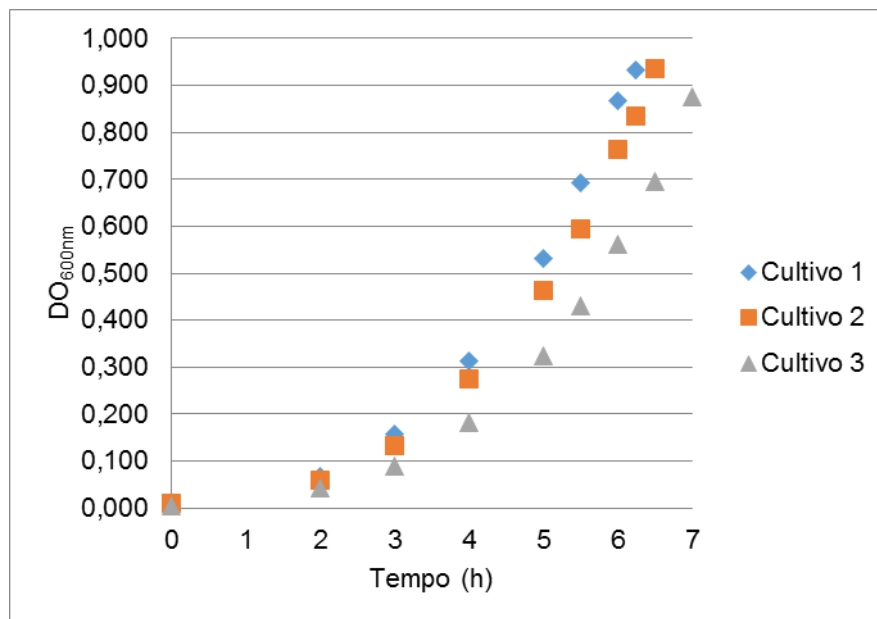
**Gráfico 35 - Curvas de crescimento da triplicata de cultivos de T7**

Fonte: Autoria própria



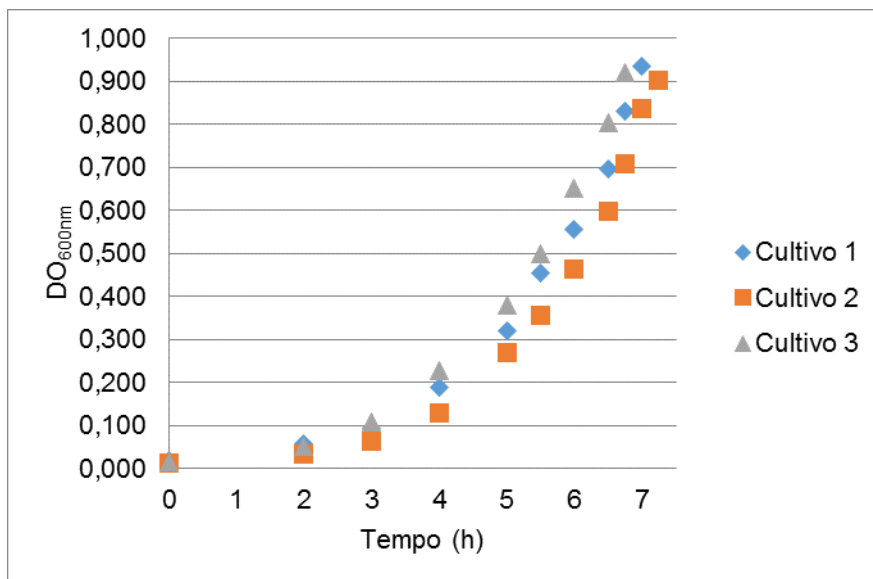
**Gráfico 36 - Curvas de crescimento da triplicata de cultivos de T8**

Fonte: Autoria própria



**Gráfico 37 - Curvas de crescimento da triplicata de cultivos de T9**

Fonte: Autoria própria



**Gráfico 38 - Curvas de crescimento da triplicata de cultivos de T10**

Fonte: Autoria própria