



Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Centro de Tecnologia
Departamento de Engenharia Química
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química



TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE PRODUÇÃO DO ANTÍGENO 503 RECOMBINANTE DE *Leishmania i. chagasi* EXPRESSO EM *Escherichia coli* EM BIORREATOR DE BANCADA

Luan Tales Costa de Paiva Vasconcelos

Orientadora: Prof^a Dra. Gorete Ribeiro de Macedo

Coorientador: Dr. Francisco Canindé de Sousa Júnior

Natal/RN
Novembro/2015

Luan Tales Costa de Paiva Vasconcelos

AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE PRODUÇÃO DO
ANTÍGENO 503 RECOMBINANTE DE *Leishmania i. chagasi*
EXPRESSO EM *Escherichia coli* EM BIORREATOR DE
BANCADA

Monografia de Graduação apresentada
ao Departamento de Engenharia
Química da Universidade Federal do
Rio Grande do Norte – UFRN, em
cumprimento às exigências a graduação
em Engenharia Química, sob a
orientação da Profa. Dra. Gorete
Ribeiro de Macedo e coorientação do
Dr. Francisco Canindé de Sousa Júnior.

Natal/RN
Novembro/2015

Monografia de Graduação sob o título Avaliação de estratégias de processo de produção do antígeno 503 recombinante de *Leishmania i. chagasi* expresso em *Escherichia coli* em biorreator de bancada apresentada por Luan Tales Costa de Paiva Vasconcelos e aceita pelo Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, sendo aprovada por todos os membros da banca examinadora abaixo especificada:

Profa Dra Gorete Ribeiro de Macedo
Orientadora
Departamento de Engenharia Química
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Dr. Francisco Canindé de Sousa Júnior
Coorientador
Departamento de Engenharia Química
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Doutorando Sérgio Dantas de Oliveira Júnior
Departamento de Engenharia Química
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Natal/RN, Novembro de 2015

VASCONCELOS, Luan Tales Costa de Paiva – Avaliação das estratégias de processo de produção do antígeno 503 recombinante de *Leishmania i. chagasi* expresso em *Escherichia coli* em biorreator de bancada. Monografia, UFRN, Departamento de Engenharia Química, – DEQ, Áreas de Concentração: Engenharia de Processos, Natal/RN, Brasil.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Gorete Ribeiro de Macedo

Coorientador: Dr. Francisco Canindé de Sousa Júnior

RESUMO: Após o advento da tecnologia do DNA recombinante, biomoléculas tiveram a oportunidade de serem produzidas em escala industrial. Os produtos heterólogos processados a partir de bioprocessos utilizam em ampla escala a *Escherichia coli* como organismo hospedeiro. Embora existam estudos extensivos na biotecnologia e na imunologia, atualmente nosso nível de ciência não conseguiu descobrir nenhuma droga que promovesse a prevenção da Leishmaniose (calazar). Como consequência, se faz necessário a produção de antígenos específicos para o aprofundamento no desenvolvimento de vacinas e testes para o diagnóstico da doença. Pelo supracitado, o trabalho tem como objetivo identificar a influência da qualidade do indutor (IPTG ou lactose), bem como as estratégias de indução no que refere ao instante de indução e concentração da molécula indutora, no cultivo de *Escherichia coli* para a produção do antígeno 503 de *Leishmania i. chagasi*, em incubador rotativo e biorreator de bancada. Segundo os resultados colhidos, pode-se notar que a lactose como componente indutor favoreceu a produção da proteína heteróloga, podendo a mesma ser o indutor mais apropriado, devido a fatores como custo e toxicidade celular. A indução tardia não encontrou a alta produtividade e a indução com concentração mais elevada também não influenciou positivamente na mesma. A indução em pulsos proveu mais nutrientes as bactérias e induziu a expressão da mesma em diferentes instantes de cultivo, porém pode-se observar que esta não foi a melhor estratégia para a otimização de altas concentrações proteicas.

Palavras – Chave: Antígeno 503, Indução, *Escherichia coli* Recombinante, *Leishmania i. chagasi*

ABSTRACT: After the advent of recombinant DNA technology, biomolecules were able to be produced on an industrial scale. Heterologous products processed by large-scale bioprocesses largely use *Escherichia coli* as a host organism. Although there are extensive studies in biotechnology and immunology, currently our level of science failed to find any drug with prophylactic effect that promotes the prevention of leishmaniasis. As a consequence, it is necessary to diagnose antigens that are specific for a deeper study of the development of vaccines and tests for recognition this disease. By the above, the paper aims to identify the influences of the quality of inducer (IPTG or lactose) as well as the induction strategies with respect to the time of induction and concentration of inducer molecule, in the cultivation of *Escherichia coli* for the production of antigen 503 of *Leishmania i. chagasi* in rotary shaker and benchtop bioreactor. According to the results collected, it can be noted that the lactose as an inducer component favored the production of the heterologous protein, and it may be the more appropriate inducer, due to factors such as cost and cell toxicity. Late induction did not find high productivity and induction with higher concentration did not influence it positively. The induction pulses provided more nutrients to the bacteria and induced the expression of the antigen at different times from the same cultivation, but it can be seen that this was not the best strategy for the optimization of high protein concentrations.

Key-words: 503 antigen, Induction; Recombinant *Escherichia coli*, *Leishmania chagasi*

Lista de Figuras

Figura 1 - Esquema das análises das amostras.....	23
Figura 2 – Comportamento da biomassa dos experimentos I e II	28
Figura 3 - Comportamento da proteína dos experimentos I e II	29
Figura 4 - Comportamento da produtividade em células dos experimentos I e II	29
Figura 5 - Comportamento da velocidade específica de crescimento dos experimentos I e II	30
Figura 6 - Comportamento da produção específica da proteína nos experimentos I e II.....	30
Figura 7 - Comportamento do ácido acético nos experimentos I e II	31
Figura 8 - Comportamento da biomassa nos experimentos II, III e IV	34
Figura 9 - Comportamento da proteína nos experimentos II, III e IV	34
Figura 10 - Comportamento da produtividade em células nos experimentos II, III e IV	35
Figura 11 - Comportamento da velocidade específica de crescimento nos experimentos II, III e IV ..	35
Figura 12 - Comportamento da produção específica da proteína nos experimentos II, III e IV	36
Figura 13 - Comportamento do ácido acético nos experimentos II, III e IV	36
Figura 14 - Comportamento da biomassa nos experimentos II e V	38
Figura 15 - Comportamento da proteína nos experimentos II e V	39
Figura 16 - Comportamento da produtividade em células nos experimentos II e V	39
Figura 17 - Comportamento da velocidade específica de crescimento nos experimentos II e V.....	40
Figura 18 - Comportamento da produção específica da proteína nos experimentos II e V	40
Figura 19 - Comportamento do ácido acético nos experimentos II e V	41

Lista de Tabela

Tabela 1 - Composição do meio 2xTY	19
Tabela 2 – Descrição da estratégia, instantes de indução e concentração do indutor usado nos experimentos	20
Tabela 3 - Parâmetros cinéticos do cultivo em incubador rotativo induzido por IPTG 1 mM (Experimento I).....	27
Tabela 4 - Parâmetros cinéticos do cultivo em incubador rotativo induzido por Lactose 10 g/L (Experimento II).....	28
Tabela 5- Parâmetros cinéticos do cultivo em biorreator induzido por Lactose 20 g/L após 2h (Experimento III)	33
Tabela 6 - Parâmetros cinéticos do cultivo em biorreator induzido por Lactose 20 g/L após 6h (Experimento IV)	33
Tabela 7 - Parâmetros cinéticos do cultivo em biorreator induzido por pulsos de Lactose 10 g/L nos instantes 1, 3, 5 e 7h (Experimento V)	38

Lista de Abreviações

IPTG	Isopropiltiogalactosídeo
IMAC	Cromatografia de afinidade por metal imobilizado
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
LVA	Leishmaniose visceral americana
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
LACK	Leishmania análogo dos receptores ativados por proteína quinase C
OMS	Organização mundial da saúde
KDa	Quilo daltons (1000 daltons)
μ x	Velocidade específica de crescimento (h ⁻¹)
DO	Densidade óptica
Px	Produtividade em células (g/L.h)
YX/S	Fator de conversão de substrato em biomassa (g.g ⁻¹)
rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio
Ác. Acético	Concentração máxima de ácido acético
Pp/x	Produção específica da proteína (g/g)

Sumário

1 - Introdução.....	1
2 - Revisão bibliográfica.....	3
2.1 - Leishmaniose Visceral.....	3
2.2 - Biotecnologia e DNA recombinante	6
2.3 – <i>Escherichia coli</i> e proteína heteróloga.....	8
2.4 - Meio de cultivo e operon lac	11
2.4 – Estratégias de cultivo e ácido acético	12
3 - Materiais e métodos.....	18
3.1 - Microrganismo	19
3.2 - Meio de cultivo.....	19
3.3 - Antibióticos	19
3.4 - Estudo da influencia do indutor e estratégias de indução na expressão do antígeno 503.....	20
3.4.1 - Inóculo.....	20
3.4.2 - Ensaio em incubador rotativo	21
3.4.3 - Ensaio em biorreator.....	21
3.4.4 - Indução em biorreator e incubador rotativo	21
3.5 - Métodos de análise	22
3.5.1 - Ácido acético.....	23
3.5.2 - Biomassa	23
3.5.3 – Rompimento celular	24
3.5.4 – Proteínas de interesse - Purificação.....	24
3.5.4.1 – Teste quantitativo	25
3.5.4.2 – Teste qualitativo	25
4 – Resultados e discussão.....	27
4.1 – Ensaio para avaliação da qualidade do indutor	27
4.2 – Ensaio para avaliação da concentração do indutor e tempo de indução.....	32
4.2 – Ensaio para avaliação de pulsos múltiplos	37
4.3 – Avaliação qualitativa da expressão do antígeno 503 por eletroforese em gel de poliacrilamida	42
5 - Conclusões.....	44
6 – Referências bibliográficas.....	45
7 - Anexo I.....	57

1 - Introdução

A Leishmaniose é um complexo de doenças com sintomas clínicos diferentes. Apesar de suas diferenças, estas são causadas pela infecção por microrganismos do gênero *Leishmania* (Ordem *Kinetoplastidae*, família *Trypanosomatidae*). Dependendo da espécie do microrganismo, aquele infectado pode demonstrar sinais de parasitose da *Leishmania* com manifestações cutâneas, mucocutâneas, cutâneas difusas e viscerais. Dentre as diferentes formas da Leishmaniose, a mais alarmante é a forma visceral da doença, denominada de Leishmaniose visceral americana (LVA). Para o parasita conseguir infectar diferentes organismos, é necessária a participação de outros organismos que farão uma espécie de transporte da *Leishmania*, chamados de vetores. Estes são insetos denominados de flebotomíneos, mas são também conhecidos no Brasil por outros nomes como mosquito palha, birigui, asa dura e tatuquira (Braz *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2005; Rey, 2008).

Atualmente, a LVA é endêmica em 62 países com cerca de 90% dos casos ocorrendo basicamente em 5 países: Bangladesh, Índia, Sudão, Nepal e Brasil. A leishmaniose é considerada uma doença que merece destaque, sendo a quinta doença, na categoria de doença infectoparasitária, de maior importância em todo mundo, classificada como nível 1 de prioridade devido as suas ocorrências de novos surtos em diferentes partes do mundo (World Health Organization, 2009; World Health Organization, 2001).

A LVA, ou calazar, é potencialmente fatal para o homem. É uma doença crônica grave, cuja letalidade pode chegar até mesmo 10% dos casos, quando não é aplicado o tratamento adequado. Esta patologia possui uma grande distribuição geográfica, com enfoque nas regiões tropicais e subtropicais do mundo uma vez que os vetores encontram-se em abundância nas mesmas. Estima-se que no mundo todo existam 12 milhões de pessoas contaminadas com as diversas formas da doença. Além disso, cerca de 350 milhões de pessoas correm o risco de serem contaminadas (Davies *et al.*, 2003; Ettinger *et al.*, 2009; Jerônimo *et al.*, 1995; Frank *et al.*, 2010).

Apesar dos avanços expressivos dos estudos da biologia molecular e da imunologia das infecções, não existe, atualmente, nenhuma droga capaz de prevenir essa doença, o que justifica a necessidade a produção de antígenos recombinantes através de micro-organismos recombinantes para a produção de vacinas e *kits* para diagnóstico de elevada acessibilidade. Essa produção se tornou possível com advento da engenharia genética, que permite expressar qualquer gene em organismos hospedeiros, desde bactérias, fungos filamentosos, leveduras e

insetos, até plantas e mamíferos transgênicos, sendo necessário, para isso, o desenvolvimento de vetores específicos para tal finalidade (Borzani *et al.*, 2001; Valdez-cruz *et al.*, 2010).

Para a análise do rendimento final de uma proteína recombinante, vários parâmetros influenciam no mesmo, entre eles quais os nutrientes e suas devidas concentrações do meio de cultivo, qual a taxa de crescimento específico no momento que acontece a indução para expressar a proteína de interesse, quais os níveis de ácido acético e como está se dando sua produção durante o cultivo, qual o tipo de componente que iria induzir o organismo hospedeiro (IPTG ou lactose). Dentre esses parâmetros, o tipo de indutor exerce efeito significativo na expressão de proteínas recombinantes (Kilikian *et al.*, 2000; Pilarek *et al.*, 2011).

A indústria de bioprocessos está crescendo cada vez mais, e está se tornando mais frequente a produção de componentes por vias de produção em organismos recombinantes. Essa utilização de microrganismos recombinantes esta sendo cada vez mais acentuada no mercado de antibióticos, enzimas, hormônios e proteínas em geral. Para a produção dos produtos heterólogos, várias etapas são necessárias para a viabilidade do processo. Desde o aperfeiçoamento da engenharia genética no desenvolvimento de cepas que trazem consigo os melhores genes exógenos, até o apuramento da estratégia do processo de produção em si. Sendo assim, o estudo dessa estratégias de produção de produtos heterólogos são passos intrínsecos ao sucesso e viabilidade do bioprocessos (Rossi, 2001; Gupta *et al.*, 2009; Hortsch & Weuster-Botz., 2011).

A partir do apresentado, este trabalho tem como direcionamento analisar a influencia do tipo do indutor (IPTG ou lactose), assim como as estratégias de indução no quesito instante de indução e concentração da molécula indutora, para o processo de produção do antígeno 503 de *Leishmania i. chagasi* expresso em *Escherichia coli*.

2 - Revisão bibliográfica

2.1 - Leishmaniose Visceral

As leishmanioses são enfermidades provocadas por parasitas do gênero *Leishmania*, um protozoário que só completa seu ciclo evolutivo passando pelo menos em dois hospedeiros. Além disso se enquadra na categoria de uma zoonose, que são doenças que podem ser transmitidas entre o homem e animais vertebrados (Ministério da saúde, 2000).

Estes protozoários possuem as formas intracelular amastigota e extracelular promastigota. Esta primeira é ovalada e imóvel, exclusiva dos hospedeiros vertebrados, sem flagelo aparente e que pode ser encontrada no interior de células de defesa (glóbulos brancos) ou de outras células que possuem a habilidade da fagocitose, onde se multiplicam. A medida que se multiplicam, as células que servem como hospedeiras se rompem, liberando os parasitas que serão fagocitados por outros macrófagos. Não obstante, os protozoários saem do seu primeiro hospedeiro por meio de vetores. Estes fazem a ponte entre o primeiro e o segundo animal, podendo ser também o homem. Todas as suas espécies são transmitidas pela picada de mosquito fêmea infectadas de dípteros da sub-família *Phlebotominae*, de gênero *Lutzomyia* e *Phlebotomus*. Dentro destes as formas promastigota de *Leishmania*, vive extracelularmente, na luz do trato digestivo. Ali as formas amastigotas que foram ingeridas pelos insetos se diferenciam em formas morfológica, flagelada e bioquimicamente das amastigotas, as quais são posteriormente inoculadas em outro vertebrado. A partir da espécie do parasita, o hospedeiro pode apresentar sintomas que se manifestam sob as formas mucotânea, cutânea, cutânea visceral e difusa. No Brasil existem atualmente seis espécies de protozoários responsáveis por causar doença em humanos. As variedades mais encontradas são dois quadros clínicos distintos a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e a Leishmaniose Visceral (LV) ou Leishmaniose Visceral Americana (LVA). Os vetores da LVA são mosquitos denominados de flebotomíneos, mas são popularmente conhecidos no Brasil como mosquito palha, birigui, asa dura e tatuquira. (Wilson *et al.*, 2005; Killick *et al.*, 1979; Killick *et al.*, 1990; Killick *et al.*, 1991; Braz *et al.*, 2002; Walters, 1993; Rey, 2008).

A OMS se preocupa com a possibilidade de se contrair doença através das transfusões sanguíneas, uma vez que esta não é incluído na triagem dos exames de doadores. Dessa forma, a transmissão da doença atinge expansão e deslocamento rápido devido ao uso de

drogas injetáveis já que existe o compartilhamento das agulhas pelos usuários, usado a mesma seringa (Neves, 2000).

No Brasil, a LV é importante não somente pela sua ampla distribuição e alta incidência, mas também na probabilidade de assumir formas graves e fatais quando agregada ao quadro de má nutrição e infecções simultâneas, que agrava em muito a saúde do paciente. Particularmente na região Nordeste, a Leishmaniose alcança perto de duas mil pessoas anualmente, além de ser responsável por 92% dos casos. Pela crescente urbanização da enfermidade que ocorreu nos últimos 20 anos, novas estratégias de controle da doença são discutidas já que a mesma possui um ciclo de vida variado. O evento da doença em uma área definida vai de acordo com a presença do vetor e de um hospedeiro/ reservatório susceptível para que este protozoário possa se proliferar. O acréscimo do número de pessoas que correm o risco de serem contaminadas pode ser ilustrado pelas condições geográficas, especialmente, climáticas, representada pela alta pluviosidade, que favorece a propagação do mosquito do gênero *Lutzomyia* (Jerônimo *et al.*, 2004; Selvapandiyan *et al.*, 2012).

A Leishmaniose é uma doença com um largo espectro de evidências clínicas, distribuída em três tipos: 1) forma oligossintomática, assinalado pela sorologia positiva e presença de sintomas leves como hepatomegalia, febre e/ou esplenomegalia leve; 2) forma assintomática, distinguida por sorologia positiva para *Leishmania* sem nenhuma manifestação clínica, 3) forma completa ou clássica da doença, distinta por pancitopenia, hipergamaglobulinemia significativas hepatoesplenomegalia, febre, assim como um grave comprometimento da saúde geral. Estes sintomas podem progredir para: náuseas, dor abdominal, diarreia, vômitos, tosse e progressiva perda de peso, sugerindo estágios avançados da doença: edema dos membros inferiores, dores de cabeça, desnutrição, icterícia, ascite e hemorragias. Quando não tratada, o caso pode agravar e levar a morte em um ou dois anos posteriormente ao aparecimento dos sintomas (Jerônimo *et al.*, 2004, Drumond e Costa, 2011, Costa *et al.*, 2011).

Técnicas distintas podem ser empregadas para o diagnóstico de LV. Muitos avanços têm ocorrido nos últimos anos, entretanto, apesar do grande número de exames disponíveis para o diagnóstico da doença, nenhum proporciona 100% de sensibilidade. Não obstante, em casos humanos, o diagnóstico é frequentemente conduzido com base em parâmetros epidemiológicos e clínicos. Contudo, um diagnóstico decisivo requer a manifestação do parasita através de métodos parasitológicos. A análise clínica é complexa, já que a doença no homem pode exibir sinais e sintomas que aparecem também a outras patologias nas áreas

endêmicas de leishmaniose, como por exemplo, malária, doença de chagas, tuberculose, esquistossomose e febre tifoide (Gontijo *et al.*, 2004).

Apesar de que exista um tratamento para a LV, opções para o controle dessa doença (vacinas, imunoterapêutica, quimioterapêutica e controle do vetor) são ainda imperativas. Estudos imunoterapêuticos da Leishmaniose visceral assim como estudos imunológicos de mecanismos de patogênese sugerem mecanismos sítios específicos no tecido (para fígado, baço, e nódulos linfáticos). Em consequência, uma das modificações no desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose visceral é a indução de proteção de vários sítios bem como de sítios distintos nos tecidos (Costa *et al.*, 2011).

Recentemente, o único tratamento para leishmaniose é utilizando drogas. Entretanto, o uso prolongado e a terapia ineficiente do tratamento tem resultado na resistência à droga. Atualmente, mais de 60% dos casos clínicos são resistentes à primeira linha de droga utilizada para o tratamento, os antimoniais (Sundar *et al.*, 2006).

Nos últimos sessenta anos, o tratamento da LV vem sendo realizado com dois antimoniais pentavalentes: o estibogluconato de sódio-Pentostan® e o antimoniato de N-metil glucamina-Glucantime®, que são os medicamentos escolhidos primeiramente. No entanto, este tratamento é problemático, uma vez que estas drogas utilizadas são tóxicas e de alto custo, atrelado ao fato de que a resistência a droga está emergindo, particularmente na Índia. O principal efeito colateral do glucantime é sua ação sobre o aparelho cardiovascular, sendo desaconselhável sua utilização durante os dois primeiros trimestres de gravidez. O tratamento da doença com antimonial deve ser feito com um controle rigoroso, já que se trata de medicação que certamente pode apresentar efeitos tóxicos em vários órgãos como no fígado, rim, pâncreas, e principalmente no coração, podendo desencadear mau funcionamento do mesmo, caracterizada por graves arritmias que podem ser até fatais (Davies *et al.*, 2003; Sundar, 2001). A droga preferida para o tratamento da LV é o Glucantime, contudo, caso a resposta não seja adequada, há de se fazer a escolha de outros medicamentos como: Anfotericina B, Aminosidina, Pentamidina e Imunoterapias com Interferon (Selvapandiyar *et al.*, 2012). Como alternativa no Brasil, é utilizado a anfotericina B juntamente com suas formulações lipossomais (anfotericina B - dispersão coloidal e lipossomal), além das pentamidinas (mesilato e sulfato) e os imunomoduladores (GM-CSF e interferon gama). Excluindo as duas primeiras drogas, as outras se encontram ainda em fase de investigação. O uso destas drogas somente deve ser realizada em locais apropriados, como hospitais de referência (Ministério da saúde do Brasil, 2003).

Foi observado que indivíduos desenvolveram imunidade contra a reinfecção, após a recuperação clínica de leishmaniose, sugerindo que o princípio da vacinação é algo que pode ser posto em prática. Assim, indivíduos que se recuperam da infecção podem desenvolver uma proteção duradoura e que um candidato a vacina pode controlar a infecção e evocar o sistema imunológico (Hertwaldt, 1999; Pearson *et al.*, 1996; Fortier *et al.*, 1991; Nakhasi *et al.*, 1989).

Drogas novas, como miltefosine e AmBisome, têm mudado o modo do tratamento da leishmaniose, porém o custo dessas novas terapias leva a distintas práticas de tratamento, com relação a condição socioeconômica e cultural de cada local (Marty, 2002).

Deste modo, pelo elevado custo e toxicidade dos compostos utilizados para diagnóstico e cura da doença, faz-se imperativo procurar por alternativas mais eficazes e menos invasivas ao organismo humano (Selvapandiyan *et al.*, 2012).

LeIF é um gene de uma espécie do protozoário com homologia para PRE (proteína ribossomal eucariótica) eIFF4A, (43 kDa), e server como um forte indutor da produção de interferon gama (INF – γ) nos nódulos linfáticos, pelos linfócitos (Martins *et al.*, 2006). Uma vacina que contenha coquetel de LeIF, assim como outros fatores de transcrição, levar a proteção em vertebrados contra leishmaniose cutânea.

O LACK (Leishmania análogo dos receptores ativados por proteína quinase C), (36kDa) é altamente conservado entre espécies de *Leishmania i. chagasi* e expresso por ambas formas do parasita promastigota e amastigota. Pesquisas apontam que o código do DNA para o antígeno LACK promove proteção contra *Leishmania i. chagasi* maior. Porém, a vacina LACK DNA, ainda altamente imunogênica, erra na proteção contra leishmaniose visceral em infecções intradermal e intravenosa, indicando que deve ser descartada a possibilidade de LACK (Leishmania análogo dos receptores ativador por proteína quinase C) ser usado como antígeno em uma vacina baseada em DNA contra LV (Selvapandiyan *et al.*, 2012).

Por outro lado, é plausível aprimorar testes de diagnósticos podendo produzir uma combinação de antígenos para expressar ou detectar uma resposta imunológica, como o antígeno 503 (fator de alongamento 1- γ), uma vez que certas pessoas quando sujeitas a antígenos podem ser assintomáticas (Martins *et al.*, 2006).

2.2 - Biotecnologia e DNA recombinante

Biotecnologia pode ser definida como moléculas biológicas ou organismos que são usados para produção industrial. Este termo inclui processos que foram usados por séculos, como por exemplo produção de álcool, assim como o descobrimento em anos mais recentes da engenharia genética (Lubineicki, 1997; Salomaa *et al.*, 1995; Walsh, 2000).

Na farmacologia, a biotecnologia é chamada biotecnologia farmacêutica, a qual produz biofármacos. Estas são proteínas com funções terapêuticas, e recentemente o ácido nucleico vem sendo usado em terapia gênica, o qual vem sendo produzido por meio da engenharia genética ou biotecnologia tradicional. A indústria da biotecnologia vem se desenvolvendo dinamicamente nos últimos 30 anos. Atualmente, existem mais de 10.000 companhias farmacêuticas produzindo um total de 5.000 biofármacos. Entretanto, somente 100 destas companhias têm a proeminência e foco para a indústria. O sucesso das sulfonamidas e insulina deram nova ênfase para a indústria, a qual foi posteriormente crescida com o início da manufatura da penicilina em escala industrial, nos anos de 1940 (Walsh, 2000, Maybe, 1984; Weng *et al.*, 2000).

Nos anos de 1971-1973 a nova tecnologia tornou-se mais palpável e se tornou uma grande virada para a comunidade científica. Foi a tecnologia do DNA recombinante, conhecido também como engenharia genética, que hoje é a base para os processos biotecnológicos. A reação em cadeia da polimerase é um dos elementos chave na tecnologia do DNA recombinante. A técnica, descoberta em 1985 por Mullis permite pesquisadores a produzir milhões de cópias de uma sequência específica de DNA em aproximadamente duas horas (Combettes-Souverain *et al.*, 1998).

Os processos biotecnológicos básicos usados largamente na indústria farmacêutica, exceto os da tecnologia de DNA recombinante, utilizam biocatalisadores, tecnologia de anticorpos monoclonais, tecnologia de vacinas, engenharia metabólica e mais recentemente terapia gênica. Entretanto, estes processos são amplamente baseados nas ferramentas da engenharia genética. A ideia do DNA recombinante foi primeiramente proposta por Peter Lobban, um estudante de graduação do professor Dale Kaiser, do departamento de Bioquímica da Universidade de Stanford. A tecnologia do DNA recombinante permite que o DNA seja produzido por meios artificiais. O procedimento é usado para mudar DNA em organismos vivos e pode ter muito mais usos práticos no futuro. É uma área da medicina que se apresenta em sua fase inicial do seu potencial total (Maybe, 1984).

O pilar das tecnologias da biologia molecular é o gene. Para facilitar o estudo dos genes, eles podem ser isolados ou amplificados. Um método de isolamento e amplificação de um gene de interesse é clonar o gene, inserindo-o em outra molécula de DNA que serve como

um veículo ou vetor que pode ser replicado pelas células. Quando estes dois DNAs de origens diferentes são combinados, o resultado é uma molécula de DNA recombinante (Redwan, *et al.*, 2008).

A clonagem do gene compreende no mínimo dois estágios importantes: primeiro, a parte do DNA de interesse é ligado a uma molécula de DNA (plasmídeo) para assim formar a molécula do DNA recombinante; esta molécula do DNA recombinante é então introduzida numa célula hospedeira compatível, em num processo chamado transformação. Esta célula que agora está com a molécula do DNA recombinante passa a ser chamada de célula transformada. A terminologia da clonagem é proveniente da genética bacteriana, a qual faz a consideração de que uma única colônia de bactérias é na verdade um clone, visto que todas as células que compõem a colônia são na verdade geneticamente iguais à bactéria inicial (Linden, 2010).

Atualmente, a tecnologia do DNA recombinante atraiu o foco quando foi usado em animais, tanto para criar cópias do mesmo animal quanto para criar uma espécie totalmente nova. Uma dessas novas espécies é o GloFish™, um tipo de peixe que parece brilhar no escuro com uma luz fluorescente. Enquanto este se tornou um peixe de aquário popular, a tecnologia possui outros usos. A tecnologia do DNA recombinante não é aceita em todos os aspectos, especialmente em questões que refletem o valor da vida. Além disso, pelo fato de parte do trabalho do DNA envolve o uso e destruição de embriões, existe mais controvérsia criada. Ainda assim, os que defendem o uso da tecnologia alegam que o objetivo final do uso é para beneficiar a vida humana, e não destruí-la. Neste contexto, a utilização de artifícios como a do DNA recombinante expande o leque para o aprofundamento do estudo da estrutura e função de proteínas, especialmente, as proteínas recombinantes no contexto de um sistema procarioto como hospedeiro (Larson *et al.*, 2007).

2.3 – *Escherichia coli* e proteína heteróloga

Até os anos de 1970, *Escherichia coli* era uma bactéria que não tinha grande importância industrial. Após o advento da tecnologia do DNA recombinante, mudou-se a visão que existia sobre essa perspectiva, principalmente, uma vez que grande parte desta tecnologia se desenvolveu com estudos utilizando este micro-organismo (Lima, 2004).

A escolha da célula hospedeira - a qual o maquinário da síntese vai ser efetuado, que produzirá a proteína - define a tecnologia necessária para o projeto, a variedade das

ferramentas moleculares, equipamento, reagentes, entre outros. Entre microrganismos, os hospedeiros que estão disponíveis incluem bactérias, fungos e algas unicelulares. Todos possuem vantagens e desvantagens quanto ao uso, e sua escolha está subjetiva ao tipo de proteína de interesse (Demain and Vaishnav, 2009; Adrio and Demain, 2010).

Por exemplo, se for necessário uma modificação pós translacional eucariótica, um sistema de expressão procariótico pode não ser a melhor escolha (Sahdev *et al.*, 2008). As vantagens de se utilizar *E. coli* como o organismo hospedeiro são bem conhecidas: (i) Possui cinética de crescimento sem paralelos. Dado condições de cultivo ótimas, seu tempo de geração é de aproximadamente 20 minutos (Sezonov *et al.*, 2007). Entretanto, deve ser notado que a expressão da proteína recombinante pode ocasionar um estresse metabólico no microrganismo, causando um decréscimo considerável no tempo de geração (Bentley *et al.*, 1990). (ii) Culturas com alta densidade celular são facilmente atingidas. O limite de densidade teórico de uma cultura líquida de *E. coli* é estimada em 200g de peso celular seco por litro ou aproximadamente 1×10^{13} bactérias viáveis por mililitro (Lee, 1996; Shiloach and Fass, 2005). Entretanto, o crescimento exponencial do meio complexo leva as densidades muito inferiores a esse número. Em um esquema simples de laboratório chega a se atingir 1×10^{10} como limite superior, o que é menos de 0,1% do limite teórico (Sezonov *et al.*, 2007). Por essa razão, métodos de cultura de alta densidade celular foram engenhados para aumentar o crescimento da *E. coli*, mesmo quando produzindo proteína recombinante (Choi *et al.*, 2006). (iii) Um meio de cultura complexo e rico pode ser feito com componentes prontos disponíveis e baratos. (iv) Transformação com DNA exógeno é rápido e fácil. A transformação com o plasmídeo da *E. coli* pode ser feita em um tempo de 5 minutos (Pope and Kent, 1996). (v) A *E. coli* é o microrganismo mais bem estudado e explorado na atualidade. O denso conhecimento da sua fisiologia e arranjo genético admitiu que fossem desenvolvidas e aperfeiçoadas diversas técnicas de manipulação genética (Jana & Deby, 2005; Manderson *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2011).

Contudo, embora todo o conhecimento sobre o microrganismo, os cultivos são comumente realizados em condições aeróbias, pois, o crescimento anaeróbio provê menos energia para o metabolismo realizar síntese proteica, incitando a formação de acetato (Ahamed & Vermette, 2010). De modo a se garantir que a provisão de oxigênio não se esgote, a estratégia descontínuo-alimentada é usada amplamente nos cultivos (Pei *et al.*, 2011).

Apesar de existir muito conhecimento acumulado sobre *E. coli*, isto não será motivo para garantir um aparelho de expressão eficiente que englobe todas as proteínas

recombinantes. Limitações no sistema de expressão da bactéria foram encontradas, como por exemplo: (i) As proteínas que são produzidas estão na forma insolúvel estão biologicamente inativas em corpos de inclusão. Não obstante, por meio de complexos processos, a bioatividade dessa proteína pode ser reconstituída, os quais crescem os custos e diminuem a produtividade; (ii) A inabilidade de efetivar modificações pós-traducionais, atividade comum em eucariotos; (iii) Inexistência de um sistema que possa secretar a proteína de interesse recombinante para o meio de cultura (Tomazetto *et al.*, 2007).

A temperatura para um crescimento ótimo da bactéria (37 a 39°C) encaixa-se com a temperatura ótima para a indução do operon lac. A utilização de temperaturas com valores menores diminui as alterações metabólicas indesejáveis, como por exemplo, a síntese de proteases. Dessa forma, o rendimento do produto de interesse aumenta, o que ainda contribui para aumentar a solubilidade da proteína, ou seja, ajuda também reduzindo o desenvolvimento dos corpos de inclusão. A diminuição da temperatura melhora também a capacidade de liberação da proteína, o que contribui para a conformação ajustada e diminuição da lise celular (Donovan *et al.*, 1996; Tomazetto *et al.*, 2007; Valdez-Cruz *et al.*, 2010).

A produtividade de um biorreator que abrange clones recombinantes é alterada pela taxa em que as células que não contém plasmídeos são geradas e alaistradas. Este comportamento foi observado e é encarregado por obstáculos no escalonamento necessário para comercialização de produtos recombinantes (Lima, 2004).

A ausência de plasmídeo por má distribuição dos membros entre células filhas no tempo da divisão celular é também conhecida como instabilidade segregativa. Uma fonte alternativa de instabilidade é ocasionada pelas mudanças estruturais como deleção, mutação, inserção e disposição do DNA do plasmídeo. Tal perfil de instabilidade chama-se de instabilidade estrutural. As células derivadas, sem plasmídeo ou com alterações estruturais, são improdutivas e cooperam para uma menor produtividade do processo (Tomazetto *et al.*, 2007).

A partir deste desafio e com o objetivo de aumentar a estabilidade do plasmídeo, a estratégia utilizada chama-se método seletivo. Tais métodos contêm a manutenção da pressão seletiva com a utilização de antibióticos no meio de cultura (Vidal *et al.*, 2005).

A melhora no processo de expressão de uma proteína recombinante pode facilitar o passo seguinte da purificação. Consequentemente, alcançando altos níveis de expressão da proteína é um passo essencial no desenvolvimento de um bioprocessos, de modo a maximizar os ganhos e viabilidade econômica. Entretanto, não existe um único processo universal para

expressar as proteínas no hospedeiro, uma vez que os níveis de expressão de gene heterólogo vai depender de múltiplas variáveis, como o tipo e a concentração do indutor, a composição do meio de cultivo, o instante de indução, a produção de acetato, e o modo de operação do reator (Larentis *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2012), que são específicas para cada sistema recombinante. Todas essas variáveis devem ser cuidadosamente avaliadas, pois podem influenciar o sistema como um todo (Barry, 2000; Larentis *et al.*, 2011).

2.4 - Meio de cultivo e operon lac

A constituição do meio em que a bactéria irá se desenvolver deve ser cuidadosamente formulada e monitorada, pois é passível de ter efeitos expressivos nas células assim como na produção da proteína (Jana & Deby, 2005). Os nutrientes que compõem o meio e a escolha de variáveis de cultivo como, por exemplo, temperatura, pH entre outros parâmetros podem afetar os níveis de produção, a operação proteolítica e a secreção (Hoffmann *et al.*, 2004).

Com o objetivo de se alcançar a alta densidade celular é preciso o desenvolvimento de meios de cultivo que possuam todos os nutrientes que são necessários para dar suporte ao crescimento celular (Makrides, 1996). Dentre os componentes nutricionais necessitados pela bactéria estão entre eles a fonte de carbono (para dar energia a célula), nitrogênio (que dá suporte para a construção de proteínas), fósforo, potássio, ferro, zinco e outros elementos (Hortsch & Weuster-Botz *et al.*, 2011).

O meio definido, na qual as concentrações dos nutrientes estão bem estabelecidas, conhecidas e controladas durante o processo, é normalmente utilizado para se obter uma alta concentração celular (Tomazetto *et al.*, 2007). Entretanto, durante a elaboração do meio de cultivo, precisa-se evitar o desenvolvimento de complexos insolúveis, em virtude da concentração de vários íons (fósforo, cloreto, magnésio, amônia), o que pode intervir no procedimento da fermentação (Valdez-cruz *et al.*, 2010).

Mudanças na composição do meio de cultivo podem agir de forma positiva na competência de produção de células, garantindo os nutrientes necessários, podendo também desfavorecer o aparecimento de condições de estresse da célula, fenômeno conhecido “metabolic burden” que marca uma menor produtividade do sistema (Hoffmann *et al.*, 2004).

Já em meios de cultivo complexos, o montante de nutrientes age de modo que o micro-organismo consuma este conjunto para seu metabolismo e a fonte de carbono (glicose)

de modo a obter energia, usando vias fermentativas como uma forma de poder regular o fluxo de nutrientes presentes. Dessa forma, uma maior concentração de extrato de levedura, por exemplo, pode causar uma maior concentração de subprodutos indesejados no sistema como, por exemplo, o ácido acético (Kilikian *et al.*, 2000; Valdez-cruz *et al.*, 2010).

A evidenciação de promotores e repressores particulares do genoma da *E. coli*, admitiu o manuseio da expressão de proteínas e a clonagem do material genético sob controle de um promotor, a qual expressão pode ser por meio de uma indução ou contínua. Esta primeira é mais comumente usada, e a indução no sistema de expressão das proteínas heterólogas nesta bactéria se baseia no operon lac (Ettinger *et al.*, 2009).

Devido a imprescindibilidade que as bactérias têm em apresentar um ágil retorno a mudanças no meio ambiente, torna-se natural que genes que agem sobre um mesmo composto sejam co-traduzidos. Quando se tratando do operon lac, na presença de lactose o operon vai ficar ativo e assim os genes serão traduzidos, e de forma análoga, na ausência da lactose não haverá a transcrição do operon. O operon lac é um conjunto de genes estruturais que codificam as enzimas necessárias do metabolismo de lactose, os quais são controlados por sequências, chamadas de promotoras e operadoras (Tian *et al.*, 2011).

O funcionamento dessas regiões acontece a partir de uma proteína repressora que é codificada por um gene que está fora do operon. Essa proteína repressora é, por sua vez, inibida pela presença de lactose no meio. Sendo assim, é comum encontrar em organismos procariotos genes categorizados ou agrupados devido a terem função na mesma via metabólica, e até mesmo associados na própria sequência que eles atuam (Pei *et al.*, 2011).

2.4 – Estratégias de cultivo e ácido acético

O método de cultivo é importante para a obtenção de altas densidades celulares e alta produção de proteínas recombinantes, uma vez que ele afeta as condições nutricionais e ambientais que são necessárias para o crescimento e desenvolvimento do microrganismo e da produção da proteína. Devido a isso, diferentes métodos empregando estratégias de alimentação são desenvolvidos, que visam prevenir o excesso de alimentação - no qual concentrações inibitórias dos componentes de alimentação se sobressaem e são acumulados no fermentador, ou a subnutrição, na qual os microrganismos ficam com carência de nutrientes. O método da escolha depende de diferentes fatores, como por exemplo:

metabolismo do microrganismo escolhido, o potencial de produção de compostos inibidores e as condições de indução do composto heterólogo (Shaojaosadati *et al.*, 2008).

Dentre as formas clássicas de se reger um processo, a descontínua alimentada é a mais empregada e difundida na literatura para se atingir elevadas concentrações celulares com altas produtividades dentro de um reator. Este tipo de processo apresenta vantagens em relação ao método descontínuo simples, principalmente, quando abrange fenômenos inibitórios pois é possível controlar o provimento de substrato, logo, a velocidade específica de crescimento (Hiss, 2001).

Apesar disso, o processo contínuo apresenta, quando comparado ao descontínuo alimentado, a desvantagem de não admitir a aquisição de concentrações celulares tão elevadas por causa da constante remoção de meio do reator, e utilização mais bem empregada nos casos em que as operações seguintes (como uma purificação) ainda podem ser dirigidas de forma contínua. Não obstante, o risco de prejuízo da informação genética dos plasmídeos acumula com o tempo de cultivo. Estratégias de cultivo distintas têm sido averiguadas para processos de cultivo de proteínas recombinantes, como por exemplo, adição de meios complexos e a adição de inibidores de compostos danosos a proteínas (Valdez-cruz *et al.*, 2010).

Quando é necessária uma produção em escala industrial, altas densidades celulares se fazem imprescindíveis para o rendimento como um todo. Para isso, diferentes estratégias de alimentação de nutrientes são empregadas (Rienseberg *et al.*, 1990; Pinsach *et al.*, 2008; Voulgaris *et al.*, 2011). O modo de alimentação mais usado com o objetivo mencionado anteriormente é a estratégia descontínua alimentada (Gombert & Kilikian, 1997; Sharma *et al.*, 2007; Xue *et al.*, 2010; Alfasi *et al.*, 2011). Nesse tipo de estratégia, os nutrientes são continuamente adicionados ao meio. O modo como estes nutrientes são adicionados é que variam para cada fermentação, de acordo com o melhor rendimento. Assim, estes nutrientes são colocados em montantes limitantes de forma a poder controlar as condições que está sendo realizado o cultivo. Condições como a acumulação de produtos inibidores e/ou tóxicos, a disponibilidade de oxigênio e o metabolismo celular (Lima, 2004).

O processo de batelada alimentada é uma estratégia adequada para a produção em cultura de alta densidade celular devido a, por exemplo: (1) prolongamento do tempo de cultivo, (2) condições controladas para a adição de substratos durante a fermentação e (3) o controle sobre a produção de subprodutos, devido à disposição limitada de alguns substratos que são necessários para a formação do produto (Shaojaosadati *et al.*, 2008). No cultivo

descontínuo alimentado, a estratégia de alimentação é o fator mais importante no sucesso do processo. Estratégias de alimentação diferentes, incluindo alimentação linear, o aumento da taxa de alimentação por degrau, e a alimentação exponencial foram usadas para obter elevadas densidades de células em culturas batelada alimentada (Shiloach e Fass, 2005; Lee, 1996).

Na alimentação linear, nutrientes concentrados são alimentados para dentro do biorreator a uma taxa predeterminada. Devido ao aumento do volume de cultura e a concentração de células no biorreator, a taxa de crescimento específica diminui continuamente, e o aumento da concentração das células diminui ao longo do tempo (Jensen e Carlsen, 1990).

Taxas de alimentação variáveis podem ser controladas com *feedback* ou sem *feedback*. O pulso único ou gradual do aumento da taxa de alimentação pode aumentar o crescimento de células através do fornecimento de mais nutrientes em concentrações mais elevadas de células (Jensen e Carlsen, 1990; Konstantinov *et al.*, 1990).

As células podem crescer exponencialmente durante todo o período de cultura, se a taxa de alimentação do substrato limitante do crescimento é aumentado em proporção com o crescimento (Shiloach e Fass, 2005; Yee e Blanch, 1993; Enfors e Strandberg, 1991). A estratégia de alimentação exponencial foi elaborada para permitir que as células se multipliquem com uma taxa de crescimento específico de valor constante ou variável. Além disso, ele fornece a vantagem de que a produção do inibidor do processo pode se tornar mínima, através do comando da taxa de crescimento específico, de forma a mantê-lo com valores menores que o valor crítico de formação de acetato (Shaojaosadati *et al.*, 2008). Um simples, porém, eficiente método que tem sido usado com sucesso para o cultivo de células de alta densidade de vários microrganismos não recombinantes e recombinantes, no qual a taxa de crescimento específico normalmente é mantida entre os valores mínimos e máximos atingíveis. Mantendo a taxa de crescimento específica entre valores adequados, podem fornecer uma condição metabólica e os resultados desejáveis com o máximo de produtividade. Desse modo, a alimentação exponencial pode ser utilizada como um método conveniente para evitar a formação de subproduto e para se obter a densidade celular máxima atingível (Shiloach *et al.*, 2005;. Khalilzadeh *et al.*, 2004 e 2003;. Tabandeh *et al.*, 2004; Thuesen *et al.*, 2003; Lee, 1996; Yee e Blanch, 1993).

Esse ultimo tipo de fermentação pode ser limitado por vários fatores, como por exemplo: Qual a hospedeira utilizada para a cepa, qual a proteína recombinante de interesse, a construção do plasmídeo, o meio de cultivo e o indutor utilizado. Entretanto, o fator que

limita a fermentação mais importante é a produção de metabólitos inibitórios que chegam a uma concentração crítica de forma a dificultar a produção, como por exemplo o ácido acético (Luli & Strohl, 1990; Wong *et al.*, 2008; Casey *et al.*, 2010)

Nos tipos de cultivo utilizando *E. coli*, dois fatores devem ser postos em pauta no desenvolvimento de uma fermentação, com o objetivo do máximo rendimento volumétrico no que se refere a um produto heterólogo. São eles o estudo de como as condições de cultivo influenciam no rendimento da célula, avaliada no produto específico; e as estratégias de cultivo para a aquisição de altas concentrações celulares (Riesenberg *et al.*, 1990). A velocidade específica de crescimento - μ_x - no tempo que antecede a indução do produto heterólogo é também uma variável muito estudada, pois pode apontar o estado fisiológico da bactéria na fermentação. Como o metabolismo de *E. coli* é aeróbio facultativo, vale controlar a baixa concentração de glicose (perto de nulo), o oxigênio dissolvido acima de 20% e a velocidade específica de crescimento (Tomazetto *et al.*, 2007). Para se controlar os processos fermentativos de *E. coli* que tenham como propósito alcançar altas concentrações celulares, os parâmetros mencionados anteriormente são considerados, de forma a evitar a formação de compostos inibitórios (Luli & Strohl, 1990; Gombert & Kilikian, 1997; Wang *et al.*, 2010).

Um melhoramento do processo de expressão da proteína heteróloga pode até mesmo simplificar o processo seguinte da purificação. Consequentemente, altos níveis de da proteína de interesse é uma etapa necessária ao desenvolvimento do processo, tendo em vista o lucro máximo e a viabilidade econômica. Apesar disso, não existe um único processo universal para a expressão de todos os compostos heterólogos, pois o nível de expressão de um gene heterólogo irá depender de múltiplas variáveis que são específicas a cada sistema recombinante. Estas variáveis devem ser cuidadosamente analisadas e estudadas, uma vez que influenciam no processo (Barry *et al.*, 2000; Larentis *et al.*, 2011).

Quando existe uma expressão muito intensa de uma proteína heteróloga, isso acarreta o chamado “metabolic burden” sobre a energia metabólica da célula, o que pode resultar na redução do crescimento celular. Isto pode ser evitado pelo emprego de sistemas de expressão induzíveis. A principal diferença entre as culturas recombinantes induzidas e as culturas não induzidas é a síntese de energia, transcrição e tradução de genes por meio de um composto indutor (Haddadin *et al.*, 2005). O indutor pode ser um produto químico ou a modificação de um parâmetro físico, como a temperatura. A quantidade de indutor, a estratégia de suas condições de adição e de cultura no tempo da indução pode afetar a eficiência da mesma. A estratégia de indução ótima pode ser determinada por métodos de tentativa e erro, ou

tomando os efeitos de várias condições de cultura sobre a expressão do gene recombinante (Shin *et al.*, 1997).

A quantidade de indutor necessária para ultrapassar as moléculas repressoras é função da massa total de células e a concentração específica do indutor. Por conseguinte, este deve ser determinado para maximizar a síntese de proteínas recombinantes em qualquer concentração de células. O nível de indutor necessário para a expressão ótima depende da força do promotor, a presença ou ausência de genes repressores num plasmídeo, a localização celular do produto, a resposta da célula para a expressão da proteína recombinante, e a solubilidade da proteína alvo e as características da própria proteína (Cserjan-Puschmann *et al.*, 2002; Donovan *et al.*, 1996).

Por exemplo, Shin *et al.*, (1997) testaram uma gama de quantidades específicas de indutor, o IPTG, ($3,26 \times 10^{-3}$ a $5,11 \times 10^{-2}$ mmol / g de células) na produção de mini-Proinsulin e relatou $5,11 \times 10^{-2}$ mmol / g de células concentração como ideal. Vidal *et al.*, (2005) avaliaram como o modo de operação influenciava na produção de rhamnulose 1-fosfato-aldolase, quando utilizaram uma cepa recombinante de *E. coli*, com promotor de T5. Eles relataram que trabalhar em batelada alimentada, batelada e cultura em frascos com a mesma concentração de IPTG, gera o mesmo nível de atividade específica.

Gombert (1996) analisou a proteína troponina C (TnC) como proteína heteróloga utilizando a lactose como indutor. O estudo mostrou que o processo descontínuo alimentado quando em tempo de excesso acarretou o acúmulo de metabólitos inibidores acima do valor crítico, o que compromete a produção. Não obstante, o estado das células no que se refere ao aspecto fisiológico não pôde ser bem qualificado por meio do μ constante, uma vez que houve variações no valor da mesma ao longo da fase descontínua alimentada e uma diminuição no valor do μ , quando analisado no final desta etapa. Essa situação aparece, provavelmente, por causa da diminuição gradativa verificada para $Y_{x/s}$ com o acréscimo da concentração celular (X).

Donovan *et al.*, (1996) revisaram os fatores que influenciam no que se refere a expressão de proteínas de interesse heterólogas, se restringindo aos promotores operon lac e tac, realizados em cultivos em batelada e batelada alimentada, para a máxima produção da proteína. Foi visto a influência que o meio de cultivo causava no processo, a temperatura e o tipo de indutor. Como resultado, viram que a concentração do IPTG afetava na localização do amontoamento de proteínas. Relataram também que a lactose comportava-se de forma semelhante ao IPTG na indução da proteína de interesse, entretanto, esta deve ser fornecida

de forma mais controlada uma vez que serve também como substrato (fonte de carbono) para a bactéria.

Harrison *et al.*, (1997) avaliaram como o meio de cultivo poderia influenciar na produção de uma proteína heteróloga como a adição de meios complexos, de forma isolada ou em mistura. Processos de cultivo como o descontínuo e descontínuo alimentado são utilizados para poder comparar a relação entre taxa de crescimento, no caso, específica e a formação de proteína. O descontínuo alimentado, por exemplo, pode permitir um controle mais adaptado a fase de crescimento, e com isso, conseguindo altas densidades celulares no processo.

Gombert & Kilikian (1998) viram o quanto o modo de indução diferenciado poderia influenciar na produção da proteína troponina C (TnC), utilizando-se *E. coli* BL21(DE3) plysS e lactose como molécula indutora. Nas estratégias ajustadas a indução duas variáveis devem ser atentadas: a concentração na qual a lactose é adicionada no processo, e de que modo como esse composto que vai expressar a proteína de interesse é colocado. Neste estudo, compararam o rendimento com como os intervalos de adição de pulsos de lactose o influenciariam. Como resultado, uma concentração residual do indutor e a inclusão do extrato de levedura no tempo do segundo e terceiro pulso de indutor acarretaram em um efeito positivo para a expressão do composto de interesse. Então, os resultados mostram como a lactose pode ser usada como molécula indutora. Além disso, foi visto também que a inibição ao crescimento de *E. coli* iniciava quando a concentração do subproduto inibitório ácido acético atingia picos maiores que 0,9 g/L.

Panda *et al.*, (1999) avaliaram o instante de indução com o objetivo de maximizar a expressão do hormônio de crescimento ovino (r-oGH) utilizando *E. coli* M15 e IPTG como indutor em processos descontínuos e descontínuos alimentados. A etapa da fase exponencial, neste estudo, foi classificada como a mais adequada para a primeira indução, pois foi a que obteve a maior concentração celular e a maior produtividade do hormônio de interesse.

Gonçalves *et al.*, (2008) utilizaram de meio definido e estratégia de cultivo em batelada alimentada com vazão exponencial e velocidades específicas de crescimento variadas na produção da Proteína de superfície de *Streptococcus pneumoniae* (rFPspA1) e avaliar a diminuição da concentração do indutor - IPTG – empregando a lactose. Alta densidade celular foi obtida nos ensaios de batelada alimentada com vazão exponencial. A que atingiu a menor velocidade específica de crescimento levou a maior concentração celular e a menor produção de acetato antes da indução. A maior produção e produtividade da

proteína de interesse foram obtidas quando glicose foi adicionada ao meio durante a indução com IPTG e lactose.

Pei *et al.*, (2011), com uma estratégia de batelada alimentada exponencial e usando lactose como componente indutor, avaliou a produção de 2-deoxiribose-5-fosfato aldolases em *E. coli* BL21. Neste estudo, controlou-se a taxa de crescimento específico e os resultados mostraram que a concentração do indutor na alimentação conseguia afetar diretamente na expressão do composto heterólogo. Notou-se também que a estratégia da batelada alimentada sustentou a concentração de ácido acético com níveis inferiores a 0,5g/L, o que não ocasionou efeito inibitório no cultivo.

Larentis *et al.*, (2014) avaliaram como a concentração de IPTG poderia influenciar na expressão de LigB (131-645aa) em *E. coli* BL21 (DE3), assim como o tempo da indução em processos em incubador rotativo e micro biorreator. Nos experimentos realizados a indução foi feita com a DO entre 0,75 e 2, e a concentração do indutor variou entre 0,1 e 1 mM. Assim, o estudo mostrou melhores rendimentos para a máxima absorbância (2,0) durante a etapa exponencial do processo, e o para a mínima concentração de IPTG (0,1 mM), pois níveis mais altos causaram mais danos ao crescimento celular.

3 - Materiais e métodos

3.1 - Microrganismo

Nos experimentos realizados, foi utilizada uma cepa da bactéria *Escherichia coli* M15. Nesta cepa foi inserido o plasmídeo pQE-30 (Qiagen, Valencia, CA) contendo a sequência codificante do antígeno 503 de *Leishmania i. chagasi*, o qual possui uma calda (“tag”) com seis resíduos de histidina na sua extremidade terminal. A cepa foi cedida pela Dra. Mary Wilson (University of Iowa, U.S.A.) e de acordo com o descrito na literatura o peso molecular do antígeno 503 é 56 kDa (Martins *et al.*, 2006).

3.2 - Meio de cultivo

O meio de cultivo utilizado nos experimentos, seja em incubador rotativo ou em biorreator, foi o 2xTY, cuja composição é mostrada na Tabela 1. Os componentes do meio de cultivo foram pesados, solubilizados em água destilada e esterilizados (juntamente com os recipientes necessários para seu uso) em autoclave a 1 atm durante 20 minutos, previamente a ser utilizado.

Tabela 1 - Composição do meio 2xTY

Nutrientes	Concentração (g/L)
Triptona	16,0
Extrato de levedura	10,0
NaCl	5,0
pH	7,0

3.3 - Antibióticos

Para garantir a seletividade da bactéria com o plasmídeo, os meios de cultura foram suplementados com ampicilina- estoque 100 mg/mL (concentração de trabalho: 100µg/mL) – e canamicina- estoque 25 mg/mL (concentração de trabalho: 25µg/mL). Ambos foram preparados em condições de assepsia e esterilizados utilizando-se de filtro de 22 µm de poro. O armazenamento se deu na temperatura de -20 °C.

3.4 - Estudo da influencia do indutor e estratégias de indução na expressão do antígeno 503

Foram realizados cinco ensaios buscando o rendimento máximo da proteína de interesse. Os experimentos I e II foram realizados em incubador rotativo para avaliar a influência do indutor (IPTG e lactose). O ensaio I avaliou a influência do IPTG e o ensaio II a influencia da lactose. Os ensaios III e IV ponderaram a concentração do indutor e o instante de indução e como estes parâmetros mudavam a produtividade do processo, em biorreator. O ensaio III foi induzido em 2 horas de cultivo, e o ensaio IV em 6 horas, utilizando-se lactose como indutor em ambas. No experimento V, a indução/alimentação ocorreu com lactose a partir de 1 hora de cultivo com pulsos a cada duas horas. Por último, o experimento V avaliou a estratégia de alimentação/indução a pulsos múltiplos do indutor, também em biorreator. O detalhamento da instante de indução, estratégia e concentração dos indutores avaliados são mostrados na Tabela 2:

Tabela 2 – Descrição da estratégia, instantes de indução e concentração do indutor usado nos experimentos.

Experimento	Estratégia	Instante de indução (h)	Concentração do Indutor	
			IPTG (mM)	Lactose (g/L)
I	Pulso único	1	1,0	0,0
II	Pulso único	1	0,0	10,0
III	Pulso único	2	0,0	20,0
IV	Pulso único	6	0,0	20,0
V	Pulsos múltiplos	1,3,5,7	0,0	10,0

3.4.1 - Inóculo

A bactéria foi previamente armazenada em glicerol 50% a -80°C no ultrafreezer do Laboratório de Imunogenética da UFRN para posterior ativação. Neste segmento, 200 µL da solução da cepa foram adicionadas a Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultura 2xTY e antibióticos. Todo o volume transferido aos frascos foi feito de forma asséptica, e o cultivo inicial foi feito em shaker a 37°C e 200 rpm por 12 horas. Após feita a ativação, o inóculo foi preparado utilizando-se 5 ml da solução da ativação, mais 45 ml do meio 2xTY nas mesmas condições da ativação durante 6 horas.

3.4.2 - Ensaios em incubador rotativo

Os ensaios em incubador rotativo se desenvolveram nos experimentos I e II. Para isso, 5 ml do inóculo foram transferidos para Erlenmeyers de 250 ml de volume contendo 45 ml do meio 2xTY. Os meios reacionais foram deixados a 200 rpm e 37 °C por 10 horas para o experimento I, e 9 horas o experimento II. A cada hora amostras eram coletadas para posterior análise de componentes.

3.4.3 - Ensaios em biorreator

Nos cultivos em biorreator (Experimentos III, IV e V), foi utilizado o biorreator de bancada de volume útil de 1,5 L Biostat B (B. Braun Biotech International). Mantendo-se a proporção de volume de inóculo para volume do meio reacional de 10% (v/v), alíquotas foram retiradas a cada hora de cultivo, durante 10 horas para posterior análise de composição. Os ensaios foram realizados com controle automático de aeração, mantendo constante a vazão 1-1,5 vvm (volume de ar por volume de meio, por minuto); temperatura de 37 °C; agitação de 400 rpm; e pH, mantido em 7,0 utilizando-se de soluções de HCl 1N e NH₄OH 25%. Foi utilizado também o polipropileno glicol como anti-espumante quando pertinente (Lima, 2004).

3.4.4 - Indução em biorreator e incubador rotativo

Os indutores foram adicionados ao meio reacional para expressar a proteína de interesse. No primeiro grupo de ensaios (I e II), IPTG e a lactose foram adicionados ao meio no tempo de 1 hora de cultivo, pois este seria o tempo de reação para quando a fase exponencial de crescimento atingia-se a densidade ótica (DO_{600nm} entre 0,4 -0,5) (Ma *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2010). Os outros instantes de indução seriam de comparação para final avaliação da melhor estratégia.

Para a concentração final de lactose, foi utilizado uma solução mãe de concentração 200,0 g/L. Para os ensaios em incubador rotativo, foi adicionado o volume de 2,5 ml da solução mãe para obter a concentração final de 10,0 g/L no meio. No biorreator, foi utilizado

75 ml da mesma para a concentração de 10,0 g/L, e 150 ml desta para a concentração de 20,0 g/L. Toda a lactose foi esterilizada por filtração utilizando-se filtro de 22 μ m de poro.

Para o IPTG foi adicionado ao meio de 50 ml, 120 μ L de uma solução mãe de 100 mg/ml de IPTG, de forma que a concentração final deste componente no meio fosse de 1,0 mM.

3.5 - Métodos de análise

Em todos os experimentos, amostras foram retiradas a cada hora do meio reacional para avaliação de sua composição e do comportamento da mesma no decorrer do processo. As amostras assim que recolhidas foram centrifugadas a 13.400 g por 20 minutos para separar o sobrenadante das células.

Do sobrenadante foi analisado quanto a concentração de ácido acético. Das células, foi quantificada a massa seca e a proteína intracelular precedida por um procedimento de rompimento (lise) celular.

O esquema para melhor visualização das análises das amostras coletadas dos cultivos está apresentado a seguir na Figura 1:

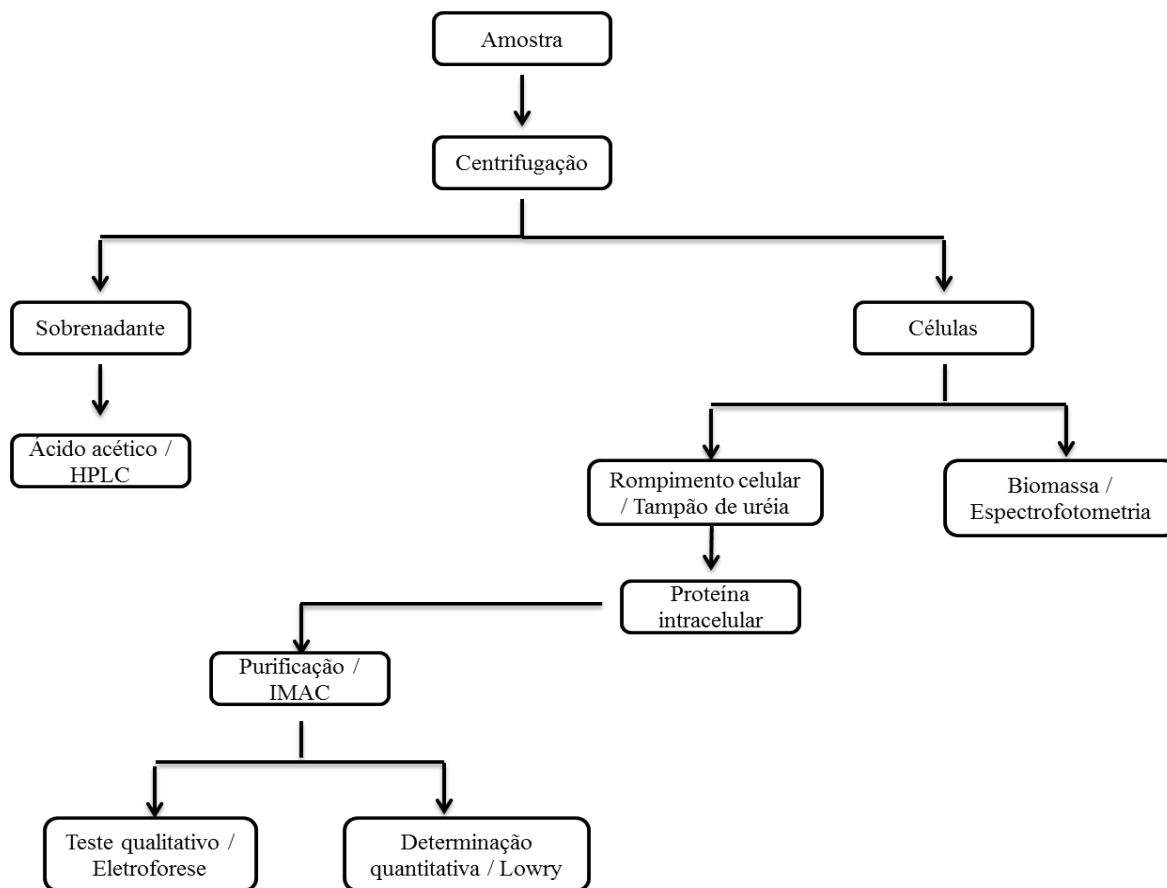


Figura 1 - Esquema das análises das amostras (Fonte: Aluno)

3.5.1 - Ácido acético

As amostras coletadas do meio foram centrifugadas a 13.400 g durante 20 minutos. O sobrenadante foi filtrado com membrana de 0,22 μm e o ácido acético foi quantificado a partir do sobrenadante por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As análises foram conduzidas utilizando a coluna Shim-Pack SCR-101H (Shimadzu Co., Japan) com detector de índice de refração – IR a uma temperatura de 65°C. A fase móvel utilizada foi uma solução de ácido sulfúrico 0,005 M sob fluxo de 0,6 mL/min (Lu *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2011). O volume de injeção na coluna foi de 20 μL . O ácido acético foi quantificado por comparação dos valores obtidos com uma curva padrão na faixa de concentração de 0,5 a 10 g/L (Lu *et al.*, 2009).

3.5.2 - Biomassa

A concentração celular foi determinada fazendo a leitura da amostra diluída em espectrofotômetro a 600 nm. A partir da amostra coletada, dilui-se a mesma e faz-se a leitura. Essa diluição é feita com o próprio meio utilizado no cultivo. O valor obtido é comparado com uma curva padrão feita a partir da massa seca segundo o procedimento descrito por Rodrigues *et al.* (2003).

3.5.3 – Rompimento celular

Para a determinação de proteínas intracelulares foi necessário fazer o rompimento da membrana bacteriana para que a proteína de interesse pudesse ficar em solução para ser quantificada. No procedimento foi utilizado um tampão de *lise* a base de uréia, cuja composição é: NaH₂PO₄ (100 mM), ureia (8 M), Tris-Cl (10 mM) a pH 8.0. A composição dos tampões pode ser verificada no anexo I. Assim, as bactérias foram armazenadas em banho de gelo durante 15 minutos. Depois disso, ressuspendeu-se em tampão de *lise*, este a base de uréia e por final homogeneizou-se por 15 a 60 minutos em vórtex a 25°C. Após essa lise foi necessário uma centrifugação para remoção dos resíduos a 13.400 g por 30 minutos. As proteínas então foram coletadas do sobrenadante para futuras análises.

3.5.4 – Proteínas de interesse - Purificação

A expressão do antígeno que contém calda de histidina fez possível a purificação do mesmo por cromatografia de afinidade por metal imobilizado (IMAC) (Qiagen, Valencia, CA) utilizando a resina Níquel Sepharose (GE HEALTHCARE).

Neste procedimento, 2 ml do sobrenadante, que contém as proteínas de interesse em solução, foi adicionado a 0,5 ml da resina 50% em volume em recipiente e homogeneizados em shaker, a 200 rpm por 30 minutos e a temperatura ambiente. O conteúdo foi então colocado na coluna vazia com a parte inferior fechada. A parte inferior é então aberta e as amostras coletadas em fluxo contínuo. Em seguida, o eluído foi lavado duas vezes com 4 mL de Tampão C - NaH₂PO₄ (100 mM), ureia (8 M), Tris-Cl (10 mM), pH 6.3. Como conseguinte, a proteína foi eluída duas vezes com 1 ml de Tampão D - NaH₂PO₄ (100 mM), ureia (8 M), Tris-Cl (10 mM), pH 4.5 - e as soluções eluídas coletadas para posterior análise de concentração como descrito no item 3.7.5.1.

3.5.4.1 – Teste quantitativo

A proteína eluída foi quantificada pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Para isto, se fez necessário a comparação com uma curva padrão que por sua vez foi feito utilizando a albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich) na concentração de 20 a 420 g/L visualizada no anexo I.

3.5.4.2 – Teste qualitativo

O teste para confirmação da proteína de interesse foi feito pelo método da eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) conforme descrito por Laemmli (1970).

As amostras contendo as proteínas a serem identificadas (antígeno 503) antes de serem aplicadas no gel concentrador foram previamente diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M (pH=6,8), glicerol 10%, SDS 0,4%, 2-mercaptoetanol 2 mmol/L e azul de bromofenol 0,02%). As alíquotas misturadas a esse tampão foram desnaturadas por meio térmico em banho Maria, a 90° C durante 5 minutos. Os compostos desnaturantes (SDS) e redutores (β -mercaptoetanol) quebram as ligações intermoleculares (dissulfeto) da proteína. Com essa quebra das ligações todos os complexos possuem densidade de cargas idênticas e migram em géis de malha poliacrilamida com porosidade adequada somente em função da massa molecular.

Dessa forma, como todas possuem cargas idênticas, todas serão atraídas ao polo positivo com a mesma intensidade, percorrendo a malha com mais facilidade aquela com menor peso molecular (Silva Júnior, 2001).

O gel de separação com concentração de 15% foi preparado utilizando: 5 mL de solução estoque de acrilamida (29,2% de acrilamida e 0,8% de bis-acrilamida), 2,5 mL de Tris-HCl 1,5 mol/L (pH= 8,8), 100 μ L de SDS 10%, 100 μ L persulfato de amônio 10%, 4 μ L de Temed e H₂O destilada para um volume final de 10 mL. O gel de concentração, continha 830 μ L de acrilamida, 630 μ L de Tris-HCl (0,5 M) e pH 6,8, 50 μ L de SDS 10%, 50 μ L de Persulfato de amônio 10%, 5 μ L de Temed e água destilada para um volume final de 5 mL. Após polimerização dos géis, e aplicação das amostras, os géis foram submetidos a voltagens de 150 V durante 3 horas, utilizando tampão de corrida - Tris (25 mM), Glicina (192 mM) e SDS 0,1%, pH 8,3). No fim da corrida, quando o menor dos compostos

adicionados da amostra chega ao final do gel, este foi revelado pelo método colorimétrico da revelação por nitrato de prata (Blum *et al.*, 1987).

4 – Resultados e discussão

4.1 – Ensaio para avaliação da qualidade do indutor

No primeiro conjunto de experimentos (I e II) foi feita a comparação entre os efeitos que diferentes indutores (IPTG e lactose) poderiam causar na expressão do antígeno 503. Naturalmente na presença de lactose, a *E. coli* produz enzimas que clivam a mesma, transformando-a em glicose e galactose para estas serem utilizadas pela bactéria como fonte de carbono. Além disso, a lactose é um componente indutor para a expressão da proteína de interesse. Pela transformação da *E. coli* utilizada, o plasmídeo inserido dá suporte para que o indutor ative o operon lac e desencadeie a transcrição da proteína de interesse.

O IPTG é um composto que assim como a lactose desencadeia esse processo de transcrição do operon lac, e dessa forma expressa o antígeno. Esta é uma substância muito utilizada em bioprocessos como indutor, porém é um componente caro e tóxico para a célula. Em detrimento disto resolveu-se comparar os efeitos do mesmo como os da lactose para a otimização da produção da proteína de interesse.

Os resultados dos experimentos I e II com seus parâmetros cinéticos de biomassa, proteína de interesse, produtividade em células (Px), velocidade específica de crescimento (μ_x), produção específica da proteína (Pp/x) e ácido acético seguem nas Tabelas 3 e 4, respectivamente:

Tabela 3 - Parâmetros cinéticos do cultivo em incubador rotativo induzido por IPTG 1 mM (Experimento I)

Ponto	tempo (h)	Biomassa (g/L)	Proteína (g/L)	Px (g/L.h)	μ_x (1/h)	Pp/x (g/g)	Ác. Acético (g/L)
0	0	1,033	0	0	0,040	0,000	0,221
1	1 (Indução)	1,074	0,030	1,074	0,130	0,028	0,283
2	2	1,317	0,042	0,659	0,183	0,032	0,385
3	3	1,557	0,061	0,519	0,021	0,039	0,437
4	4	1,749	0,073	0,437	0,077	0,042	0,470
5	5	1,802	0,077	0,361	0,062	0,043	0,468
6	6	1,823	0,083	0,304	0,011	0,046	0,463
7	7	2,092	0,064	0,299	-0,002	0,031	0,319
8	8	2,092	0,063	0,262	-0,033	0,030	0,310
9	9	2,139	0,062	0,238	0,081	0,029	0,300
10	10	2,085	0,063	0,209	-0,046	0,030	0,310

Tabela 4 - Parâmetros cinéticos do cultivo em incubador rotativo induzido por Lactose 10 g/L
(Experimento II)

Ponto	tempo (h)	Biomassa (g/L)	Proteína (g/L)	Px (g/L.h)	μ_x (1/h)	Pp/x (g/g)	Ác. Acético (g/L)
0	0	1,233	0	0,000	0,011	0,000	0,090
1	1 (Indução)	1,247	0,049	1,248	0,235	0,040	0,466
2	2	1,964	0,060	0,982	0,268	0,031	0,574
3	3	2,347	0,092	0,783	0,096	0,039	0,533
4	4	2,744	0,124	0,686	-0,017	0,045	0,525
5	5	3,114	0,140	0,623	-0,056	0,045	0,349
6	6	3,353	0,140	0,559	-0,002	0,042	0,329
7	7	2,976	0,139	0,425	-0,113	0,047	0,346
8	8	2,993	0,132	0,374	-0,178	0,044	0,322
9	9	2,963	0,133	0,329	0,080	0,045	0,321

Em negrito tem-se o maior valor de cada parâmetro, para melhor comparação. Nota-se que em todos eles, o experimento II possui valores mais elevados. Os gráficos com os comportamentos dos parâmetros de ambos os experimentos seguem a seguir nas figuras 2 a 7:

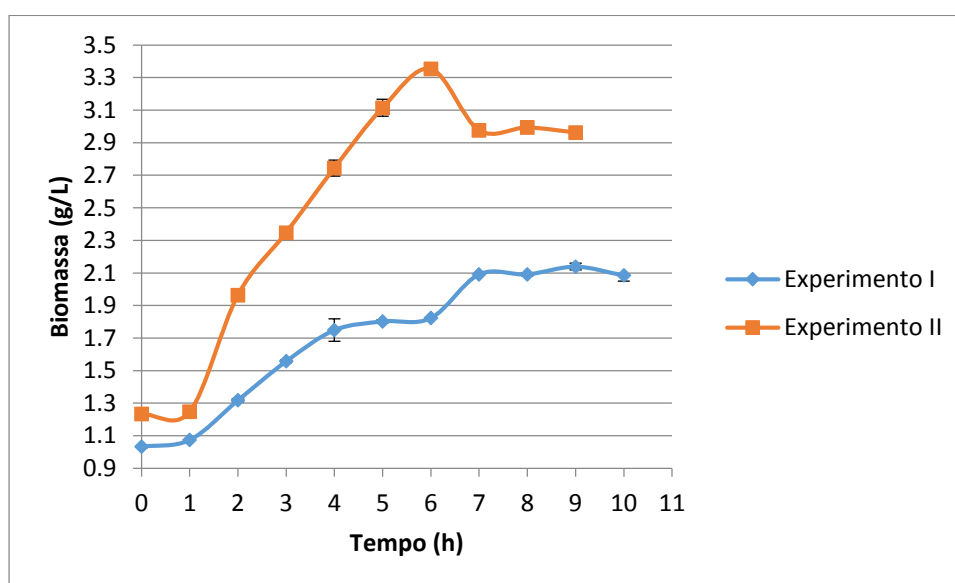


Figura 2 – Comportamento da biomassa dos experimentos I e II

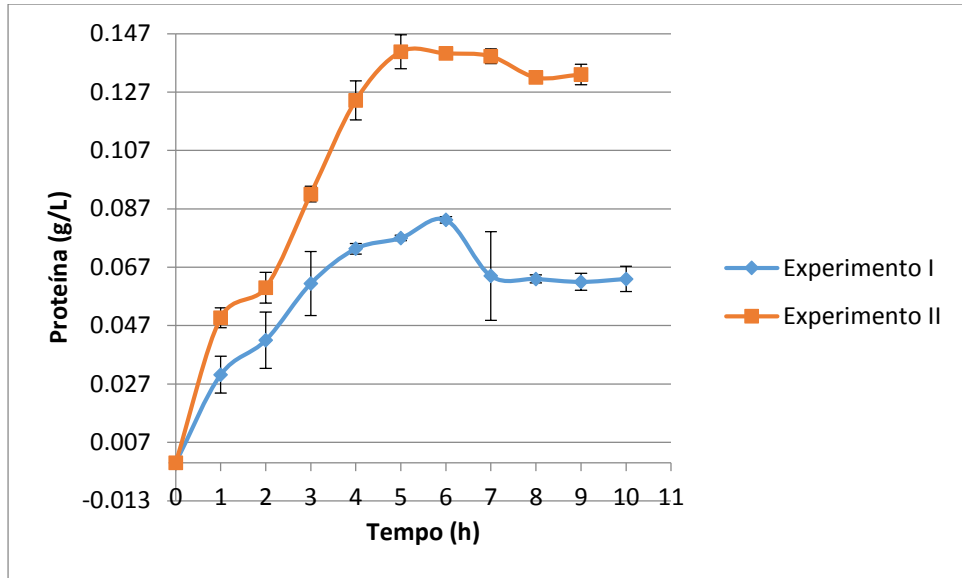


Figura 3 - Comportamento da proteína dos experimentos I e II

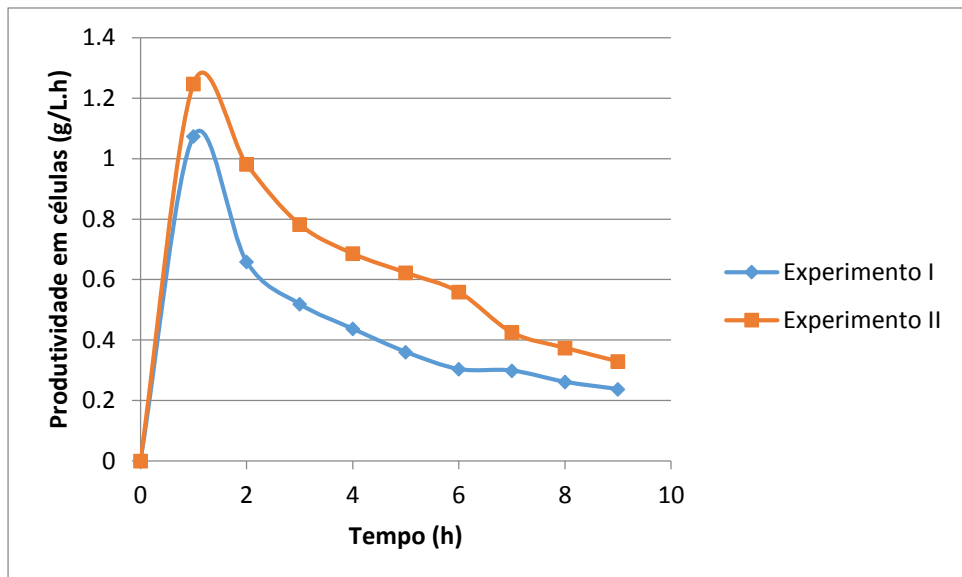


Figura 4 - Comportamento da produtividade em células dos experimentos I e II

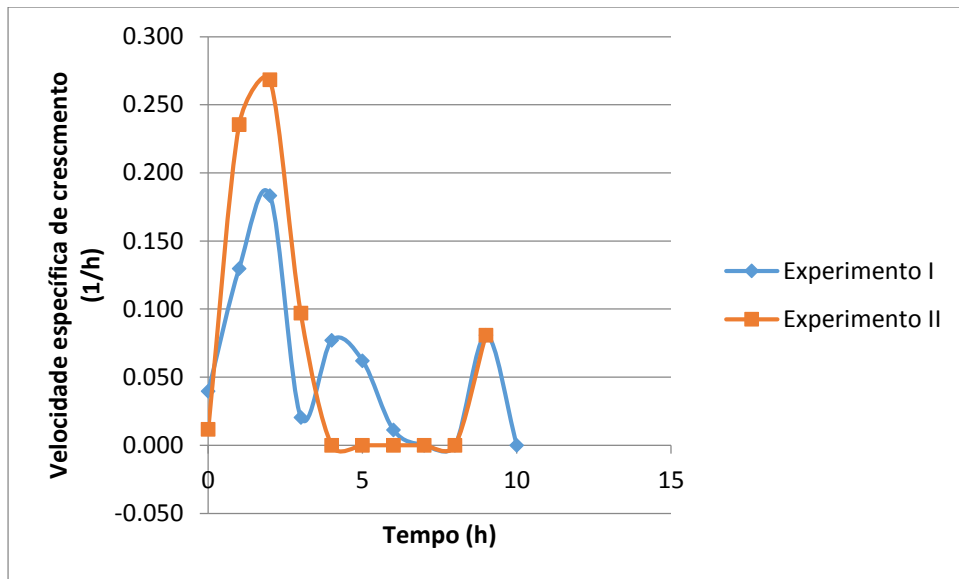


Figura 5 - Comportamento da velocidade específica de crescimento dos experimentos I e II

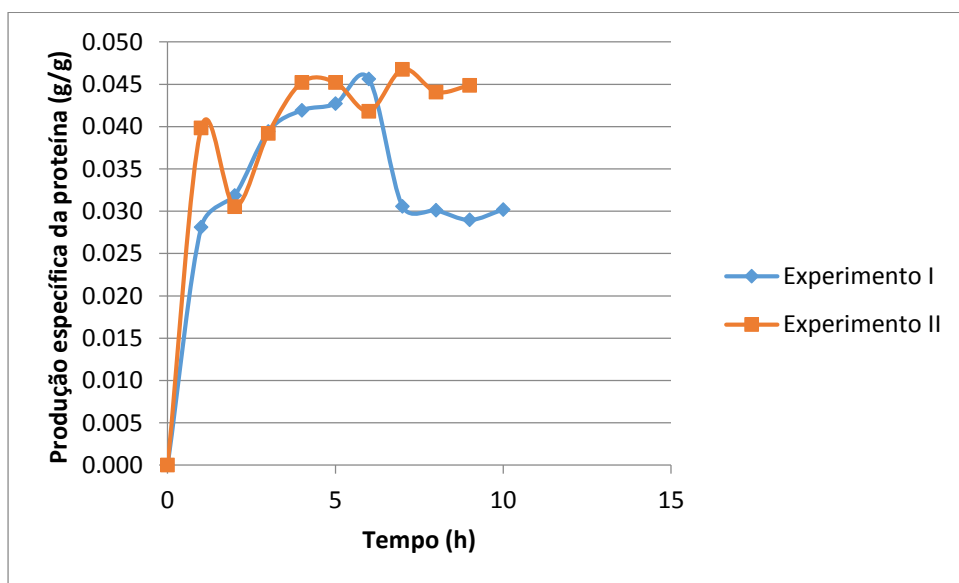


Figura 6 - Comportamento da produção específica da proteína nos experimentos I e II

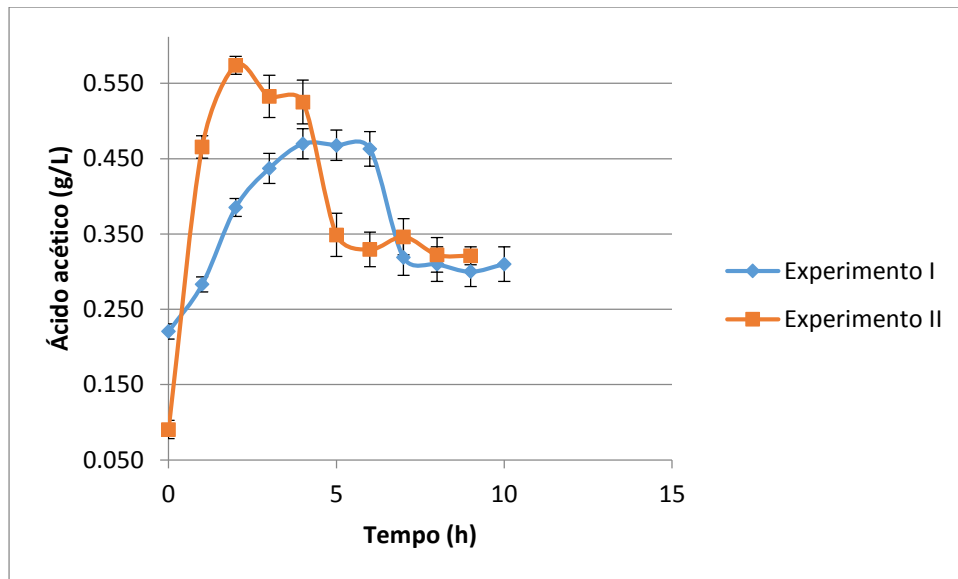


Figura 7 - Comportamento do ácido acético nos experimentos I e II

Comparando a biomassa, a proteína e a produtividade em células (Px), nota-se que ao longo de todo o cultivo o experimento II obteve valores mais altos que o experimento I, mesmo com o velocidade específica de crescimento (μ_x), Produção específica da proteína (pp/x) e ácido acético obtendo flutuações entre os mesmos.

Nota-se também que os maiores valores de biomassa e de proteína obtidas no experimento II coincidem entre si no tempo de cultivo (entre 5 e 6 h). Após o pico de biomassa, esta obteve uma leve diminuição e uma posterior tendência à constância até o final do cultivo. Já a proteína de interesse (antígeno 503), após o pico obtido entre 5 e 6 h, mostrou uma tendência a valores constantes até o final do cultivo.

O comportamento da produtividade em ambos os ensaios foram muito parecidos, somente diferenciando entre seus valores absolutos. O pico do mesmo aconteceu no tempo de indução nos dois ensaios, e deste até o final do cultivo sua tendência foi decair. Este comportamento pode ter acontecido vez que as células tinham seus metabolismos focados em crescer e se multiplicar, e quando foi adicionado o indutor, parte deste metabolismo é desviado para a produção do antígeno.

O experimento II obteve (em relação aos valores máximos) um incremento de 57% na produção de biomassa, 69% na expressão de proteína, 16% na Px, 46% na μ_x , 2% na Pp/x, quando comparado ao experimento I. De acordo com a Figura 2, tais resultados podem estar ligados ao fato do IPTG ser muito mais tóxico para as células que a lactose, além desta última servir como substrato para o microrganismo. Além disso, os níveis de inibidor (ácido acético) foram maiores quando utilizado a lactose nos tempos de 1 até 4h de cultivo. Isso pode ter

acontecido, pois a velocidade específica de crescimento em no ensaio II também obteve níveis maiores no mesmo tempo de cultivo, assim, o crescimento acelerado resultou em altos níveis de subproduto inibidor. Entretanto, apesar disso, nestes mesmos tempos de cultivo, os valores de biomassa não descaíram em nenhum dos dois experimentos. Isso pode significar que estes níveis de ácido acético não foram suficientes para inibir o crescimento bacteriano.

4.2 – Ensaio para avaliação da concentração do indutor e tempo de indução

Para este conjunto de ensaios, os experimentos III e IV visaram comparar entre si, o melhor instante de indução a pulso único, e comparar com o experimento II a influência da concentração do indutor na produtividade do antígeno 503. Uma vez que o antígeno é produzido no interior das células bacterianas, faz sentido ter maior biomassa bacteriana para no momento da indução, no intuito de aumentar a produtividade. No entanto, a proteína pode ser produzida de uma só vez utilizando rapidamente dos nutrientes do meio com muitas células, ou ela pode ser expressa de forma mais suave ao longo de todo o cultivo. Assim, nestes experimentos, foi utilizada somente a lactose como molécula de expressão da proteína heteróloga, a qual foi escolhida dentre os ensaios do item 4.1, para a análise do balanço entre uma forte e fraca indução, e qual o melhor momento para tal.

Os parâmetros cinéticos obtidos dos experimentos III e IV seguem a seguir nas tabelas 5 e 6, e em **negrito**, seus maiores valores atingidos. Os gráficos seguintes (Figuras 8 a 13) comparam os experimentos II, III e IV, nestes parâmetros apresentados abaixo, uma vez que os critérios de avaliação da influência da concentração e tempos de indução buscam o mesmo objetivo:

Tabela 5- Parâmetros cinéticos do cultivo em biorreator induzido por Lactose 20 g/L após 2h
(Experimento III)

Ponto	Tempo (h)	Biomassa (g/L)	Proteína (g/L)	Px (g/L.h)	μ_x (1/h)	Pp/x (g/g)	Ác. Acético (g/L)
0	0	2,045	0	0,000	0,028	0,000	0
1	1	2,103	0	2,103	0,093	0,000	0
2	2 (Indução)	2,454	0,002	1,227	0,143	0,001	0,0028
3	3	2,804	0,116	0,935	0,082	0,042	0,0035
4	4	3,576	0,065	0,894	0,000	0,018	0,0032
5	5	4,517	0,052	0,903	0,004	0,012	0,0034
6	6	4,581	0,056	0,763	0,013	0,012	0,0269
7	7	4,403	0,040	0,629	0,005	0,009	0,0206
8	8	4,623	0,029	0,578	0,000	0,006	0,0166
9	9	4,530	0,029	0,503	0,042	0,006	0,0034
10	10	4,673	0,039	0,467	0,000	0,009	0,0140

Tabela 6 - Parâmetros cinéticos do cultivo em biorreator induzido por Lactose 20 g/L após 6h
(Experimento IV)

Ponto	Tempo (h)	Biomassa (g/L)	Proteína (g/L)	Px (g/L.h)	μ_x (1/h)	Pp/x (g/g)	Ác. Acético (g/L)
0	0	1,908	0	0,000	0,062	0,000	0,0031
1	1	2,026	0	2,026	0,163	0,000	0,0184
2	2	2,648	0	1,324	0,146	0,000	0,0087
3	3	2,859	0	0,953	0,059	0,000	0,0068
4	4	3,585	0	0,896	0,031	0,000	0,0068
5	5	4,045	0	0,809	0,043	0,000	0,0119
6	6 (Indução)	4,104	0,0024213	0,684	0,033	0,001	0,0306
7	7	4,298	0,02981208	0,614	0,047	0,007	0,0214
8	8	4,475	0,02516686	0,559	0,000	0,006	0,0045
9	9	4,593	0,0296519	0,510	0,072	0,006	0,0051
10	10	4,914	0,04118486	0,491	0,000	0,008	0,0250

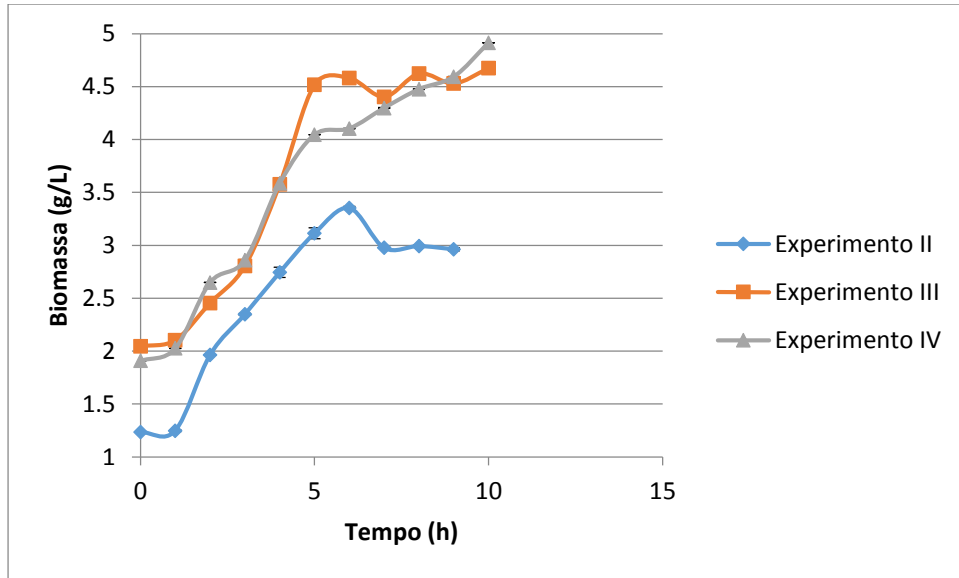


Figura 8 - Comportamento da biomassa nos experimentos II, III e IV

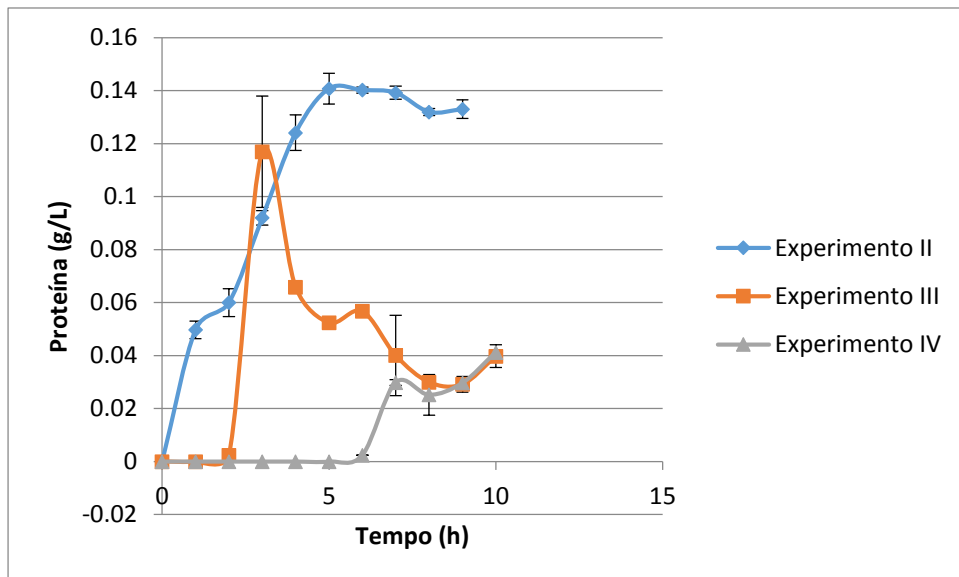


Figura 9 - Comportamento da proteína nos experimentos II, III e IV

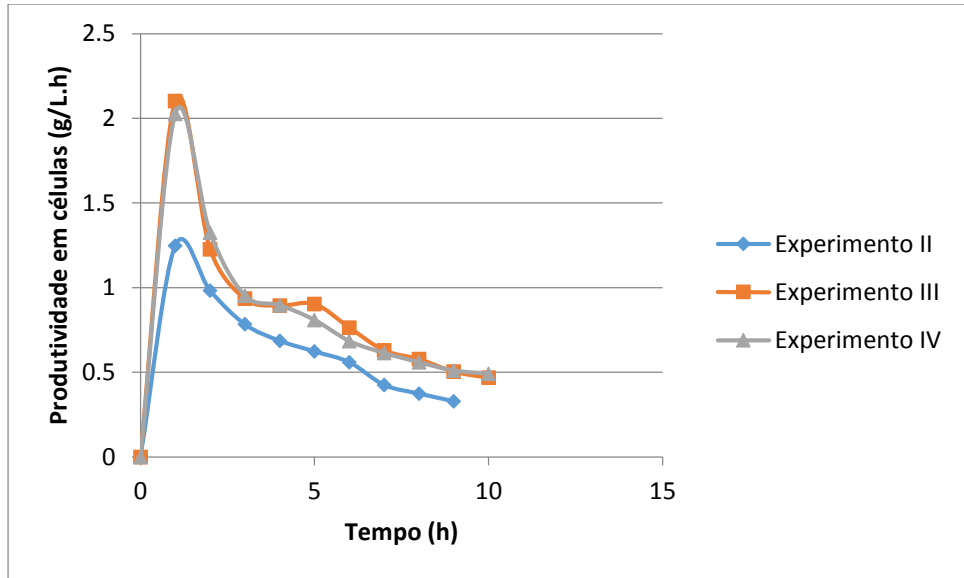


Figura 10 - Comportamento da produtividade em células nos experimentos II, III e IV

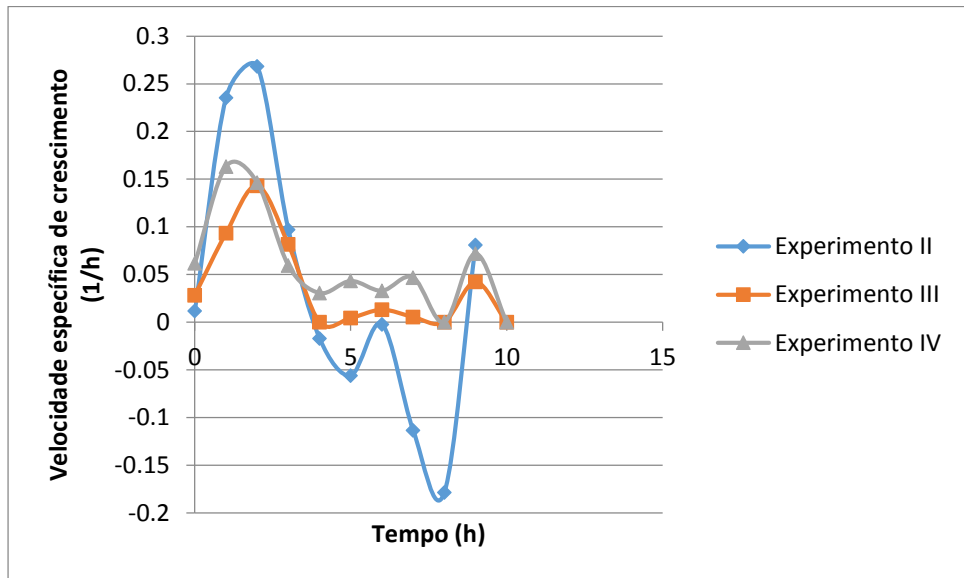


Figura 11 - Comportamento da velocidade específica de crescimento nos experimentos II, III e IV

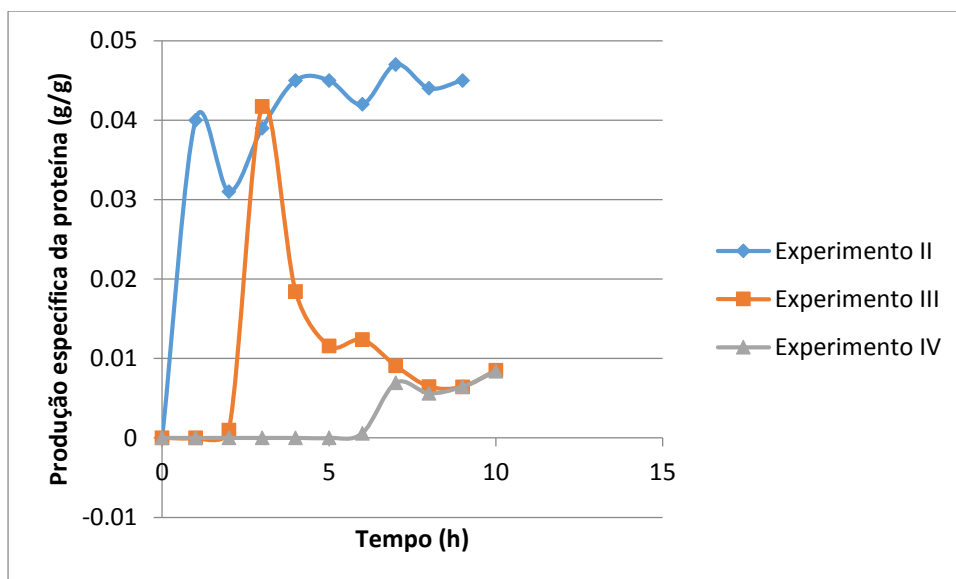


Figura 12 - Comportamento da produção específica da proteína nos experimentos II, III e IV

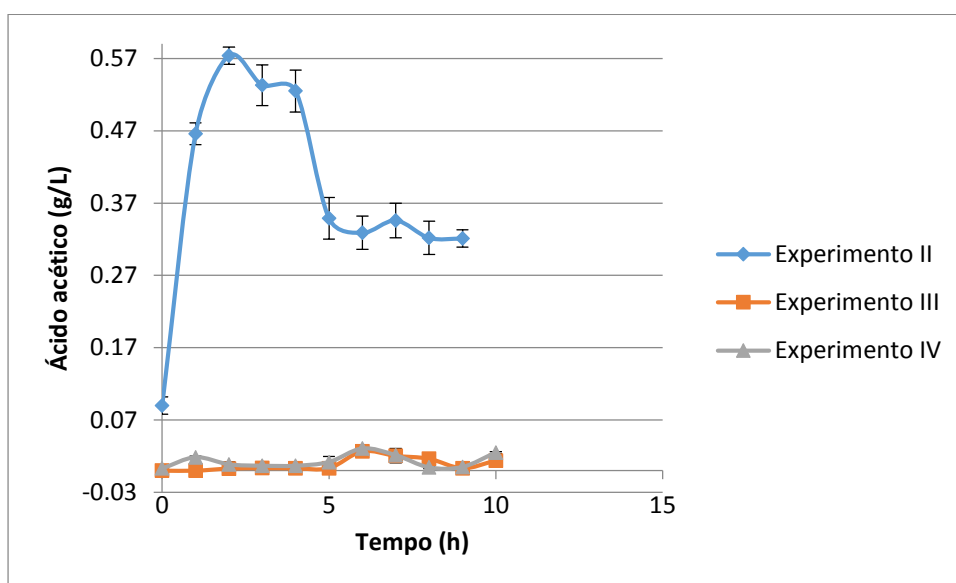


Figura 13 - Comportamento do ácido acético nos experimentos II, III e IV

A biomassa e a produtividade em células tiveram comportamentos análogos no que se referem à comparação entre seus níveis nos ensaios II, III e IV. Os experimentos III e IV obtiveram perfis muito semelhantes e quase sobrepostos, alcançando níveis acima do experimento II durante todo o cultivo. Ao passo que estes obtiveram níveis de ácido acético menores que o do ensaio II e de basicamente mesmos valores. Isso pode ter ocorrido pelo fato da concentração de ácido acético mais alta em II, ter inibido mais a multiplicação das

bactérias que em III e IV. Os três experimentos possuem perfis semelhantes na biomassa, tendendo a crescer durante o cultivo, e com pico de Px em torno de 1 h do processo.

Os comportamentos dos 3 experimentos comparando a proteína e a produção específica da proteína foram muito semelhantes. No ensaio II a proteína atinge seu pico em 5 h de cultivo com um perfil crescente desde o início. Deste ponto em diante os níveis de proteína tenderam a decair levemente, porém apresentando os maiores valores a partir de 4 h até o final do processo. Em III, o nível de proteína atinge seu pico máximo por volta de 3 h de cultivo, 1 h depois da indução concentrada, entretanto, este ainda possui uma concentração menor que o experimento II, e depois do pico no 3 os níveis caem consideravelmente. No ensaio IV, a proteína tem seu pico em 7 h de cultivo, também com 1 h após a indução, contudo, este atinge valores muito inferiores aos ensaios de comparação, e tende a crescer levemente até o final do processo.

A Ppx possui o mesmo comportamento apresentado anteriormente para os ensaios III e IV. O experimento II difere quando em 1 h de cultivo este obtém um pico (não o maior), sofre uma queda em 2 h e os níveis voltam a subir com valores flutuando porém maiores que o primeiro pico. Em valores absolutos, o experimento II alcançou maiores resultados de Ppx em menos tempo e por mais tempo que os ensaios III e IV, entretanto entre estes últimos o de número III obtém valores mais altos para Ppx e proteína durante o cultivo, possivelmente pela indução tardia em IV que não favorece a produção da proteína heteróloga, uma vez que ambos obtiveram níveis de biomassa, μ_x , Px e ácido acético de diferenças desprezíveis.

A velocidade específica de crescimento também possui comportamentos análogos nos experimentos II, III e IV, obtendo picos entre 1 e 2 h de cultivo e decair atingindo valores muito baixos em relação aos picos.

4.2 – Ensaio para avaliação de pulsos múltiplos

Os experimentos anteriores mostraram a influência do tipo indutor, concentração do indutor e tempo de indução, todos a um único pulso. O ensaio V analisou como múltiplos pulsos do indutor poderiam afetar na produção da proteína de interesse.

A lactose além de ser escolhida como melhor indutora que o IPTG é também fonte de carboidrato, e portando energia, para o desenvolvimento e multiplicação da *E. coli* recombinante. Como substrato está sendo adicionado ao meio, este ensaio avalia também a

influência da estratégia da batelada alimentada, uma vez que os pulsos de lactose serviram tanto como substrato ao longo do cultivo, quanto para a expressão do antígeno.

A tabela 7 a seguir mostra os parâmetros cinéticos obtidos com esse tipo de cultivo e indução, e em negrito seus maiores valores. Os gráficos das figuras 14 a 19 mostram os perfis desses parâmetros comparando-os com os do experimento II (pulso único de lactose a baixa concentração), o qual foi escolhido por obter os maiores níveis de produção da proteína dentre os ensaios anteriores.

Tabela 7 - Parâmetros cinéticos do cultivo em biorreator induzido por pulsos de Lactose 10 g/L nos instantes 1, 3,5 e 7h (Experimento V)

Ponto	tempo (h)	Biomassa (g/L)	Proteína (g/L)	Px (g/L.h)	μ_x (1/h)	Pp/x (g/g)	Ác. Acético (g/L)
0	0	2,517	0,000	0,000	0,332	0,000	0,117
1	1 (Indução)	3,354	0,999	3,354	0,329	0,298	0,260
2	2	8,021	0,106	4,011	0,356	0,013	0,356
3	3 (Indução)	10,35	0,122	3,453	0,026	0,012	0,197
4	4	10,50	0,122	2,626	0,012	0,012	0,083
5	5 (Indução)	10,79	0,121	2,158	0,000	0,011	0,056
6	6	11,07	0,112	1,846	0,000	0,010	0,054
7	7 (Indução)	11,07	0,112	1,582	0,000	0,010	0,054

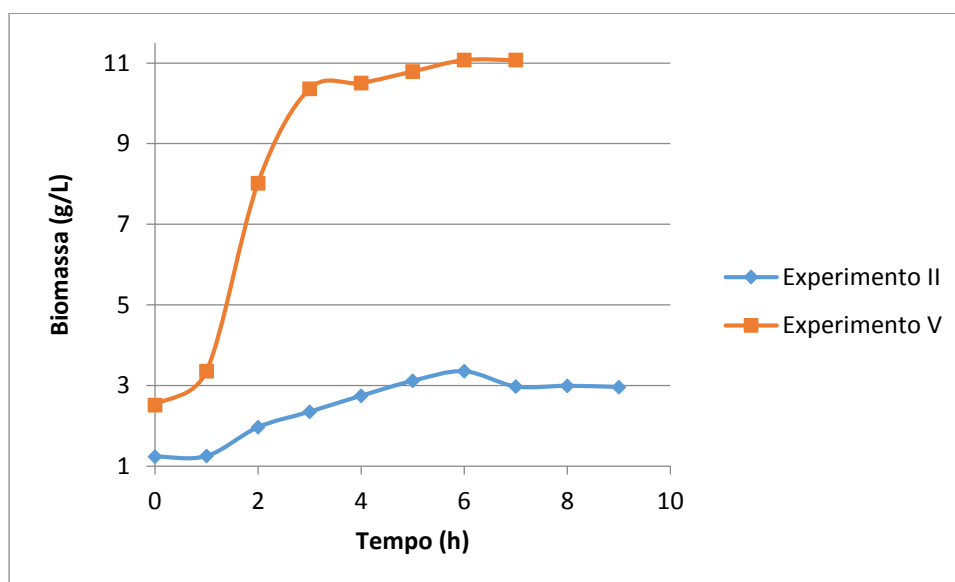


Figura 14 - Comportamento da biomassa nos experimentos II e V

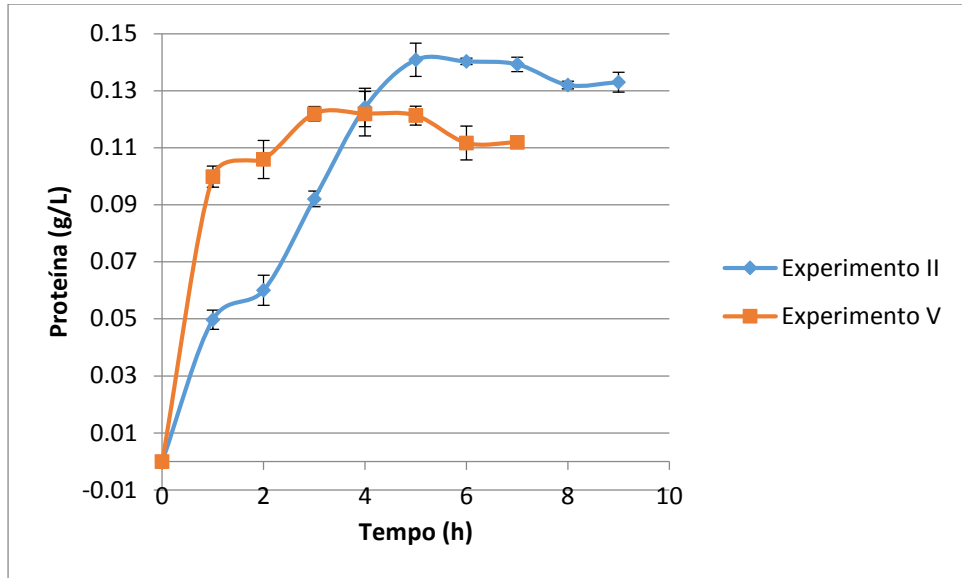


Figura 15 - Comportamento da proteína nos experimentos II e V

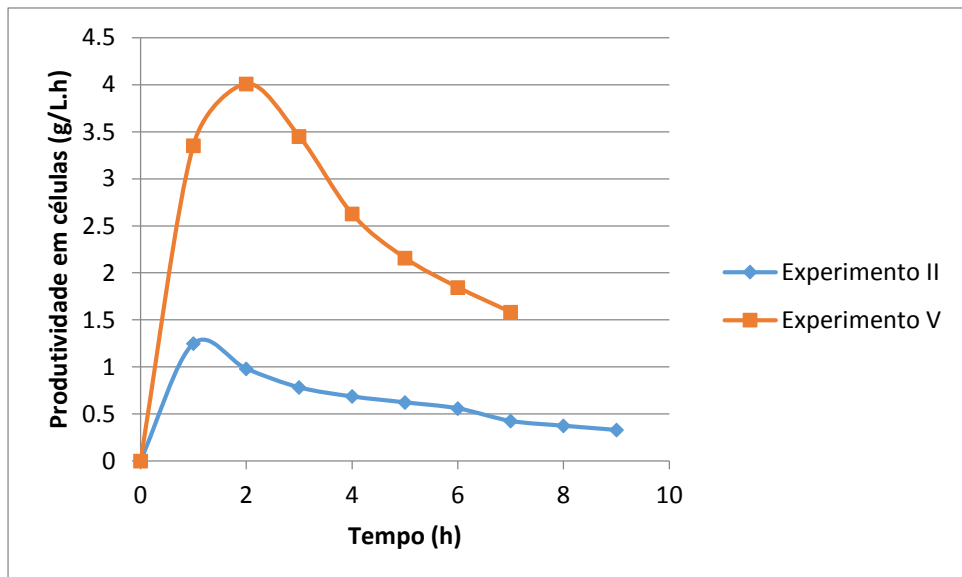


Figura 16 - Comportamento da produtividade em células nos experimentos II e V

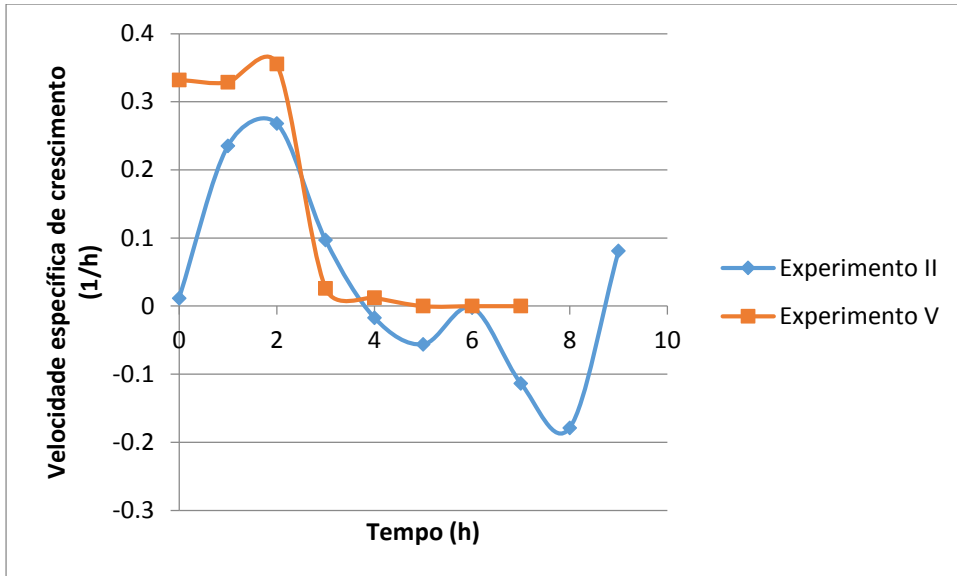


Figura 17 - Comportamento da velocidade específica de crescimento nos experimentos II e V

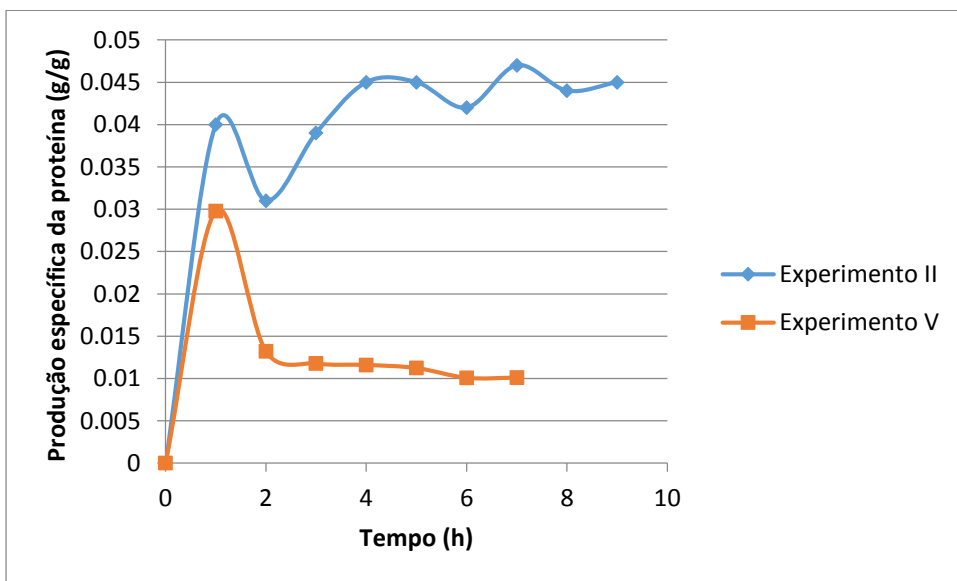


Figura 18 - Comportamento da produção específica da proteína nos experimentos II e V

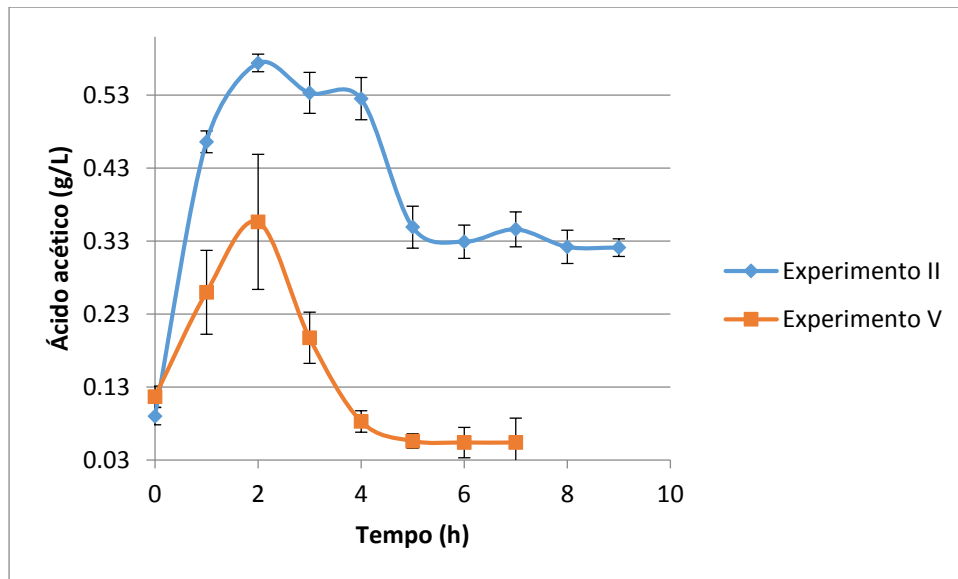


Figura 19 - Comportamento do ácido acético nos experimentos II e V

Como visto no item 4.2, os níveis de ácido acético do experimento II foram muito maiores que os do experimentos III e IV (2033 e 1751% a mais nos picos), porém os valores de biomassa dos mesmos não foram muito maiores que o do experimento II (56 e 64% a mais nos picos) o que pode significar que os níveis do inibidor em II não atingiram valores significativos de inibição. Neste segmento, o experimento II obteve 61% de inibidor a mais que o V, ao passo de que o ensaio V obteve 269% a mais de biomassa. Se os níveis de ácido acético não foram imperativos na determinação da biomassa, essa diferença brusca entre os experimentos deve-se ao fato de que a estratégia de cultivo em V foi de batelada alimentada, e essa alimentação a pulsos (de lactose) proporcionaram uma melhor oferta de nutrientes para as bactérias, de forma que estas tiveram condições mais favoráveis para se multiplicar.

Os níveis de biomassa durante todo o cultivo foram superiores em V quando comparado a II, assim como sua produtividade. O fim do comportamento exponencial da figura 14 em V, e que se inicia a tendência a constância nos valores da biomassa coincidem com o ponto de queda da sua velocidade específica de crescimento, no qual se mantêm maiores até as 2 h de cultivo.

No que se refere as proteínas, seus perfis foram semelhantes com valores não muito distantes entre si. O ensaio V obteve níveis mais altos da proteína mais rapidamente, permanecendo com estes durante as primeiras 4 h de cultivo, na qual a partir desde momento o experimento II conseguiu ultrapassar e obter valores maiores (15% a mais nos picos) até o final do cultivo.

Os valores próximos de proteína e discrepantes de biomassa justificam os perfis da produção específica da proteína dos ensaios, as quais a experimento II obteve níveis mais altos durante todo o cultivo. Uma vez que a concentração de proteína houve oscilação entre os experimentos, o comportamento mais otimizado da relação entre a proteína de interesse e massa celular em II mostrou que este foi mais direto e direcionou seus recursos para a expressão do antígeno, enquanto que o ensaio V produziu muito mais células que a proteína de interesse, por isso seus valores mais baixos na produtividade específica. Isso pode ter acontecido no experimento V (pulsos múltiplos), pelo fato da lactose além de expressar a proteína, também servir como fonte de alimento, dessa forma, na batelada alimentada, as bactérias podem ter desviado seu metabolismo e focado em se multiplicar pela grande oferta de nutrientes deste experimento, ao invés de focalizar em expressar o antígeno.

4.3 – Avaliação qualitativa da expressão do antígeno 503 por eletroforese em gel de poliacrilamida

A expressão do antígeno 503 foi determinada qualitativamente, através da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Pode-se observar na Figura 20, o gel obtido no ensaio induzido por lactose 10 g/L (Experimento II), observando-se a expressão do antígeno 503 como uma banda predominante (Linhas 4-8), de massa molecular de aproximadamente 56 kDa, de acordo com a literatura. Para todas as eletroforeses desse estudo padronizou-se uma concentração de amostra de 50 µg/µL para aplicação no gel, permitindo-se relacionar a intensidade das bandas obtidas com a concentração de proteína no meio. Percebe-se que os níveis de expressão obtidos nas linhas 5 e 6 foram mais altos, uma vez que apresentaram bandas de maior intensidade. Nesses instantes, a concentração da proteína intracelular foi quantificada pelo método de Lowry com concentração de 0,1408 g/L e 0,1405 g/L, respectivamente, confirmando a expressão da proteína de interesse.

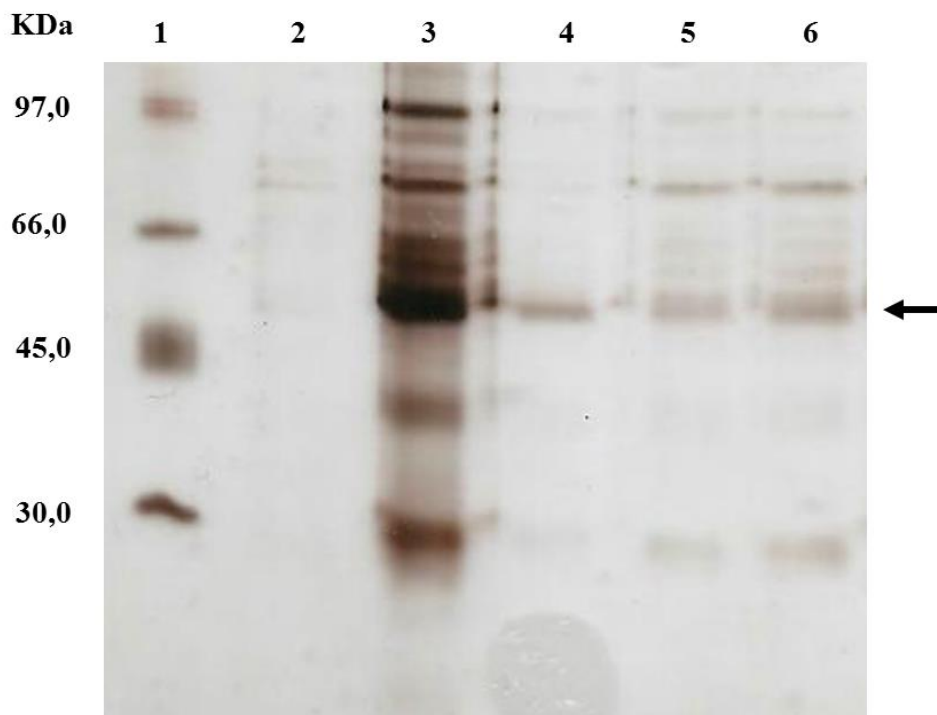


Figura 20 – Avaliação qualitativa da expressão do antígeno 503 induzido por Lactose no meio 2xTY (Ensaio II). Linha (1): Marcador de peso molecular; Linha (2): amostras do instante 1h (não induzido); Linha (3): lisado celular não purificado (extrato bruto); Linhas (4-6): amostras dos instantes 4h, 5h e 6h de cultivo, respectivamente; Seta representando a faixa de massa molecular de 56 kDa.

5 - Conclusões

No primeiro par de ensaios (I e II), que avaliaram qual o melhor indutor (IPTG ou lactose) para a expressão da proteína heteróloga, foi visto que lactose mostrou melhores resultados, uma vez que atingiu níveis de expressão da proteína superiores durante todo o cultivo mesmo com níveis de inibidor mais elevados. Os baixos índices do I em relação ao ensaio II deve-se possivelmente a conhecida toxicidade do IPTG.

Comparando o instante de indução (III e IV) e a concentração do indutor (II e III), notou-se que a indução tardia após 6 h de cultivo (ensaio IV) obteve níveis inferiores de proteína quando comparada a indução mais próxima ao início do cultivo (ensaio III, indução com DO_{600} entre 0,5 e 0,6). Analisando então o experimento II (lactose 10 g/L) com o III (lactose 20 g/L), percebe-se que mesmo com níveis mais altos de ácido acético, o ensaio II alcançou concentrações da proteína de interesse mais elevados que o ensaio III, possivelmente devido a oferta de nutrientes que desfocou a expressão do antígeno em III, tornando II com melhores resultados.

Avaliando os experimentos em pulso único (II) e pulsos múltiplos (V), foi visto que o de batelada alimentada colheu concentrações de biomassa muito superiores ao ensaio II, possivelmente pelo desvio do metabolismo das bactérias, da expressão do antígeno, para a sua multiplicação e desenvolvimento, devido a grande oferta de nutrientes. Não obstante, o experimento II, mesmo com níveis mais altos de inibidor, rendeu níveis mais altos de proteína provando-se a melhor estratégia dentre as estudadas com o objetivo da otimização da expressão da proteína heteróloga.

6 – Referências bibliográficas

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Recombinant organisms for production of industrial products. *Bioeng. Bugs* 1, 116–131, 2010.

AHAMED, A.; VERMETTE, P. Effect of mechanical agitation on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* RUT-C30 in a draft-tube airlift bioreactor. *Biochem Eng J*, v. 49, p. 379-387, 2010.

ALFASI, S.; SEVASTSYANOVICH, Y.; ZAFFARONI, L.; et al. Use of GFP fusions for the isolation of *Escherichia coli* strains for improved production of different target recombinant proteins. *Biotechnol J*, v. 156, p. 11-21, 2011.

BARRY A.M.; PATON J.C. Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infect Immun*, v. 1, p. 133–140, 2000.

BENTLEY, W. E.; MIRJALILI, N.; ANDERSEN, D. C.; DAVIS, R. H.; KOMPALA, D. S. Plasmid-encoded protein: the principal factor in the “metabolic burden” associated with recombinant bacteria. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 35, p. 668–681, 1990.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Revelação por prata. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, v.8, p.93-99, 1987.

BORZANI, W.; et al. *Biotecnologia industrial-fundamentos*. São Paulo: Edgard Blucher, v. 1, 2001.

BRAZ, R. F. S. E. T.; NASCIMENTO, D. R. A.; MARTINS, M. E.; WILSON, R. D.; PEARSON, S. G.; et al. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, v. 67, p. 344–348, 2002.

CARVALHO, R.J.; CABRERA-CRESPO, J.; TANIZAKI, M.M.; GONÇALVES, V.M. Development of production and purification processes of recombinant fragment of pneumococcal surface protein A in *Escherichia coli* using different carbon sources and chromatography sequences. *Appl Microbiol Biotechnol.* v. 94, n. 3, p. 683-694, 2012.

CASEY, E.; SEDLAK, M.; NANCY, W. Y.; MOSIER, N. S. Effect of acetic acid and pH on the cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* v.10, p.385–393, 2010.

CHOI, J. H.; KEUM, K. C.; AND LEE, S. Y. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chem. Eng. Sci.* v. 61, p. 9, 2006.

COMBETTES-SOUVERAIN, M.; ISSAD, T. Molecular basis of insulin action. *Diabet Metab.* v. 24, p. 477–489, 1998.

COSTA, M. M.; ANDRADE, H. M.; BARTHOLOMEU, D. C.; et al. Analysis of *Leishmania i. chagasi* by 2-D Difference Gel Electrophoresis (2-D DIGE) and Immunoproteomic: Identification of Novel Candidate Antigens for Diagnostic Tests and Vaccine, *J. Proteome Res.* v.10, n.5, p. 2172–2184, 2011.

CSERJAN-PUSCHMANN, M.; GRABHERR, R.; STRIEDNER, G.; CLEMENTSCHITSCH, F.; BAYER, K. Optimizing Recombinant Microbial Fermentation Processes: an integrated approach. *Biopharm.* p. 26-34, 2002.

DAVIES, C. R., P. M.; KAYE, S. L.; et al. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *BMJ.* v. 326, p. 377–382, 2003.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol. Adv.*, v. 27, p. 297–306, 2009.

DONOVAN, R. S.; ROBINSON, C. W.; GLICK, B. R. Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *J Ind Microbiol.* v.16, n.3, p.145-154, 1996.

DRUMOND, K. O.; COSTA, F. A. Forty years of visceral leishmaniasis in the State of Piauí: a review. *Rev Inst Med Trop*, v. 53, n. 1, p. 3-11, 2011.

ENFORS, S.O.; KOHLER, K.; STRANDBERG, L. Large scale fermentation and purification of a recombinant protein from *Escherichia coli*. *Proc. Biochem.*, p. 225-234, 1991

ETTINGER, N. A.; DUGGAL, P.; BRAZ, R. F.; et al. Genetic admixture in Brazilians exposed to infection with *Leishmania i. chagasi*. *Ann. Hum.Genet*, v. 73, p.304-313, 2009.

FORTIER, A. H. M. V.; SLAYTER, R.; ZIEMBA, M. S.; et al. Live vaccine strain of *Francisella tularensis*: infection and immunity in mice. *Infection and Immunity*, v. 59, n. 9, p. 2922–2928, 1991.

FRANK, D. T.; CHARLES, L.; JAFFE, A. N.; WARBURG, R. K.; SVOBODOVA, M.; PELEG, O.; BANETH, G. *Leishmania tropical* in rock hyraxes (*Procavia capensis*) in a focus of human cutaneous disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.82, p. 814–818, 2010.

GOMBERT, A. K. Produção de troponina C em *Escherichia coli*: estudo da indução por lactose e obtenção de alta concentração celular. 1996. 134f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade de São Paulo, USP, Departamento de Engenharia Química, São Paulo/SP.

GOMBERT, A. K.; KILIKIAN, B. V. A simple way of achieving high cell concentration in recombinant *Escherichia coli* cultivation. *Braz J. Chem Eng*, v.14, n. 2, p.1-8, 1997.

GOMBERT, A. K.; KILIKIAN, B. V. Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer. *J Biotechnol*, v.60, n.1-2, p.47-54, 1998.

GONÇALVES, V. M.; FERREIRA, D. S.; SARI, R. S.; et al. Cultivo de *Escherichia coli* recombinante para produção da proteína rFspA1 de *Streptococcus pneumoniae* em batelada alimentada: estudo de diferentes estratégias de alimentação, v.12, p.1-8, 2008.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol*, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GUPTA, P.; GHOSALKAR, A.; MISHRA, S.; et al. Enhancement of over expression and chaperone assisted yield of folded recombinant aconitase in *Escherichia coli* in bioreactor cultures. *J Biosci Bioeng*, v.107, n.2, p.102-107, 2009.

HADDADIN, F. T.; TARCUM, S. W. Transcriptome Profiles For High-Cell-Density Recombinant and Wild-Type *E. coli*. *Biotechnol Bioeng*, v. 90, p. 127-53, 2005.

HARRISON, J. S.; KESHAVARZ-MOORE, E.; DUNNILL, P.; et al. Factors affecting the fermentative production of a lysozyme-binding antibody fragment in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, v.53, n.6, p.611-622, 1997.

HERTWALDT, B. L. Leishmaniasis. *Lancet*, v. 354, p. 1191–1199, 1999.

HISS, H. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, 2001.

HOFFMANN, F.; VAN DEN HEUVEL, J.; ZIDEK, N.; RINAS, U. Minimizing inclusion body formation during recombinant protein production in *Escherichia coli* at bench and pilot plant scale. *Enzyme Microb Technol*, v.34, p.235-241, 2004.

HORTSCH, R.; BOTZ, W. Growth and recombinant protein expression with *Escherichia coli* in different batch cultivation media. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 90, p. 69-76, 2011.

JANA, S.; DEBY, J. K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl microbial biotechnol*, v. 67, p. 289-298, 2005.

JENSEN, E.B.; CARLSEN, S. Production of recombinant human growth hormone in *E. coli*: expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts. *Biotechnol Bioeng*, v. 36, p. 1-11, 1990.

JERÔNIMO, S. M.; DUGGAL, P.; BRAZ, R. F.; et al. An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania i. chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *Scand J Infect Dis*, v. 36, n. 6-7, p. 443-9, 2004.

JERÔNIMO, S. M.; HIGGS, E.; VEDVICK, T.; et al. Identification of *Leishmania chagasi* antigens recognized by human lymphocytes. *J Infect Dis*, v. 172, n. 4, p. 1055-60, 1995.

KHALILZADEH, R.; SHOJAOSADATI, S.A.; BAHRAMI, A.; MAGHSOUDI, N. Overexpression of recombinant human interferon-gamma in high cell density fermentation of *E. coli*. *Biotechnol Lett*, v. 25, p. 1989-1992, 2003.

KHALILZADEH, R.; SHOJAOSADATI, S.A.; MAGHSOUDI, N.; MOHAMMADIANMOSAABADI, J.; MOHAMMADI, M.R.; BAHRAMI, A.; MALEKSABET, N.; NASSIRI-KHALILLI, M.A.; EBRAHIMI, M.; NADERIMANESH, H. Process development for Production of recombinant human interferon- γ -expressed in *E. coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 31, p. 63-69, 2004.

KILIKIAN, B. V.; SUAREZ, I.D.; LIRIA, C. W.; GOMBERT, A. K. Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction. *Process Biochem*, v. 35, n. 9, p. 1019-25, 2000.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. In: *Biology of Kinetoplastida*, London/New York, v. 2, p. 395-460, 1979.

KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special references to the form infective to the vertebrate host. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, v. 65, p. 37-42, 1990.

KILLICK-KENDRICK, R.; RIOUX, J. A. Intravectorial cycle of *Leishmania* in the sandflies. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 66, v. 1, p. 71-74, 1991.

KONSTANTINOV, K.; KISHIMOTO, M.; SEKI, T.; YOSHIDA, T. A balanced DO-stat and its application to the control of acetic acid excretion by recombinant *E. coli*. *Biotechnol Bioeng*, v. 70, p. 253-260, 1990.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-5, 1970.

LARENTIS, A. L.; NICOLAU, J. F. M. Q.; ESTEVES, G. S.; VARESCHINI, D. T.; ALMEIDA, F. V. R.; REIS, M. G.; GALLER, R.; MEDEIROS, M. A. Evaluation of pre-induction temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E. coli* using shaking flasks and microbioreactor. *Biomed central*, p. 7-671, 2014.

LARENTIS, A. L.; SAMPAIO, H. C.; MARTINS, O. B.; RODRIGUES, M. I.; ALVES, T. L. Influence of induction conditions on the expression of carbazole dioxygenase components (CarAa, CarAc, and CarAd) from *Pseudomonas stutzeri* in recombinant *Escherichia coli* using experimental design. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 38, n. 8, p. 1045-1054, 2011.

LARSON, R. E.; et al. IV Curso de verão em Biologia Celular e Molecular. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo - USP, 2007.

Lee, S. Y. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol*, v. 14, p. 98–105, 1996.

LIMA, W. J. N. Produção de proteínas recombinantes utilizando *Escherichia coli* em cultivos em alta densidade celular. 2004. 628 f. Tese Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, SP, Departamento de Engenharia Química, São Paulo/SP.

LINDEN, R. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. *Estud. av.*, v. 24, n. 70, p. 31-69, 2010.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUG, N. J.; FARR, A. L.; et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.

LU, Y. R.; WARNER, M.; SEDLAK, H. O. N.; et al. Comparison of glucose/xylose cofermentation of poplar hydrolysates processed by different pretreatment technologies. *Biotechnol Progr*, v.25, p.349–356, 2009.

LUBINIECKI, A. Potencial influence of international harmonization of pharmaceutical regulation on biopharmaceutical development. *Curr Opin Biotechnol*, v. 8, p. 350–356, 1997.

LULI, G. W.; STROHL, W. R. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 56, p. 1004–1011, 1990.

MA, X.; ZHENG, W.; WANG, T.; et al. Optimization and high-level expression of a functional GST-tagged rHLT-B in *Escherichia coli* and binding ability of purified rHLT-B. *J Microbiol.*, v. 44, n. 3, p. 293-300, 2006.

MAKRIDES, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, v. 60, p. 512–538, 1996.

MANDERSON, D.; DEMPSTER, R.; CHISTI, Y. A recombinant vaccine against hydatidosis: production of the antigen in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 33, p. 173–182, 2006.

MARTINS, D. R.; JERÔMINO, S. M.; WILSON, M. E.; et al. *Leishmania chagasi* T Cell antigens. ASM, 2006.

MARTY, P.; ROSENTHAL, E. Treatment of visceral leishmaniasis: a review of current treatment practices. *Expert Opin Pharmacother.*, v. 3, p. 1101-8, 2002.

MAYBE, N. G. Direct expression of human growth in *Escherichia coli* with the lipoprotein promoter. In: *Recombinant DNA Products: Insulin, Interferon, And Growth Hormone*. Ed. Bollon AP, CRC Press, Boca Raton, p. 155–161, 1984.

MINISTÉRIO DA SAÚDE /FUNASA, Guia de controle de LTA, Brasília, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília, 2003.

NAKHASI, H. L. D.; ZHENG, L.; CALLAHAN, J. R.; et al. Rubella virus: mechanism of attenuation in the vaccine strain (HPV77), v. 13, n. 3, p. 231–244, 1989.

NEVES, D. P.; et al. *Parasitologia Humana*. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

PANDA, A. K.; KHAN, R. H.; APPA RAO, K. B. C.; et al. Kinetics of inclusion body production in batch and high cell density fed-batch culture of *Escherichia coli* expressing ovine growth hormone. *J Biotechnol*, v. 75, p. 161-172, 1999.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis*, v. 22, p. 1–13, 1996.

PEI, X. L.; WANG, Q. Y. ; LI, C. L.; QIU, X. F.; et al. Efficient Production of a Thermophilic 2-Deoxyribose-5-Phosphate Aldolase in Glucose-Limited Fed-Batch Cultivations of *Escherichia coli* by Continuous Lactose Induction Strategy. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 165, p. 416-25, 2011.

PINSACH, J.; MAS, C.; LÓPEZ-SANTIN, J. Induction strategies in fed-batch cultures for recombinant protein production in *Escherichia coli*: application to rhamnulose 1-phosphate aldolase. *Biochemical Engineering Journal*, v. 41, p. 181-187, 2008.

PILAREK, M.; GLAZIRINA, J.; NEUBAUER, P. Enhanced growth and recombinant protein production of *Escherichia coli* by a perfluorinated oxygen carrier in miniaturized fed-batch cultures. *Microb Cell Facts*, v. 10, p. 1-9, 2011.

POPE, B.; KENT, H. M. High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, v. 24, p. 536–537, 1996.

REDWAN, E.; MATAR, S. M.; EL-AZIZ, G. A.; SEROUR, E. A. Synthesis of the human insulin gene: protein expression, scaling up and bioactivity. *Prep Biochem Biotechnol*, v. 38, p. 24–39, 2008.

REY, L. C. *Parasitologia – Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África*. 4º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

RIESENBERG, D.; MENZEL, K.; SCHULZ, V.; et al. High cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli* expressing human interferon alpha 1. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, v. 34, n. 1, p. 77-82, 1990.

RODRIGUES, G. S.; CAMPANHOLA, C.; VALARINI, P. J.; et al. Avaliação de impacto ambiental de atividades em estabelecimentos familiares do Novo Rural. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 44, 2003.

ROSSI, M. Desenvolvimento do processo de cultivo de *Escherichia coli* RR1. 2001. 100f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade de São Paulo, USP, Departamento de Engenharia Química, São Paulo/SP.

SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol. Cell. Biochem*, v. 307, p. 249–264, 2008.

SALOMAA, V.; STINSON, V.; KARK, J. D. Association of fibrinolytic parameters with early atherosclerosis. *The ARIC Study Circulation*, v. 91, p. 284–290, 1995.

SELVAPANDIYAN, A.; DEY, R.; GANNAVARAM, S.; et al. Immunity to Visceral Leishmaniasis Using Genetically Defined Live-Attenuated Parasites. *J Trop Med Med*, v.1, p.1-12, 2012.

SEZONOV, G.; JOSELEAU-PETIT, D.; D'ARI, R. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J. Bacteriol*, v. 189, p. 8746–8749, 2007.

SHAOJAOSADATI, S. A.; KOLAEI, S. M. V. Babaeipour V, Farnoud AM: Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein. *Iranian journal of biotechnology*, v. 3, n. 2, p. 63-84, 2008.

SHARMA, S. S.; BLATTNER, F. R.; HARCUM, S. W. Recombinant protein production in *Escherichia coli* reduced genome strain. *Metabolic Engineering*, v. 9, p. 133-141, 2007.

SHILOACH, J.; FASS, R. Growing *E. coli* to high cell density – a historical perspective on method development. *Biotechnol. Adv.*, v. 23, p. 345–357, 2005.

SHIN, C. S.; HONG, M. S.; BAE, C. S.; LEE, J. Enhanced production of human Miniproinsulin in fed-batch cultures at high cell density of *E. coli* BL21 (DE3)(pET-3aT2m2). *Biotechnol Prog.*, v. 3, p. 249-257, 1997.

SILVA JUNIOR, J. G. Eletroforese de proteínas: guia teórico-prático. Rio de Janeiro: Interciência, 2001.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop. Med. Int. Health*, v. 6, p. 849–854, 2001.

SUNDAR, S.; CHATTERJEE, M. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. *Indian Journal of Medical Research*, v. 123, n. 3, p. 345–352, 2006.

TABANDEH, F.; SHOJAOSADATI, S. A.; Zomorodipour, A.; Khodabandeh, M.; Sanati, M. H.; Yakhchali, B. Heat-induced production of human growth hormone by high cell density cultivation of recombinant *E. coli*. *Biotechnol Lett.* 26: 245-250, 2004.

THUESEN, H. M.; NORGAARD, A.; HANSEN, A. M.; CASPERSEN, M. B.; CHRISTENSEN, H. E. M. Expression of recombinant *Pseudomonas stutzeri* di-heme cytochrome c4 by high-cell density fed-batch cultivation of *Pseudomonas putida*. *Protein Express Purif.*, v. 27, p. 175-181, 2003.

TIAN, H.; TANG, L.; WANG, Y.; WANG, X.; et al. Lactose Induction Increases Production of Recombinant Keratinocyte Growth Factor-2 in *Escherichia coli*. *Int J Pept Res Ther.*, v.17, p.123–129, 2011.

TOMAZETTO, G.; MULINARI, F.; STANISCUASKI, F.; et al. Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, p.821–827, 2007.

VALDEZ-CRUZ, N. A.; CASPETA, L.; PEREZ, N. O.; RAMIREZ, N. O.; TRUJILLO-ROLDAN, M. A. Production of recombinant proteins in E.coli by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. *Microbial Cell Factories*, v. 9, p.1-16, 2010.

VIDAL, L.; FERRER, P.; ALVARO, G.; et al. Influence of induction and operation mode on recombinant rhamnulose 1-phosphate aldose production by *Escherichia coli* using the T5 promoter. *Journal of Biotechnology*, v. 118, p. 75-87, 2005.

VOULGARIS, S.; ARNOLD, A.; SPEIGHT, R.; et al. Effects of dissolved oxygen availability and culture biomass at induction upon the intracellular expression of monoamine oxidase by recombinant *E. coli* in fed batch bioprocesses. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 3, p. 721-729, 2011.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks. *Nature Biotechnol*, v. 18, p. 831–833, 2000.

WALTERS, L. L. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sandfly host. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 40, p. 196-206, 1993.

WANG, D.; LI, Q.; MAO, Y.; et al. High-level succinic acid production and yield by lactose-induced expression of phosphoenolpyruvate carboxylase in ptsG mutant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 87, p. 2025-2035, 2010.

WENG, Z.; DELISI, C. Protein therapeutics: promises and challenges of the twenty-first century. *Trends Biotechnol*, v. 20, p. 29–36, 2000.

WILSON, M. E.; JERONIMO, S. M.; PEARSON, R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microb Pathog*, v. 38, n. 4, p. 147-160, 2005.

WONG, M. S.; THOMAS, W. U, S.; CAUSEY, B.; et al. Reduction of acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures for increased recombinant protein production. *Metabolic Engineering*, v. 10, n. 2, p. 97-108, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, 2009. Leishmaniasis. <http://who.int/emc/diseases/leish/index.html>. Acesso em 19 de dezembro 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The world health report. Geneva, 2001.

XIE, R.; TU, M.; WU, Y.; et al. Improvement in HPLC separation of acetic acid and levulinic acid in the profiling of biomass hydrolysate. *Bioresour Technol.* v. 102, n. 7, p. 4938-4942, 2011.

XUE, W.; FAN, D.; SHANG, L.; et al. Effects of acetic acid and its assimilation in fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli* containing human-like collagen cDNA. *J. Biosci. Bioeng.* v. 109, p. 257-261, 2010.

YEE, L.; BLANCH, H. W. Recombinant trypsin production in high cell density fed-batch cultures in *E. coli*. *Biotechnol Bioeng.* v. 41, p. 781-790, 1993.

7 - Anexo I

Tabela 8 - Composição dos tampões utilizados no rompimento (lise) celular e purificação

Tampão	Composição	Etapa
Tampão de Ligação	Fosfato de sódio 100 mM, 8 M uréia , 10 mM Tris-Cl, pH=6,3.	Purificação
Tampão de Eluição C	Fosfato de sódio 100 mM, 8 M uréia , 10 mM Tris-Cl, pH=5,9.	Purificação
Tampão de Eluição E	Fosfato de sódio 100 mM, 8 M uréia , 10 mM Tris-Cl, pH=4,5.	Purificação
Tampão de Lise	Fosfato de sódio 100 mM, 8 M uréia , 10 mM Tris-Cl, pH=8,0.	Lise dos corpos de inclusão

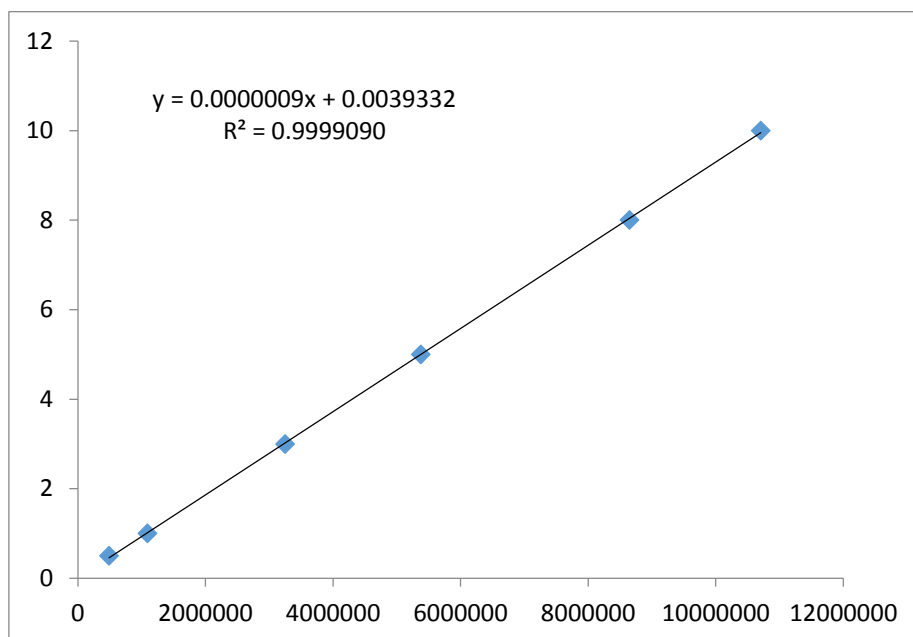


Figura 20 - Gráfico referente a curva padrão do ácido acético