



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



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO DO CULTIVO DE DOIS CLONES DE  
*ESCHERICHIA COLI* RECOMBINANTES (eIF, LACK)  
PARA A EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS DA  
*LEISHMANIA CHAGASI*.**

Michelle Rossana Ferreira Vaz

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>.Dra. Gorete Ribeiro de Macedo  
Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup>.Dra. Márcia Regina da Silva Pedrini

Natal/RN  
Fevereiro/2008.

**Michelle Rossana Ferreira Vaz**

**ESTUDO DO CULTIVO DE DOIS CLONES DE  
*ESCHERICHIA COLI* RECOMBINANTES (eIF, LACK) PARA  
A EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS DA *LEISHMANIA  
CHAGASI*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

NATAL/RN  
FEVEREIRO/ 2008

Divisão de Serviços Técnicos  
Catalogação da Publicação na Fonte.  
UFRN / Biblioteca Central Zila Mamede.

**Vaz, Michelle Rossana Ferreira.**

Estudo do cultivo de dois clones de *Escherichia coli* recombinantes (eIF, LACK) para a expressão de antígenos da *Leishmania chagasi* /Michelle Rossana Ferreira Vaz. – Natal [RN], 2008.

66 f.

Orientadora: Gorete Ribeiro de Macedo.

Co-orientadora: Márcia Regina da Silva Pedrini.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação na Engenharia Química.

1. Proteínas – Dissertação. 2. Recombinante – Dissertação. 3. *Leishmania chagasi* – Dissertação. I. Macedo, Gorete Ribeiro de. II. Pedrini, Márcia Regina da Silva. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 547.96 (043.3)

**VAZ, Michelle Rossana** – Estudo do Cultivo de dois clones de *Escherichia coli* recombinantes (eIF, LACK) para a Expressão de Antígenos da *Leishmania chagasi*. Dissertação de Mestrado, UFRN, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química,– PPGEQ, Áreas de Concentração: Engenharia de Processos, Natal/RN, Brasil.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dra. Gorete Ribeiro de Macedo

**Co-orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dra. Márcia Regina da Silva Pedrini

---

**RESUMO:** Com advento da tecnologia do DNA recombinante, a expressão de proteínas recombinantes torna-se uma ferramenta importante nos estudos da estrutura, função e identificação de novas proteínas, principalmente com finalidades terapêuticas. A *Escherichia coli* tem sido o procaríoto predominante nos estudos da engenharia genética devido à riqueza de informações a respeito do seu metabolismo. Apesar do avanço expressivo dos estudos da biologia molecular e da imunologia das infecções, não existe, atualmente, nenhuma droga profilática capaz de prevenir o *calazar*. Desta forma, existe uma grande necessidade de identificação de antígenos específicos para o desenvolvimento de vacinas e *kits* para diagnósticos contra a *Leishmaniose visceral*. Neste contexto, este trabalho objetivou estudar a expressão de antígenos recombinantes da *Leishmania chagasi* durante o cultivo de *Escherichia coli* em incubador rotativo (*shaker*). Um primeiro conjunto de ensaios foi realizado com o objetivo de se conhecer o comportamento cinético do crescimento dois clones recombinantes (eIF, LACK) em duas diferentes composições de meios (2xTY, TB) suplementados por antibióticos, sem adição de IPTG. Na segunda etapa dos ensaios, foi realizado o procedimento de indução por IPTG, a fim de verificar a influência da composição dos meios testados na expressão das proteínas recombinantes. Com base nos resultados obtidos, pode-se observar que a elevada complexidade do meio de cultivo favoreceu a cinética de crescimento dos clones recombinantes (eIF,LACK), no entanto, ao se tratar dos ensaios submetidos ao procedimento de indução por IPTG, a elevada complexidade do meio de cultivo não favoreceu a expressão das proteínas recombinantes. Por outro lado, foram obtidos resultados positivos para todos os clones recombinante (eIF, LACK) testados, confirmada através do perfil eletroforético.

---

**Palavras Chaves:** Proteína. Recombinante. *Leishmaniose visceral*.

---

BANCA EXAMINADORA E DATA DA DEFESA: 25 de fevereiro de 2008:

**Presidente:** Prof<sup>ª</sup>. Dra. Gorete Ribeiro de Macedo (UFRN)

**Membros:** Prof<sup>ª</sup>. Dra. Márcia Regina da Silva Pedrini (UFRN)  
Prof<sup>ª</sup>. Dra Ester Ribeiro Gouveia (UFPE)  
Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos (UFRN)

## ABSTRACT

With advent of the technology of the recombinant DNA, the recombinant protein expression becomes an important tool in the studies of the structure, function and identification of new proteins, mainly with therapeutical purposes. The *Escherichia coli* has been procarrioto predominant in the studies of genetic engineering due to wealth of information regarding its metabolism. Despite the expressivo advance of the studies of molecular biology and the immunology of the infections, it does not exist, currently, no prophylactic drug capable to prevent calazar. Of this form, it exists a great necessity of specific antigen identification for the vaccine development and kits for disgnostic against the *visceral Leishmaniose*. In this context, this work objectified to study the recombinant antigen expression of the *Leishmania chagasi* during the culture of *Escherichia coli* in shaker. A first set of assays was carried through with the objective of if knowing the kinetic behavior of the growth of two clones recombinant proteins (eIF, LACK) in two different compositions of culture medium (2xTY, TB) supplemented by antibiotics, without IPTG addition. In the second stage of the assays, the procedure of induction for IPTG was carried through, in order to verify the influence of the composition of the ways tested in the expression them recombinant proteins. On the basis of the gotten results, can be observed that the high complexity of culture medium favored the kinetic one of growth of clones recombinant (eIF, LACK), however, to if to deal with the assays submitted to the procedure of induction for IPTG, the raised complexity of culture medium did not favor the expression of recombinant proteins. On the other hand, they had been gotten resulted positive for all clones recombinant (eIF, LACK) tested, confirmed through the eletroforético profile.

**Key-words:** protein; recombinant; *visceral leishmaniasis*.

## **DEDICATÓRIA**

Esta dissertação é dedicada:

A Deus, por ter me proporcionado a oportunidade de realizar e concluir este trabalho.

Dedico aos meus pais, Rutênio Vaz e Leônia Vaz, por toda a ajuda dada em todos os momentos da minha vida. A minha querida irmã Cíntia Vaz pelo carinho e apoio. Aos meus Avós Leônidas Duarte Ferreira, que apesar de não presente fisicamente, sei que sempre estará me apoiando em todos os momentos da minha vida e Aurivan Reis Duarte. Ao meu Tio Leovan Duarte Ferreira E ao meu querido amor Israel Rodovalho Júnior pela compreensão e apoio nos momentos difíceis.

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Gorete Ribeiro de Macedo, minha orientadora, pela orientação e por ter me proporcionado um amadurecimento profissional e pessoal.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Márcia Regina da Silva Pedrini, pela paciência, sugestões e colaboração em vários momentos.

Ao Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos, pelos conselhos, críticas quando necessário e pelo seu bom humor nos momentos difíceis.

À Prof<sup>a</sup>.Dra. Adriana Ferreira Uchôa, pela ajuda na implantação da metodologia da eletroforese e conselhos os quais foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>.Dra. Ana Lúcia Lula da Mata pela paciência e conselhos desde a minha graduação.

À Mazinha, pelo apoio e críticas até nos momentos os quais falhei.

A Sirtys Lessa de Andrade, pela grande colaboração, o qual não poupou esforços nem tempo em me ajudar na realização dos experimentos em laboratório e esteve sempre incentivando, mesmo nos momentos mais difíceis no decorrer das implantações das metodologias.

Ao Engenheiro Químico Aldo Batista, pela contribuição na realização dos ensaios preliminares e a Natália Araújo pela ajuda na finalização do trabalho.

Ao Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB), da UFRN, por ceder sua estrutura para realização dos ensaios e ao Laboratório de Engenharia Ambiental e Controle de Qualidade (LEACQ), em particular as Engenheiras Químicas Anita e Ana Carla pelo auxílio nas análises de TOC.

A Ivo Freire, pelos conselhos, sugestões e sua habilidade na elaboração de trabalhos.

Ao CNPq, por apoiar financeiramente a realização deste trabalho.

Em especial dedico essa dissertação a Doutoranda Cristiane de Assis, pela ajuda não apenas na parte escrita, mas também contribuiu bastante para meu amadurecimento profissional.

A Doutoranda Giovana Binder Pagnoncelli, por colaborar no início das minhas fermentações, com sugestões, conselhos os quais contribuíram bastante para a realização dos experimentos. A Doutoranda Valdevez Pontes Rocha, que com sua humildade e experiência, colaborou bastante nas análises dos resultados deste trabalho.

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	2
2. Aspectos teóricos .....	6
2.1 – Tecnologia do DNA recombinante .....	6
2.2 – Expressão Heteróloga .....	7
2.3 – <i>Escherichia coli</i> .....	8
2.4 – Indução por IPTG .....	8
2.5 – Antígenos da <i>Leishmania visceral</i> .....	9
2.6 – Processos de cultivos para obtenção de alta concentração celular .....	11
3. Estado da arte .....	13
4. Metodologia experimental .....	19
4.1 – Microrganismos .....	19
4.1.1 – Manutenção dos clones .....	19
4.1.2 – Meios de cultivos utilizados nos Ensaio em Incubador Rotativo .....	19
4.1.2.1 – Meio 2xTY .....	20
4.1.2.2 – Meio TB (Terrific Broth ) .....	20
4.2 – Preparo do Inóculo .....	20
4.3 – Condições dos Cultivos .....	20
4.4 – Procedimento de Indução .....	21
4.5 – Métodos de Análises .....	21
4.5.1 – Fluxograma do procedimento analítico .....	22
4.5.2 – Determinação da concentração celular (X) .....	22
4.5.3 – Determinação da concentração de substrato (TOC) .....	22
4.5.4 – Purificação da proteína recombinante por adsorção em batelada .....	23
4.5.4.1 – Preparação da resina .....	24
4.5.4.2 – Ligação da amostra .....	24
4.5.4.3 – Lavagem da resina .....	24
4.5.4.4 – Eluição .....	25
4.6 – Determinação quantitativa da proteína .....	25
4.7 – Eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) .....	25
4.8 – Tratamento dos resultados experimentais .....	26



4.8.1 – Velocidades instantâneas .....	26
4.8.2 – Determinação da produtividade .....	27
4.8.2.1 Produtividade em células (Px) .....	27
4.8.2.2 Velocidades específicas .....	27
5. Resultados e Discussão .....	30
5.1 – Ensaio para identificação da cinética de crescimento de dois clones eIF, LACK em duas diferentes composições de meio de cultivo .....	30
5.1.1 – Ensaio sem indução .....	30
5.1.2 – Indução da expressão da proteína recombinante por IPTG .....	34
5.3 – Verificação da expressão da proteína por eletroforese em gel de poliacrilamida...	49
6. Conclusão .....	54
Referências bibliográficas .....	57
<b>ANEXOS</b>	
ANEXO I .....	62
ANEXO II .....	63
ANEXO III .....	64

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Vetores especiais para a expressão de genes exógenos em <i>E. coli</i> .....	6
Figura 2.	Micrografias dos principais organismos utilizados na tecnologia de DNA recombinante <i>Escherichia coli</i> (verifica-se a formação de corpos de inclusão), <i>Pichia pastoris</i> e células de mamíferos do tipo CHO .....	7
Figura 3.	Esquema geral do princípio de cromatografia de afinidade .....	23
Figura 4.	Representação esquemática da eletroforese .....	26
Figura 5.	Curvas de crescimento e consumo da fonte de carbono do clone eIF em meio 2xTY sem indução (Ensaio S1, Tabela 1) .....	31
Figura 6.	Curvas de crescimento e consumo da fonte de carbono do clone eIF em meio TB sem indução (Ensaio S2, Tabela 1) .....	31
Figura 7.	Curva de crescimento e consumo da fonte de carbono do clone LACK em meio 2xTY sem indução (Ensaio S3, Tabela 1) .....	32
Figura 8.	Curva de crescimento e consumo da fonte de carbono do clone LACK em meio TB sem indução (Ensaio S4, Tabela 1) .....	32
Figura 9.	Curvas de crescimento e consumo da fonte de carbono do clone eIF em meio 2xTY com indução (Ensaio S5, Tabela 3) .....	35
Figura 10.	Curva de crescimento e consumo da fonte de carbono do clone eIF em meio TB com indução (Ensaio S6, Tabela 3) .....	36
Figura 11.	Curva de crescimento e consumo da fonte de carbono do clone LACK em meio 2xTY com indução (Ensaio S7, Tabela 3) .....	36
Figura 12.	Curva de crescimento e consumo da fonte de carbono do clone LACK em meio TB com indução (Ensaio S8, Tabela 3) .....	37
Figura 13.	Curvas da produtividade do produto dos ensaios S5, S6, S7 e S8 .....	40
Figura 14.	Curvas da produtividade em células dos ensaios S5, S6, S7 e S8 .....	41
Figura 15.	Curvas da expressão da proteína recombinante eIF – Meio 2xTY Intracelular, Extracelular, Proteína Total (Intra e Extracelular) (Ensaio S5, Tabela 2) .....	42
Figura 16.	Curvas da expressão da proteína recombinante eIF – Meio TB Intracelular, Extracelular, Proteína Total (Intra e Extracelular) (Ensaio S6, Tabela 2) .....	43
Figura 17.	Curvas da expressão da proteína recombinante LACK – Meio 2xTY Intracelular, Extracelular, Proteína Total (Intra e Extracelular) (Ensaio S7, Tabela 2) .....	43
Figura 18.	Curvas da expressão da proteína recombinante LACK- Meio TB Intracelular, Extracelular, Proteína Total (Intra e Extracelular) (Ensaio S8, Tabela 2).....	44
Figura 19.	Curvas da expressão intracelular da proteína recombinante eIF (mg/mL) – Meio 2xTY e da velocidade específica de crescimento $\mu_x$ ( $h^{-1}$ ),	

Ensaio S5, Tabela 3 .....	47
Figura 20. Curvas da expressão intracelular da proteína recombinante eIF (mg/mL) – Meio TB e da velocidade específica de crescimento $\mu_x(h^{-1})$ , Ensaio S6, Tabela 3.....	48
Figura 21. Curvas da expressão extracelular da proteína recombinante LACK (mg/mL) – Meio 2xTY e da velocidade específica de crescimento $\mu_x(h^{-1})$ , Ensaio S7, Tabela 3 .....	48
Figura 22. Curvas da expressão extracelular da proteína recombinante LACK (mg/mL) – Meio TB e da velocidade específica de crescimento $\mu_x(h^{-1})$ , Ensaio S8, Tabela 3 .....	49
Figura 23. Perfil Eletroforético das frações da proteína eIF em meio 2xTY obtidas durante os ensaios de indução por IPTG.....	50
Figura 24. Perfil Eletroforético das frações da proteína eIF em meio TB obtidas durante os ensaios de indução por IPTG.....	51
Figura 25. Perfil Eletroforético das frações da proteína LACK em meio 2xTY obtidas durante os ensaios de indução por IPTG.....	51
Figura 26. Perfil Eletroforético das frações da proteína LACK em meio TB obtidas durante os ensaios sem indução e com indução por IPTG.....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo das condições dos ensaios realizados sem indução .....	30
Tabela 2. Parâmetros cinéticos referentes aos ensaios sem indução .....	33
Tabela 3. Resumo das condições dos ensaios realizados com indução por IPTG .....	35
Tabela 4. Parâmetros cinéticos obtidos dos ensaios com indução .....	37
Tabela 5. Parâmetros cinéticos dos ensaios sem e com indução .....	41

## LISTA DE NOMENCLATURAS

IPTG	isopropiltiogalactosídeo
kDa	quilo daltons (1000 daltons)
[Proteína] <sub>máx</sub>	Concentração máxima de proteína (g/L)
$P_x$	Produtividade em células ( $\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ )
$P_{x \text{ máx}}$	Produtividade máxima em células ( $\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ )
$P_p$	Produtividade em produto ( $\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ )
$P_{p \text{ máx}}$	Produtividade máxima em produto ( $\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ )
$P_{p/x}$	Produção específica de crescimento ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
$S_o$	substrato inicial (g/L)
$S_f$	substrato final (g/L)
$(S_o - S_f)$	Consumo do substrato (g/L)
$t_{x \text{ máximo}}$	Tempo final da fermentação (h)
$T_f$	Tempo decorrido para exaustão da fonte de carbono (h)
$t [\text{Proteína}]_{\text{máx}}$	instante no qual a concentração da proteína é máxima (h)
$t (\mu_p \text{ máx})$	instante no qual a velocidade específica de produção da proteína é máxima (h).
$X_f$	Concentração celular final (g/L)
$X_{\text{máx}}$	Concentração máxima final (g/L)
X (instante da indução)	Concentração celular no instante de indução (g/L)
$Y_{x/s}$	Fator de conversão de substrato a célula ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
$\mu_x$	Velocidade específica de crescimento no instante de indução ( $\text{h}^{-1}$ )
$\mu_{x \text{ max } *}$	Velocidade específica de crescimento após indução (fase exponencial) ( $\text{h}^{-1}$ )
$\mu_p$	Velocidade específica de formação do produto no instante de indução ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )

---

# **Capítulo 1**

## **Introdução Geral**

---

# 1. Introdução

A engenharia genética cresceu muito nos últimos anos, tendo como objetivo prático viabilizar a síntese de produtos complexos, que não são facilmente obtidos por processos convencionais. O desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, iniciou-se na década de 1970, quando os bioquímicos Berg, Boyer e Cohen mostraram que os genes podiam ser transferidos de um organismo para outro. Diante da capacidade de transferência de genes foi verificado que a seqüência de DNA heteróloga inserida podia recombinar-se com o DNA do microrganismo hospedeiro, tendo sido criados os primeiros organismos geneticamente modificados, tornando-se, dessa maneira, uma ferramenta muito potente para obtenção de proteínas de interesse em diversas áreas (ALBERTS, 2005).

Os microrganismos estudados com maior freqüência pela Engenharia Genética para tornarem-se hospedeiros de vetores são as bactérias. A *Escherichia coli* tem sido o procarionto predominante nos estudos da engenharia genética devido à riqueza de informações a respeito do seu metabolismo (LIRIA, 1995).

A escolha de um bom sistema de expressão de proteínas envolve fatores importantes a serem considerados com relação ao dobramento e conformação correta, além da escolha de um compartimento celular para a expressão. A proteína pode ser expressa em três localizações: no citoplasma, no periplasma e extracelularmente. Em *Escherichia coli*, o produto recombinante é frequentemente armazenado no citoplasma. Contudo, na literatura encontram-se casos de proteínas que são endereçadas ao espaço periplasmático, e mais raramente ainda, as moléculas são excretadas para o meio extracelular (STRYER, 1996).

A expressão de proteínas no citoplasma, freqüentemente conduz a uma má formação estrutural da proteína e aglutinação em corpos de inclusão insolúveis. Entre as vantagens da produção dessas proteínas sob a forma de corpos de inclusão estão: o mais fácil isolamento; a proteína não prejudica o hospedeiro, pois está inativa. Como desvantagem, pode-se citar que a proteína perde a sua funcionalidade, sendo que a atividade biológica dessa proteína pode ser reconstituída através de complexos processos de renaturação, aumentando os custos e diminuindo a produtividade (CHOIN, KEUM, LEE, 2006).

Por este motivo, em termos de processo, a atenção tem sido direcionada a cultivos que proporcionem elevada concentração celular e bons níveis de expressão de proteína.

Portanto, a escolha cuidadosa das cepas, vetores e das condições de crescimento, são de grande valia para a identificação dos parâmetros mais relevantes envolvidos neste tipo de processo e posterior otimização do mesmo (CASTILLO, 1997).

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, a produção de proteínas recombinantes torna-se uma ferramenta importante nos estudos da estrutura, função e identificação de novas proteínas, principalmente com finalidade terapêuticas, possibilitando a fabricação de drogas capazes de controlar certas doenças ou as proteínas purificadas podendo ser utilizadas diretamente no tratamento de certas doenças como diabetes (insulina), nanismo (hormônio do crescimento) dentre outras.

As *Leishmanioses* são enfermidades provocadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que de acordo com a espécie podem produzir manifestações cutâneas, mucocutâneas, cutâneas difusas e viscerais. A *Leishmaniose visceral americana* (LVA) ou *calazar* é a forma mais séria dessa doença. Quando não é tratada, pode levar à morte em um ou dois anos após o aparecimento dos sintomas.

No Brasil, e em particular na região Nordeste, esta doença atinge quase duas mil pessoas por ano, além de ser responsável por 92% dos casos. O aumento do número de pessoas que correm o risco de serem infectadas pode ser explicado pelas condições geográficas, sobretudo climáticas, representadas pela alta pluviosidade, que favorece a proliferação do mosquito do gênero *flebotomíneos* (JERÔNIMO *et al.*, 2004).

Atualmente, as principais drogas utilizadas no tratamento do *calazar* são a Anfotericina B e Glucantime, porém, devido à elevada toxicidade requerem cuidados especiais quando empregadas no tratamento (SILVA *et al.*, 1997). Apesar dos avanços expressivos dos estudos da biologia molecular e da imunologia das infecções, não existe, atualmente, nenhuma droga profilática capaz de prevenir essa doença, o que justifica a necessidade de identificação de antígenos específicos para o desenvolvimento de vacinas e *kits* para diagnósticos contra a *Leishmaniose visceral*.

Nessa direção, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o crescimento e a capacidade de expressão de antígenos da *Leishmania chagasi* de dois diferentes clones (eIF e LACK). Um primeiro conjunto de ensaios foi realizado com o objetivo de se conhecer o comportamento cinético dos clones recombinantes (eIF, LACK) em duas diferentes composições de meio (2xTY, TB) suplementados por antibióticos, sem adição de IPTG (Isopropiltiogalactosídeo). Posteriormente, os ensaios foram submetidos a uma estratégia de indução por IPTG a fim de verificar a influência da composição dos meios testados (2xTY e TB) na expressão dos antígenos (eIF, LACK) da *Leishmania chagasi*.



Para uma melhor compreensão, a presente dissertação foi dividida em seis capítulos.

No capítulo I apresenta-se uma introdução geral do tema em estudo.

O capítulo II apresenta um levantamento de vários conceitos importantes para o entendimento do tema em estudo. Portanto, neste capítulo são apresentados os aspectos teóricos referentes ao processo de expressão heteróloga, as vantagens e algumas limitações na utilização da *Escherichia coli* como hospedeiro, procedimento de indução por IPTG e as estratégias de cultivos na obtenção de elevada concentração celular e rendimento volumétrico da proteína recombinante.

O capítulo III apresenta o estado da arte relativo à produção de antígenos recombinantes da *Leishmania chagasi* durante o cultivo de *Escherichia coli* em incubador rotativo. Descreve-se, neste capítulo, vários estudos realizados por diversos autores, as metodologias empregadas e os respectivos resultados obtidos.

No capítulo IV, por sua vez, descrevem-se o procedimento experimental incluindo os materiais utilizados, os equipamentos e as condições experimentais empregados na realização deste trabalho.

No capítulo V são apresentados os resultados e a discussão.

As conclusões obtidas são apresentadas no capítulo VI.

Por fim, apresenta-se as referências bibliográficas citadas ao longo da presente dissertação e dados anexos como complementação dos assuntos abordados no corpo do texto.

---

## **Capítulo 2**

### **Aspectos Teóricos**

---

## 2. Aspectos teóricos

### 2.1 – Tecnologia do DNA recombinante

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, a expressão de proteínas clonadas tornou-se uma ferramenta importante nos estudos de estrutura, função e identificação de novas proteínas, principalmente com finalidades terapêuticas (Larentis *et al.*, 2003). Em termos gerais, chama-se de DNA recombinante, um DNA híbrido obtido *in vitro* pela combinação de 2 DNAs pertencentes a 2 espécies diferentes (ETIEMME, 2003).

A origem do termo clonagem vem da genética bacteriana que considera uma colônia de bactérias como um clone porque os indivíduos são geneticamente idênticos a uma bactéria inicial (SAMBROCK, FRITSCH, MANATIS, 1989). A capacidade de clonar genes implica que um gene que codifica uma proteína importante de um animal ou planta pode agora ser retirado de seu hospedeiro normal, inserido em um vetor de clonagem e introduzido em uma bactéria. Se as manipulações forem executadas corretamente, o gene será expresso e a proteína será sintetizada pela célula bacteriana (BROWN, 2003). A Figura 1 retrata a clonagem e expressão de genes exógenos em *Escherichia coli*.

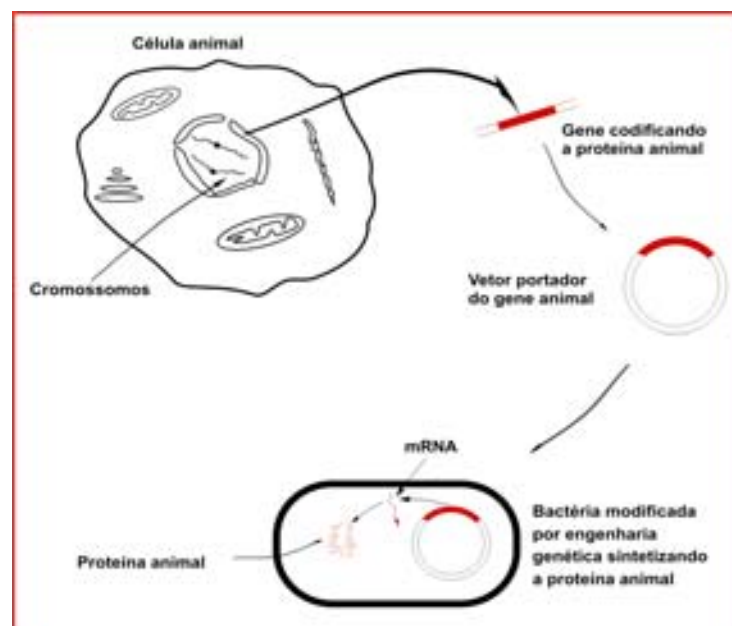


Figura 1. Clonagem e expressão de genes exógenos em *E. coli* (BROWN, 2003).

## 2.2 – Expressão Heteróloga

A expressão da proteína recombinante em *Escherichia coli* por ser considerado um processo estranho à célula, ou seja, não fazendo parte de seu conjunto metabólico natural e geralmente acaba causando problemas à célula hospedeira que reage às condições adversas de várias formas, dificultando a obtenção da proteína de interesse. Portanto, a escolha cuidadosa dos vetores, hospedeiros e as condições de crescimento são considerados fatores essenciais para obtenção de altos níveis de expressão em *Escherichia coli* (THE QIA ESPRESSIONIST, 2003).

A complexidade do processo para a obtenção de uma proteína heteróloga, envolve a escolha de um compartimento celular para a expressão da proteína. Em *Escherichia coli*, o produto recombinante é frequentemente armazenado no citoplasma, sob a forma de corpos de inclusão, contudo, na literatura, encontram-se casos de proteínas que são endereçadas ao espaço periplasmático, e mais raramente ainda, as moléculas que são excretadas para o meio extracelular (ROSSI, 2001).

Entretanto, apesar de toda complexidade, a expressão bem sucedida de uma proteína em determinado sistema de expressão depende de sua estrutura, funcionalidade e complexidade. A Figura 2 apresenta as micografias dos organismos comumente empregados para a produção de proteínas recombinantes: destacam-se as bactérias, como a *Escherichia coli* (bactéria que habita o trato digestivo humano), leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*, assim como células mais complexas, como células de insetos ou de mamíferos.

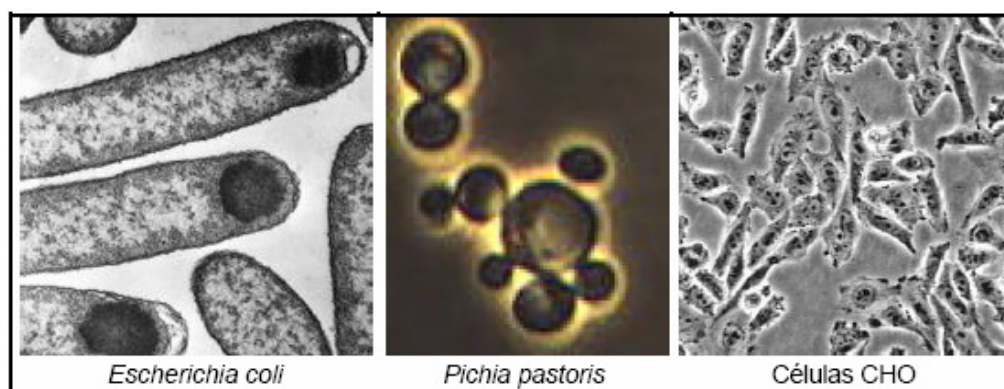


Figura 2. Micrografias dos principais organismos utilizados na tecnologia de DNA recombinante: *Escherichia coli* (verifica-se a formação de corpos de inclusão), *Pichia pastoris* e células de mamíferos do tipo CHO. (Fonte: LARENTINS *et al.*, 2003).

## 2.3 – *Escherichia coli*

Dentre os vários sistemas de expressão disponíveis para a produção heteróloga de proteínas, a bactéria gram-negativa *Escherichia coli* é um dos sistemas mais utilizados. Essa bactéria tem atraído interesse, devido a sua habilidade de crescer rapidamente, atingir altas concentrações celulares, permitir o uso de substratos baratos e possuir várias cepas com genótipo conhecido (CHOIN, KEUM, LEE, 2006).

Entretanto, apesar de todo o conhecimento acumulado sobre a *Escherichia coli*, isto não irá garantir um sistema de expressão eficiente para todas as proteínas recombinantes. Foram observadas algumas limitações no sistema de expressão em que a *Escherichia coli* é utilizada como hospedeiro, tais como:

- As proteínas produzidas na forma insolúvel, biologicamente inativadas em corpos de inclusão, sendo que a atividade biológica dessa proteína pode ser reconstituída através de complexos processos adicionais que aumentam os custos e diminuem a produtividade;
- A incapacidade de realizar modificações pós-traducionais, comuns em eucariotos;
- E a ausência de um sistema de secreção para uma eficiente liberação da proteína recombinante para o meio de cultura (TOMAZETTO, 2006).

## 2.4 – Indução por IPTG

O IPTG (isopropiltiogalactosídeo) é um forte indutor químico utilizado largamente em pesquisa básica na indução de promotores (PANDA *et al*, 1999) e representa, atualmente, uma das moléculas indutoras mais utilizadas nos mais diversos sistemas de expressão.

Estudos têm mostrado que somente o IPTG (independente da produção de proteína recombinante) pode causar uma resposta de estresse em *Escherichia coli* (TOMAZETTO, 2006). Desta forma, o uso do IPTG como molécula indutora é indesejável na produção de proteínas recombinantes com finalidades terapêuticas ou na produção em larga-escala (NEUBAUER, 1992).

Por outro lado, a utilização da Lactose como indutor é atrativa, principalmente, em cultivos realizados em biorreatores, devido ao baixo custo agregado, por não apresentar toxicidade às células e ainda funcionar como coadjuvante na fonte de carbono e energia, diferentemente dos casos onde o IPTG é utilizado (KILIKIAN *et al*, 2000). Entretanto, apesar

das vantagens da utilização da Lactose como molécula indutora, esta apresenta algumas limitações: molécula indutora pouco discutida na literatura, a adição da Lactose pode provocar a mudança no pH do meio de cultivo influenciando negativamente no crescimento bacteriano e na expressão da proteína, dificuldade de estabelecer estratégia de indução adequada, observou-se também, que a adição da lactose promove a diminuição da resposta transcricional, resultando na redução do nível de indução (Menzela, Ceccarelli, Gramajo 2003).

As condições fisiológicas do microrganismo no instante de indução são fatores importantes para viabilizar a síntese de proteínas recombinante segundo LIRIA (1995). Isto também foi verificado por YEE & BLANCH (1992), que obtiveram alto rendimento volumétrico do produto recombinante quando o instante de indução era a fase exponencial de crescimento microbiano ( $DO_{590nm}$  entre 0,4 -0,5). Além disso, constatou-se que a indução também é dependente da quantidade do indutor disponível para a célula, com o aumento da quantidade do indutor, mais rápida é a resposta da célula à produção de proteínas.

## 2.5 – Processos de cultivos para a obtenção de alta concentração celular

Na utilização de microrganismos recombinantes é importante que sejam atingidas altas concentrações celulares quando a expressão do gene alvo está sob controle de um promotor reprimido, ou seja, aquele que depende de uma determinada mudança nas condições de cultivo para que o gene possa ser expresso. Esta necessidade mais acentuada de se obter altas concentrações celulares deve-se ao fato do desencadeamento da expressão do produto heterólogo ser associado a uma subtração da energia disponível para o crescimento e manutenção do microrganismo (GOMBERT, 1996).

Em cultivos de *E.coli* recombinante, a maximização do rendimento volumétrico de produto heterólogo não é função exclusiva da concentração celular, dependendo também do rendimento celular específico do produto. Por este motivo, dois fatores devem ser considerados no desenvolvimento de um processo que objetiva maximizar o rendimento volumétrico de um produto heterólogo: estratégias de obtenção de alta concentração celular e estudo da influência das condições de cultivo no rendimento celular específico do produto (RIESENBERG *et al.*, 1990; ZABRISKIE, WARRENHEIM, POLANSKY, 1987). A velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ ) nos instantes prévios a indução da síntese de produto recombinante é uma variável bastante estudada, na medida em que reflete de certa forma o estado fisiológico das células dentro do

reator. Há casos em que a expressão do produto recombinante é favorecida com o aumento de  $\mu$ , casos em que ocorre o inverso, havendo ainda os casos em que a expressão é independente de  $\mu$  (KILIKIAN *et al.*, 2000).

A composição do meio de cultivo deve ser cuidadosamente formulada e monitorada uma vez que tem significativo impacto metabólico sobre o desenvolvimento de processos de obtenção de altas concentrações celulares e produção de proteína recombinante. Meios complexos proporcionam maiores velocidades específicas de crescimento, devido à presença da triptona que supre as bactérias com aminoácidos e pequenos peptídeos enquanto que o extrato de levedura supre a demanda por nitrogênio, nutrientes orgânicos e inorgânicos (BROWN, 2003). No entanto, são os meios definidos que permitem atingir maiores concentrações celulares, devido a maior facilidade de controle do fornecimento da fonte de carbono e, conseqüentemente, da velocidade específica de crescimento, o que torna possível contornar efeitos de inibição (YEE & BLANCH, 1992). Por outro lado, o enriquecimento do meio durante a etapa de indução parece ser interessante para evitar uma eventual carência nutricional e conseqüentemente ação de proteases sobre o produto recombinante (ZABRISKIE, WARENHEIM, POLANSKY, 1987).

Dentre as formas tradicionais de se conduzir um processo bioquímico (descontínua, descontínua alimentada e contínua), a descontínua alimentada é a mais utilizada e difundida na literatura na obtenção de altas concentrações celulares com altas produtividades em reator. Este tipo de processo oferece vantagem em relação ao processo descontínuo simples, principalmente, quando fenômenos inibitórios estão envolvidos no cultivo, na medida em que é possível controlar o fornecimento de substrato e conseqüentemente a velocidade específica de crescimento (SCHMIDELL *et al.*, 2001). O processo contínuo apresenta em relação ao descontínuo alimentado a desvantagem de não permitir a obtenção de concentrações celulares tão elevadas devido à constante retirada de meio, com célula, do reator, sendo interessante sua utilização nos casos em que as operações subseqüentes, de purificação, por exemplo, também possam ser conduzidas de forma contínua. Além disto, o risco de perda de informação genética contida em plasmídeos aumenta com o tempo de cultivo.

Tendo em vista o metabolismo aeróbio facultativo da *Escherichia coli* em cultivos em biorreatores é importante:

- Manter a concentração baixa de glicose (próxima da nulidade);
- Oxigênio dissolvido acima de 20%;
- Controle de  $\mu_x$  (velocidade específica de crescimento).

Os parâmetros citados acima são considerados formas de controle do processo que objetivam a obtenção de altas concentrações celulares de *Escherichia coli* e da formação da proteína recombinante, procurando-se desta maneira evitar o acúmulo de subprodutos inibitórios do meio de cultura, sendo o principal deles o ácido acético (GOMBERT, 1996; GOMBERT & KILIKIAN, 1997).

## 2.6 – Antígenos da *Leishmania visceral*

A *Leishmania visceral* (LV) é uma doença parasitária causada por protozoário, fatal na ausência de tratamento. Embora o tratamento com drogas exista para *Leishmania visceral*, alternativas para o controle dessa doença (controle do vetor, imunoterapêutica, quimioterapêutica e vacinas) são ainda necessárias. Estudos imunológicos de mecanismos de patogênese bem como estudos imunoterapêuticos da *Leishmaniose visceral* indicam mecanismos sítios específicos no tecido (para baço, fígado e nódulos linfáticos). Conseqüentemente, uma das mudanças no desenvolvimento de vacinas contra LV é a indução de proteção de sítios múltiplos e distintos nos tecidos (BEVILACQUA *et al.*, 2000).

LeIF, um gene da espécie de *Leishmania* com homologia para proteína ribossomal eucariótica eIFF4A, (43 kDa), é um potente estimulador da produção de interferon gama (INF –  $\gamma$ ) pelos linfócitos dos nódulos linfáticos (MARTINS *et al.*, 2006). Uma vacina contendo coquetel de LeIF entre outros fatores de transcrição induz proteção em modelos humanos e modelos não humanos contra *Leishmaniose cutânea*.

O LACK (*Leishmania* análogo dos receptores ativados por proteína quinase C), (36kDa) é altamente conservado entre espécies de *Leishmania* e expresso por ambas formas do parasita promastigota e amastigota. Estudos indicam que o código do DNA para o antígeno promove proteção contra *Leishmania major*. Entretanto, a vacina LACK DNA, embora altamente imunogênica, falha na proteção contra LV em infecções intradermal e intravenosa, sugerindo que LACK não pode ser usado como antígeno para uma vacina baseada em DNA contra *Leishmaniose* (KUBAR & FRAGAKI, 2006). Por outro lado, é possível aperfeiçoar testes de diagnósticos podendo produzir uma mistura de antígenos para induzir ou detectar uma resposta imune, uma vez que algumas pessoas quando expostas a antígenos podem ser assintomáticas (MARTINS *et al.*, 2006).



---

## **Capítulo 3**

### **Estado da Arte**

---

### 3. Estado da arte

De acordo com os estudos preliminares realizados por Costa (1993) estudou a cinética de crescimento da *Escherichia coli* BL21, por meio de cultivos realizados em incubador rotativo (*shaker*) utilizando-se processos descontínuos, constatou-se um baixo rendimento da produção da proteína troponina C o qual o IPTG foi considerado como molécula indutora.

Nessa direção, Liria (1995) desenvolveu o processo descontínuo alimentado para a obtenção de elevadas concentrações celulares em relação àquelas obtidas no processo descontínuo. Além disso, estudou diferentes estratégias de indução em biorreator a fim de otimizar a produção da proteína recombinante Troponina C (TnC), utilizando a *Escherichia coli* BL21 como hospedeiro. Dentre as estratégias adequadas de indução pode-se destacar: a quantidade específica adicionada do indutor e a maneira a qual esse indutor é transferido, as quais foram consideradas as variáveis mais importantes.

O sistema de expressão utilizando o microrganismo *Escherichia coli* é o mais utilizado atualmente para a produção de proteínas recombinantes. Fazendo-se uma procura na base de dados da PubMed ([www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov)), utilizando as palavras chaves; *E.coli*, *recombinant protein expression*, foram encontrados 18247 referências (data acesso: 13/02/08).

Dando continuidade aos experimentos realizados por Liria (1995) com o IPTG, utilizando-se o mesmo microrganismo, Gombert (1996), estudou estratégias de indução na qual a lactose foi considerada como molécula indutora. Pode-se afirmar através dos seus estudos que um maior acúmulo de troponina C foi obtido em função da maior quantidade de lactose adicionada ao meio de cultivo durante a fase de indução. Além disso, concluiu-se que a adição de uma fonte rica de nutrientes complexos, como extrato de levedura exerceu um efeito positivo na expressão de proteína recombinante, por inibir a ação das proteases.

Em 1997, Gombert & Kilikian estudaram diferentes estratégias de cultivo para obtenção de alta concentração celular e produção específica da proteína troponina C (TnC), através de cultivo da *Escherichia coli* BL21. As condições de cultivo foram: temperatura mantida em 37°C, pH monitorado por um eletrodo e controlado em  $7 \pm 0.2$ , velocidade de agitação de 700 rpm e concentração de oxigênio dissolvido mantido acima de 30 % da saturação. As estratégias de cultivo estudadas foram descontínua e descontínua alimentada. Na descontínua alimentada, o meio de alimentação foi transferido ao reator através de uma bomba controlada pelo *Software* AFS. Nos casos em que era desejado promover uma vazão

exponencial de alimentação foi desenvolvida uma equação derivada do balanço de massa de glicose no reator, supondo-se que este nutriente seja limitante para o crescimento celular. Os resultados mostraram que a concentração de oxigênio dissolvido, a concentração de glicose e a velocidade específica de crescimento são considerados parâmetros importantes para a otimização do processo.

Castillo (1997) realizou ensaios preliminares conduzidos em incubador rotativo (*shaker*) a fim de averiguar a possibilidade de ampliar o tempo de cultivo do inóculo dos ensaios em biorreator diminuindo para isto, a temperatura do cultivo. No entanto, com base nos resultados obtidos, a redução da temperatura de 37 °C para 35 °C, não foi favorável à cinética de crescimento, prevalecendo a temperatura dos ensaios precedentes. Prosseguindo com a tentativa de simplificar os procedimentos de preparo do inóculo foram realizados dois ensaios em biorreator. Nesses ensaios analisou-se o impacto de variar a composição do meio de cultivo do inóculo, estudou-se a influência da elevada e baixa concentração do extrato de levedura, sobre a cinética de crescimento em biorreator. Desta forma, foi observado o efeito do extrato de levedura sobre a cinética de crescimento de *Escherichia coli* BL21 e o acúmulo do ácido acético como efeito inibidor do crescimento celular e da expressão da proteína. A partir destes ensaios, concluiu-se que ao diminuir a concentração de extrato de levedura não se afetou a cinética de crescimento celular, mas conduziu-se a um aumento na velocidade específica de acúmulo de ácido acético. Também foi observado um acúmulo do ácido acético mais pronunciado em meios de cultivo complexos com elevadas concentrações de extrato de levedura na composição do meio do cultivo.

Gombert & Kilikian (1998) investigaram o efeito de estratégias de indução durante cultivo de *Escherichia coli* BL21(DE3) *plysS* a fim de aumentar a produção da proteína troponina C (TnC) utilizando lactose como molécula indutora. Duas variáveis devem ser consideradas como as mais importantes no desenvolvimento das estratégias adequadas de indução: a quantidade específica de lactose adicionada e a maneira na qual esse indutor é transferido para o reator na forma de pulsos e o intervalo entre dois pulsos consecutivos. Levando-se em consideração os resultados apresentados, parece que a concentração residual de lactose e a adição do extrato de levedura junto com o segundo e terceiro pulsos de lactose exercem um efeito positivo na expressão de proteína recombinante. Os ensaios foram realizados em três fases: primeira fase descontínua, segunda fase descontínua alimentada e terceira fase de indução, caracterizada por três pulsos de lactose, adicionando extrato de levedura no segundo e terceiro pulsos de lactose. A introdução de uma fonte rica em

nutrientes (extrato de levedura) foi considerada uma tentativa bastante eficaz na produção da Troponina C (TnC). Portanto, os resultados apresentados nesse estudo comprovam que a lactose pode ser usada como indutor, com a já ressaltada vantagem em relação ao IPTG de ser mais barata, menos tóxica, além de indutor pode atuar como fonte de carbono e energia.

Skeiky *et al.* (1998) estudaram a expressão da proteína recombinante eIF da *Leishmania major* com massa molecular de aproximadamente 43 kDa. Os autores sugerem o uso dessa proteína como um comprovante de uma estratégia imunoterapêutica para *Leishmaniose*.

Panda *et al.* (1999) objetivando maximizar a produtividade do hormônio de crescimento ovino (r-oGH) em *Escherichia coli* M15 utilizaram processos descontínuos e descontínuos alimentados sob indução de IPTG. O instante de indução foi considerado um parâmetro muito discutido na literatura por exercer forte influência nos níveis específicos de proteínas de interesse. A fase exponencial foi considerado o instante de indução adequado por obter uma elevada concentração celular e produtividade do hormônio de crescimento ovino (r-OGH). Independente do instante de indução, a expressão do hormônio de crescimento ovino durante o processo descontínuo caracterizou-se pela queda da velocidade máxima específica de crescimento ( $\mu_x$ ) e durante o processo descontínuo-alimentado caracterizou-se pela adição do extrato de levedura. A adição desse nutriente de composição complexa colaborou para manter alto o rendimento específico de proteína pela célula.

Em termos de processo, a produção de proteínas depende tanto da obtenção de altas concentrações celulares no reator quanto de altos níveis de expressão da proteína de interesse. Nessa direção, Rossi (2001) cultivou o microrganismo *Escherichia coli* RR1, contendo o vetor que carrega o gene estrutural para a síntese do hormônio de crescimento humano (hGH), também conhecido como somatotropina durante os processos descontínuo e descontínuo-alimentado. A concentração da fonte de carbono, ou de outros nutrientes necessários, foi controlada empregando diferentes estratégias de cultivo, de modo a limitar sua concentração através do controle da velocidade específica ( $\mu$ ) e minimizar a produção de certos produtos de fermentação, como o acetato.

A bactéria *Escherichia coli* possui algumas limitações em seu sistema de expressão incluindo a incapacidade de realizar modificações pós-transducional, comum em eucariotos e a ausência de um sistema de secreção para uma eficiente liberação da proteína recombinante para o meio de cultura. Apesar de todo o conhecimento acumulado desse microrganismo, isso não garante um sistema de expressão eficiente para todas as proteínas recombinantes. Cada

proteína apresenta um novo problema e um alto nível de síntese tem sido otimizado em cada caso através de variações empíricas dos diferentes parâmetros. Dessa forma, dentre as variáveis analisadas por Menzela, Ceccarelli, Gramajo (2003) destacaram-se: a transferência de oxigênio, o controle do pH e a utilização da lactose como indutor em substituição ao IPTG, com o objetivo de otimizar e avaliar a estabilidade do plasmídeo pET101/Jaburetox-2 em *Escherichia coli* BL21. Pôde-se constatar que as variáveis estudadas influenciaram de maneira positiva na expressão da proteína recombinante Jaburetox-2Ec. Estas proteínas foram produzidas na forma insolúvel, biologicamente inativadas em corpos de inclusão, sendo que a atividade biológica pode ser reconstituída através de complexos processos adicionais que aumentam os custos e diminuem a produtividade.

Oliveira *et al.* (2006) estudaram a expressão da proteína recombinante NDK (nucleosídeo difosfato quinase) da *Leishmania major* em *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS e a purificação por cromatografia de afinidade utilizando a resina Ni-NTA. A expressão da proteína foi induzida pela adição do IPTG e após 5 horas de indução foi feita a análise eletroforética comprovando a presença de uma banda nítida da proteína recombinante NDK da *Leishmania major*.

A composição do meio de cultivo, temperatura, pH e a presença da lactose como molécula indutora foram os parâmetros estudados por Ma *et al.* (2006) a fim de propor métodos alternativos para maximizar o rendimento da proteína recombinante enterotoxina subunidades B termosensível (GST-rHLT-B). A elevada complexidade do meio de cultivo TB contribuiu para um elevado crescimento celular e nível de expressão da proteína através das análises da densidade ótica e SDS-PAGE. A elevação da temperatura de cultivo, em alguns casos, pode ter um efeito negativo na solubilidade e estabilidade da proteína. O pH alcalino foi considerado o mais apropriado por neutralizar os ácidos gerados pelo metabolismo da *Escherichia coli* e a lactose foi considerada o indutor mais apropriado para a expressão de proteínas recombinantes.



---

**Capítulo 4**  
**Metodología experimental**

---

## 4. Metodologia experimental

### 4.1 – Microrganismos

No presente trabalho utilizaram-se dois diferentes clones (eIF e LACK), cedidos pela Profa. Dra. Selma Maria Bezerra Jerônimo, do Laboratório de Imunogenética/UFRN. Os genes que codificam os antígenos eIF, LACK foram clonados no vetor de expressão pQE-40 (THE QIA EXPRESSIONIST, 2003).

#### 4.1.1 – Manutenção dos Clones

A manutenção dos clones foi realizada em meio Luria-Bertani (LB) modificado (Losen *et al.*, 2004), suplementado com antibióticos (100µg/ml Ampicilina e 25µg/ml Kanamicina) e armazenados em freezer (-80°C). O meio Luria Bertani (LB), meio complexo composto de (por litro): 10 g de Triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de Cloreto de Sódio, 20 g de Ágar. Anteriormente ao armazenamento, os dois diferentes clones (eIF, LACK) foram ativados utilizando-se meio LB em incubador rotativo, sob agitação e temperatura controladas (150 rpm e 37°C). Após verificado um ótimo crescimento microbiano (em aproximadamente 16 horas), os clones foram distribuídos em duplicatas em microtubos (*eppendorfs*) no interior da câmara de fluxo laminar. Adicionaram-se 200µL do clone em 200 µL de glicerol 100% a fim de evitar a formação de cristais de gelo, conseqüentemente, o rompimento celular. Todos os tubos foram posteriormente armazenados em freezer a -80°C.

#### 4.1.2 – Meios de cultivos utilizados nos ensaios em incubador rotativo

Todos os meios de cultivo abaixo descritos foram preparados com água destilada e esterilizados em autoclave a 120°C, durante 20 minutos, enquanto que as soluções de antibióticos e IPTG foram esterilizadas por filtração em membrana de 0,22 µm em condições de assepsia. Após esterilização, estas soluções foram armazenadas a -20°C.



#### 4.1.2.1 – Meio 2xTY

Por litro: 16g Triptona, 10g Extrato de levedura, 5g NaCl, pH ajustado a 7,0 (Ma *et al*, 2006).

#### 4.1.2.2 – Meio TB (Terrific Broth )

Por litro: 12g Triptona, 24g Extrato de levedura, 4mL de Glicerol, 2,31g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12,54g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH ajustado a 7,0 (SAMBROCK, FRITSCH, MANATIS, 1989).

### 4.2 – Preparo do Inóculo

Com o auxílio de uma alça de platina os diferentes clones (eIF, LACK) foram transferidos para 50mL dos meios 2xTY e TB previamente esterilizados em frascos de Erlenmeyer de 250mL e suplementados com antibióticos. Estes frascos foram levados ao incubador rotativo (37°C, 200 rpm) por 12 horas. Esta suspensão constituiu o inóculo nos ensaios realizados.

### 4.3 – Condições dos Cultivos

Os ensaios foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer com capacidade de 250mL e inoculados com uma taxa de inóculo de 10% v/v. Os ensaios foram conduzidos em incubador rotativo com agitação de 200 rpm, temperatura de 37°C e pH inicial ajustado em 7,0.

Em intervalos de 2 horas, amostras foram retiradas para a determinação da concentração celular, concentração de substrato, quantificação das proteínas intra e extracelular e avaliação da expressão da proteína de interesse por eletroforese (LAEMMLI, 1970).

Na primeira etapa foi realizado o acompanhamento do crescimento celular dos clones recombinantes (eIF, LACK) em dois diferentes meios de cultivo (2xTY, TB) suplementados por antibióticos, sem indução. Após o conhecimento da cinética de crescimento dos clones, foi realizada a indução por IPTG. Nessa etapa, o procedimento de indução foi realizado através da adição de IPTG nos meios de cultivo (2xTY, TB) a fim de definir a influência da composição dos meios de cultivo testados na expressão dos antígenos (eIF, LACK) da *Leishmania chagasi*.

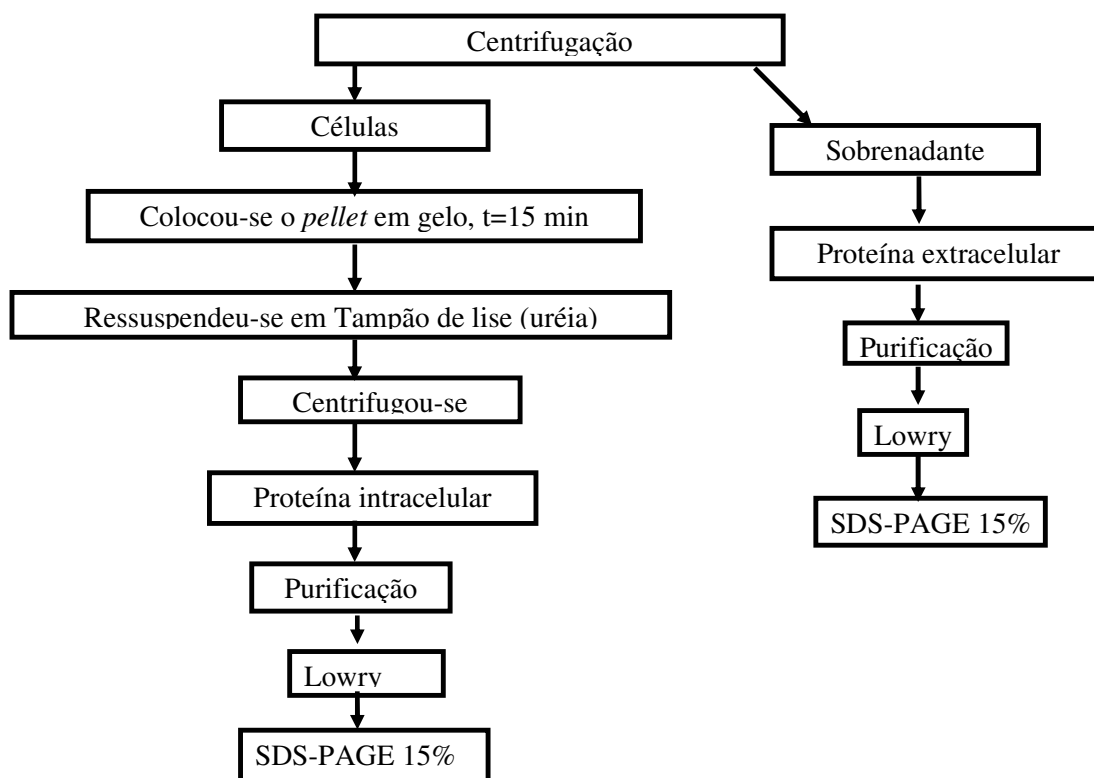
#### 4.4 – Procedimento de Indução

A expressão da proteína recombinante deste trabalho foi induzida pela adição do indutor IPTG (isopropil- $\beta$ -tiogalactosídeo) na concentração de 1mM ao meio de cultivo, sendo o instante de indução na fase exponencial de crescimento microbiano quando atingia-se a densidade ótica ( $DO_{590nm}$  entre 0,4 -0,5). Este procedimento foi realizado para todos os ensaios em que se realizou a indução. O indutor (IPTG) era dissolvido em água deionizada de modo a se obter uma solução de concentração igual a 100 mg/mL. Esta solução era esterilizada por filtração através de membrana 0,22  $\mu$ m e estocada em congelador.

#### 4.5 – Métodos de Análises

Durante os ensaios em incubador rotativo e a cada intervalo de 2 horas, um Erlenmeyer era tomado a fim de serem realizadas as análises para determinação da concentração celular (X), da concentração do substrato pelo Método TOC (carbono orgânico total) (APHA, 1988), da concentração de proteína intra e extracelular pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951), bem como para a avaliação da expressão da proteína de interesse por eletroforese (LAEMMLI, 1970).

O Fluxograma da Figura 4.5.1 apresenta as rotinas de tratamento analítico das amostras retiradas periodicamente do incubador rotativo (*shaker*) durante o cultivo dos ensaios realizados.



**Figura 4.5.1. Fluxograma do procedimento analítico.**

\*Foi realizada a eletroforese somente nas amostras de maior concentração da proteína podendo estar presente no material lisado ou no sobrenadante.

#### 4.5.2 – Determinação da concentração celular (X)

O método usado para quantificar a concentração celular foi o de massa seca. Foram coletadas amostras do meio de fermentação a certo intervalo de tempo e filtradas à vácuo em membranas 0,22  $\mu\text{m}$ , previamente taradas. As células retidas nas membranas eram secadas em estufa Nova Técnica (Modelo MPS11) a 80°C por 24 h e posteriormente pesadas.

#### 4.5.3 – Determinação da concentração de substrato (TOC)

A metodologia do TOC (*Total Organic Carbon*), consiste na verificação da quantidade de carbono orgânico total, através da diferença entre carbono total (CT) da amostra e carbono inorgânico (CI) (APHA, 1988). As determinações de carbono orgânico total foram feitas em analisador de carbono TOC 5000A (Shimadzu). A concentração de CT e CI eram obtidas por interpolação utilizando curvas analíticas (área do pico x concentração) feitas previamente por

injeção de padrões. As curvas padrão foram de 500 ppm e 1000 ppm para o carbono total e 50ppm e 100ppm para o carbono inorgânico. As amostras eram diluídas, caso a concentração fosse superior aos valores da curva padrão.

#### 4.5.4 – Purificação da proteína recombinante por adsorção em batelada

A sequencia de nucleotídeos codificante da proteína de interesse foi inserido no vetor (pQE-40)-(Qiagen, 2003). A proteína recombinante obtida apresenta-se fusionada a uma cauda de histidina que possui afinidade por íons níquel. Desta forma, procedia-se uma purificação por cromatografia de afinidade utilizando a resina Níquel Sepharose 6 Fast Flow (GE Helthcare). Os aminoácidos da cauda de histidina, presentes na proteína recombinante, possuem afinidade com íons de níquel da resina, permitindo assim, a ligação entre a proteína e a resina. Como está ilustrado na Figura 3, as proteínas que não apresentam a cauda de histidina são removidas nos processos de lavagens e as que possuem cauda de histidina são eluídas da resina pelo imidazol (THE QIA EXPRESSIONIST, 2003).

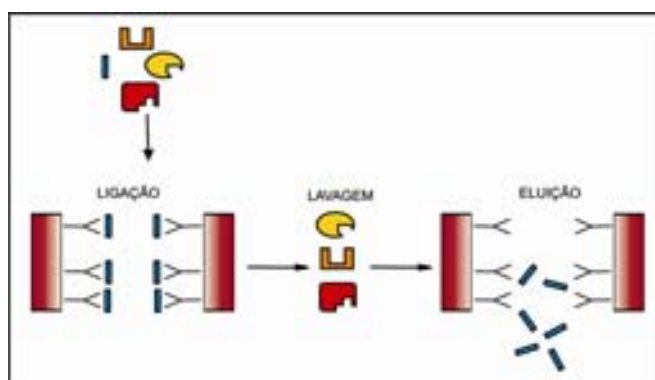


Figura 3. Esquema geral do princípio de cromatografia de afinidade.

Para proceder ao processo de purificação, 5 ml de amostra foram primeiramente centrifugados durante 30 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante e as células foram separados e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior purificação. Para a purificação das proteínas extracelulares, as amostras foram diretamente usadas, de acordo com o processo descrito a seguir. No entanto, para a purificação das proteínas intracelulares, estas foram primeiramente lisadas com tampão de lise (Anexo I), contendo 8M de uréia para liberação também de corpos de inclusão (THE QIA EXPRESSIONIST, 2003). Durante o processo de lise, as células foram colocadas em banho de gelo por 15 minutos, em seguida, foram ressuspensas em tampão de

lise e homogeneizadas de 15-60 minutos, até o meio tornar-se translúcido, indicando a finalização da lise. O lisado celular foi centrifugado a 10,000xg por 30 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi usado, então, para o processo de purificação da proteína de interesse.

#### **4.5.4.1 – Preparação da resina**

Cerca de 1 mL de resina ressuspensa no meio por agitação suave foi transferida para microtubos (*eppendorf*). Em seguida foi submetida a centrifugação a 13000xg por 15 minutos (Centrífuga Eppendorf Modelo 5415D, Alemanha), na qual o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, adicionou-se água deionizada seguida de agitação até ressuspender o sedimentado (sem uso de agitador magnético) por 5 minutos. Sedimentada a resina por centrifugação a 13000xg/5 minutos, repetia-se quatro vezes a etapa de lavagem da resina com o objetivo de remover todo o álcool etílico, no qual ela estava armazenada. Cuidadosamente, o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, a resina foi ressuspensa em tampão de ligação a fim de equilibrá-la.

#### **4.5.4.2 – Ligação da amostra**

Aproximadamente 0,5 mL de amostra em 0,5 mL de tampão de ligação foram colocados em contato com a resina, previamente equilibrada, em microtubos (*eppendorf*) de 2mL, para na seqüência incubar-se sob agitação suave por 30 minutos à temperatura ambiente. Centrifugava-se a 13000 xg/ 5 minutos e retirava-se o sobrenadante. O *pellet* (resina + proteína) era usado para as próximas etapas de purificação.

#### **4.5.4.3 – Lavagem da resina**

Após ligação, a resina foi ressuspensa em 1 mL tampão de ligação (Anexo I) e homogeneizada, suavemente, por 5 minutos. Centrifugava-se a resina a 13000xg/ 5 minutos. O processo foi repetido 4 vezes .

#### 4.5.4.4 – Eluição

Após a lavagem, foi adicionado 1 mL de tampão de eluição (Anexo I) e homogenizado suavemente por 5 minutos. A resina foi sedimentada por centrifugação 13000xg/ 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e o processo repetido 4 vezes a fim de haver completa dessorção. Os sobrenadantes foram utilizados para análise quantitativa (LOWRY *et al.*, 1951) e qualitativa (SDS-PAGE 15%) da proteína recombinante.

#### 4.6 – Determinação quantitativa da proteína

A quantificação da proteína intra e extracelular foi realizada pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951) (Vide no Anexo II).

#### 4.7 – Eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes (SDS-PAGE)

Posteriormente, à quantificação da concentração de proteína (intra e extracelular) pelo método de lowry (Lowry *et al.*, 1951), a eficácia da indução foi confirmada através da avaliação da expressão da proteína de interesse por eletroforese, conforme descrito por (LAEMMLI, 1970).

As amostras antes de serem aplicadas no gel concentrador foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 12 mmol/L (pH=6,8), glicerol 25%, SDS 0,4%, 2-mercaptoetanol 2 mmol/L e azul de bromofenol 0,02%) na presença de agentes desnaturantes (SDS) e redutores ( $\beta$ -mercaptoetanol) que quebram as ligações dissulfeto. Dessa forma, todos os complexos SDS-polipeptídeo possuem densidade de cargas idênticas e migram em géis de poliacrilamida com porosidade adequada estritamente em função da massa molecular. Assim, as proteínas são separadas em função do seu tamanho e as amostras aplicadas no gel migram em direção ao eletrodo positivo (SILVA JUNIOR, 2001). A concentração do gel separador foi de 15% e foi preparado pela adição de 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 ), 300  $\mu$ L de SDS 10%, 150  $\mu$ L persulfato de amônio 10%, 10  $\mu$ L de TEMED e H<sub>2</sub>O destilada para um volume final de 10 mL. O gel empilhador continha 0,6 mL de solução estoque de acrilamida, 1mL de Tris-HCl 0,5 mol/L (pH=6,8), 240  $\mu$ L de SDS 10%, 75  $\mu$ L de Persulfato de amônio 10%, 4  $\mu$ L de TEMED e água destilada para um volume final de 4mL. O tampão de amostra foi 5 vezes

concentrado, para evitar flutuação das amostras. As amostras misturadas a esse tampão foram desnaturadas por aquecimento a cerca de 90° C e 5 minutos. As corridas foram realizadas a 150 V por 1 hora em tampão de corrida (Tris 25 mmol/L, Glicina 192 mmol/L e SDS 0,1%, pH= 8,3). Decorridos aproximadamente 60 minutos de corrida, desligava-se a fonte, desmontava-se o equipamento e separava-se o gel das placas, descartando-se o gel de empilhamento. O gel obtido foi revelado pelo método de nitrato de prata (BLUM, BEIER, GROSS, 1987). A Figura 4 ilustra um aparato para montagem da cuba e aplicação das amostras.

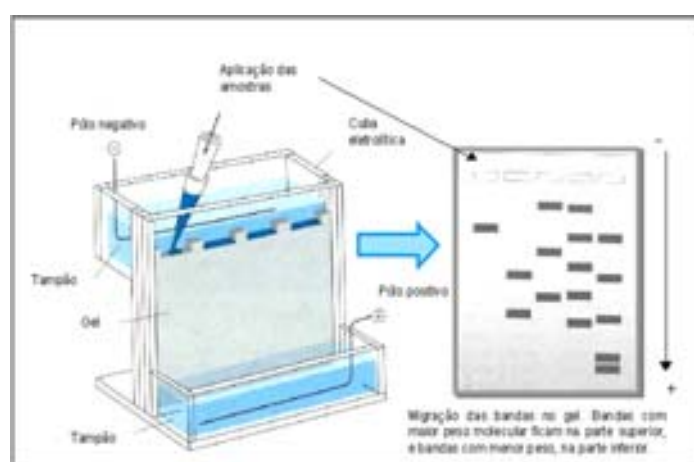


Figura 4. Representação esquemática da eletroforese.

## 4.8 – Tratamento dos resultados experimentais

### 4.8.1 – Velocidades instantâneas

As definições das velocidades instantâneas de crescimento, consumo de substrato e formação do produto são definidas pelas expressões abaixo (Schmidell *et al.*, 2001)

$$r_X = \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

$$r_S = -\frac{dS}{dt} \quad (2)$$

$$r_P = \frac{dP}{dt} \quad (3)$$

## 4.8.2 Determinação da produtividade

### 4.8.2.1 Produtividade em células (P<sub>x</sub>) e em produto (P<sub>p</sub>)

A produtividade da biomassa (P<sub>x</sub>) representa um parâmetro importante para avaliar o desempenho de um processo fermentativo (Liria, 1995). Em termos de equação representa o ganho da concentração de celular (g/L), no intervalo de tempo t-t<sub>0</sub> (h)

$$P_x = \frac{X_F - X_0}{T_F} \quad (4)$$

Onde X<sub>F</sub> = concentração celular final; X<sub>0</sub> = concentração celular inicial; T<sub>F</sub> = tempo total do cultivo.

A mesma definição pode ser aplicada à concentração do produto, denominada produtividade do produto.

$$P_p = \frac{P_F - P_0}{T_F} \quad (5)$$

Onde P<sub>F</sub> = concentração do produto final; P<sub>0</sub> = concentração do produto inicial; T<sub>F</sub> = tempo total do cultivo.

### 4.8.2.2 Velocidades específicas

Para uma boa avaliação de um processo de cultivo é necessário determinar certas variáveis, tais como, velocidade específica de crescimento (μ<sub>x</sub>), velocidade específica de consumo de substrato (μ<sub>S</sub>), velocidade específica de formação do produto (μ<sub>p</sub>). A velocidade específica de crescimento exprime a velocidade de crescimento da unidade por massa celular (x) conforme se define na equação abaixo:

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (6)$$

A velocidade específica de substrato exprime a velocidade de consumo de substrato da unidade de massa celular conforme se define na equação abaixo:



$$\mu_s = -\frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad (7)$$

A velocidade específica de síntese de proteína exprime a velocidade de síntese de proteína por unidade massa celular conforme se define na equação abaixo:

$$\mu_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (8)$$

A determinação dos valores de  $\mu_x$ ,  $\mu_s$  e  $\mu_p$ , para todos os cultivos, requer a determinação dos valores da derivada  $dx/dt$ ,  $ds/dt$  e  $dp/dt$  em função do tempo, que foram calculadas por equações da planilha, no qual os cálculos de velocidades específicas é realizado pelo método proposto por LE DUY; ZAJIC (Schmidell *et al.*, 2001).

---

## **Capítulo 5**

### **Resultados e Discussão**

---

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1 – Ensaio para a avaliação da cinética de crescimento dos dois clones eIF e LACK em duas diferentes composições de meio de cultivo.

#### 5.1.1 – Ensaio sem indução

Um primeiro conjunto de ensaios foi realizado com o objetivo de se conhecer o comportamento cinético dos dois clones recombinantes (eIF, LACK) em dois meios de cultivo com diferentes composições complexas (2xTY, TB) suplementados com antibióticos, sem adição de IPTG, para avaliar qual desses dois meios se apresenta mais favorável ao crescimento de cada cepa. Analisou-se, também, qual das duas cepas apresenta melhor comportamento cinético, em termos de crescimento, nos respectivos meios. Os ensaios foram conduzidos em incubador rotativo adotando-se uma temperatura de 37° C, frequência de agitação de 200 rpm, pH inicial 7, em Erlenmeyer com capacidade de 250mL, contendo 50 mL do respectivo meio de cultura. Na Tabela 1 são apresentadas as condições dos ensaios realizados sem indução com as respectivas condições de cultivo.

Tabela 1. Resumo das condições dos ensaios realizados em incubador rotativo sem indução com velocidade de agitação, temperatura e pH controlado respectivamente (200rpm, 37° C, 7,0).

Ensaio (Incubador Rotativo)	Meios de cultivo	Clones
S1	Meio 2xTY	eIF sem indução
S2	Meio TB	eIF sem indução
S3	Meio 2xTY	LACK sem indução
S4	Meio TB	LACK sem indução

Os perfis de concentração celular e consumo da fonte de carbono em relação ao tempo de cultivo dos ensaios S1, S2, S3 e S4 são representados nas Figuras 5 a 8.

## Ensaio S1

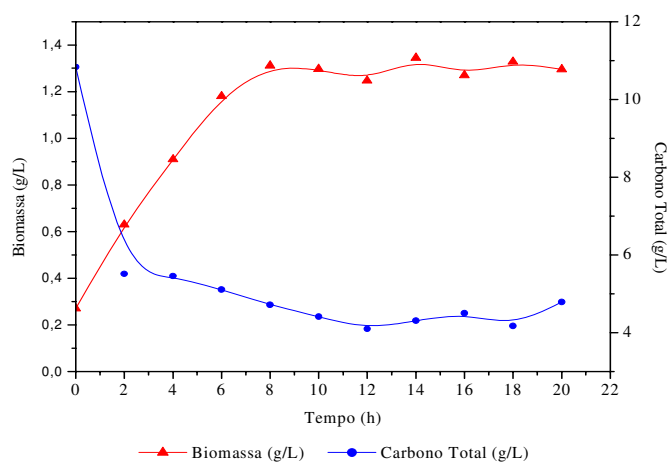


Figura 5 – Curvas de crescimento e consumo da fonte de carbono do clone eIF em meio 2xTY sem indução (Ensaio S1, Tabela 1)

## Ensaio S2

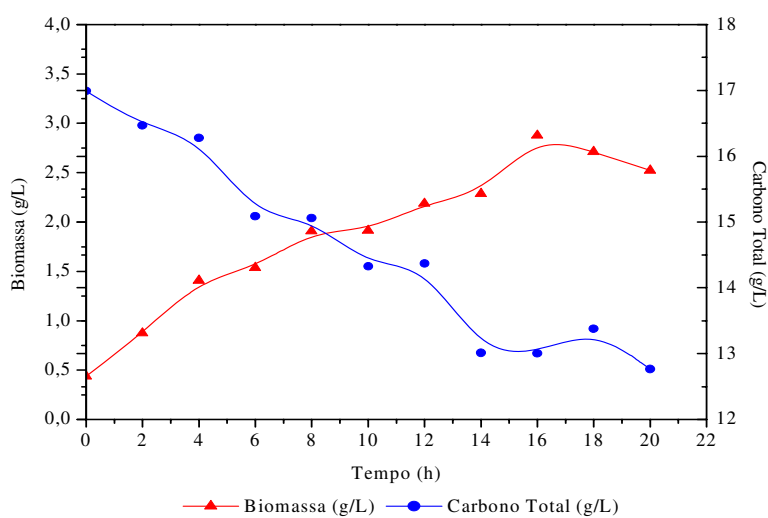


Figura 6 – Curvas de crescimento e consumo da fonte de carbono do clone eIF em meio TB sem indução (Ensaio S2, Tabela 1)

### Ensaio S3

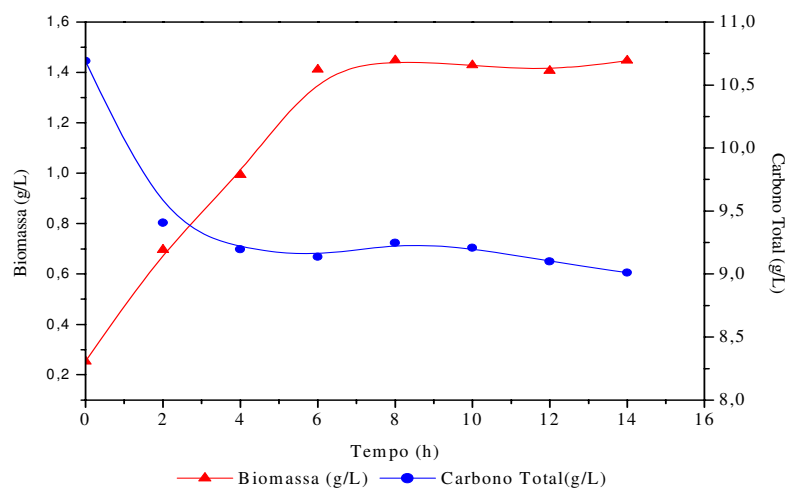


Figura 7 – Curva de crescimento e consumo da fonte de carbono do clone LACK em meio 2xTY sem indução (Ensaio S3, Tabela 1)

### Ensaio S4

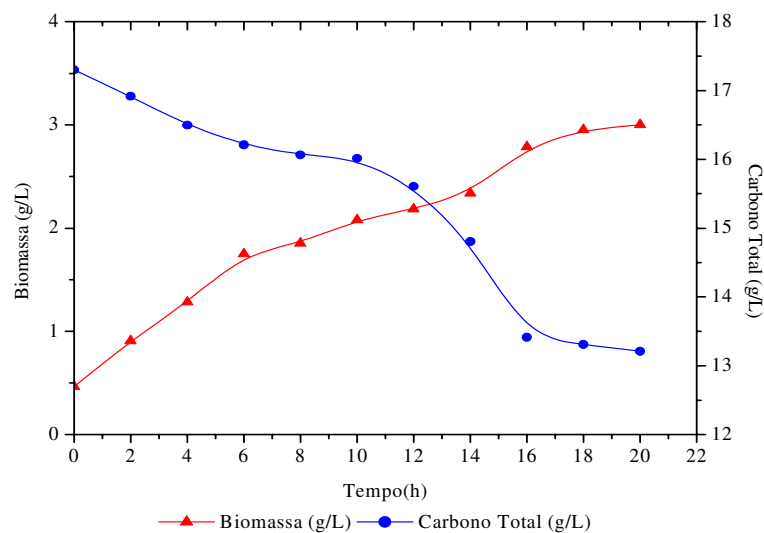


Figura 8 – Curva de crescimento e consumo da fonte de carbono do clone LACK em meio TB sem indução (Ensaio S4, Tabela 1)

Os resultados dos parâmetros cinéticos obtidos nos ensaios sem indução são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros cinéticos referentes aos ensaios sem indução.

Ensaio	$X_{m\acute{a}x}$ (g/L)	$t_{x_{m\acute{a}x}}$ (h)	Tf (h)	$S_o$ (g/L)	$S_f$ (g/L)	$(S_o - S_f)$ (g/L)	$\mu_{x_{m\acute{a}x}}$ (h <sup>-1</sup> )	$P_x$ (g/L.h)	$Y_{x/s}$ (g.g <sup>-1</sup> )
S1	1,32	18	2	10,5	4	6,5	0,157	0,1517	0,159
S2	2,62	18	14	15,5	13	2,5	0,312	0,1910	1,530
S3	1,44	14	2	10,8	9	1,8	0,177	0,1931	0,745
S4	3	18	16	17	13,5	3,5	0,164	0,2142	0,904

\*Resultados obtidos dos parâmetros  $\mu_{x_{m\acute{a}x}}$ ,  $P_x$ ,  $Y_{x/s}$  foram durante a fase exponencial de crescimento.

Observando-se as Figuras 5 a 8, nota-se a ausência de fase lag em todos os ensaios, sugerindo uma boa adaptação do metabolismo dos clones eIF e LACK nos dois meios de cultivo testados (2xTY, TB). Com relação ao consumo de substrato pelos dois diferentes clones, observa-se que tanto o eIF como o LACK apresentaram um rápido consumo do substrato nas primeiras duas horas de cultivo para o meio 2xTY, o que coincide com o início da fase exponencial de crescimento. Após as duas horas de cultivo a concentração de substrato não apresenta grandes variações de concentração, sugerindo baixo consumo de substrato até o final dos cultivos. Entretanto, o clone LACK, no meio 2xTY, apresentou um maior fator de conversão de substrato à célula  $Y_{x/s}$  (0,745 g.g<sup>-1</sup>) em relação ao clone eIF no mesmo meio (0,159 g.g<sup>-1</sup>).

Já ao adotar-se o meio TB não se observa acentuado consumo de substrato nas primeiras duas horas, mas, pelo comportamento das curvas de consumo de substrato, há indicativo de consumo de substrato até aproximadamente 16 horas de cultivo. Neste caso, o maior fator de conversão ocorreu para o clone eIF. O meio TB tem uma composição de extrato de levedura maior do que o meio 2xTY e associado a isto, o meio TB apresenta uma segunda fonte de carbono (glicerol). A composição do meio pode resultar numa menor reprodução de reposição do metabolismo celular e acarretar um consumo do substrato mais lento.

Comparando-se os quatro ensaios (S1, S2, S3, S4), foi observado que o ensaio S2 (clone eIF meio TB) apresentou maior concentração máxima ( $X_{m\acute{a}x}$ ) no valor de 2,62 g/L, fator de conversão de substrato à célula de 1,530 g.g<sup>-1</sup> e a velocidade específica máxima de crescimento  $\mu_{x_{m\acute{a}x}}$  de 0,312 h<sup>-1</sup>, parâmetros obtidos durante a fase exponencial de crescimento.

Quando comparados os parâmetros cinéticos, referentes ao clone eIF, em duas diferentes composições de meios : S1 (Meio 2xTY) e S2 (Meio TB), nota-se que a mudança de composição do meio de cultivo acarretou num incremento de 98% no valor da velocidade específica máxima de crescimento ( $0,312 \text{ h}^{-1}$ ) do ensaio S2 (clone eIF meio TB) em relação ao ensaio S1 (clone eIF meio 2xTY) com a velocidade específica máxima de crescimento ( $0,157 \text{ h}^{-1}$ ). O mesmo ocorrendo com a concentração celular final de  $2,62 \text{ g/L}$ .

Com a relação à produtividade em células ( $P_x$ ), houve um acréscimo em 26% na produtividade em células do ensaio S1 (clone eIF meio 2xTY):  $P_x$  ( $0,1517 \text{ g/l.h}$ ) em relação ao ensaio S2 (clone eIF meio TB):  $P_x$  ( $0,1910 \text{ g/l.h}$ ). Visivelmente, a presença do glicerol, nutriente particular ao meio TB, favoreceu ao metabolismo primário da célula.

Para o clone LACK, os ensaios S3 (Meio 2xTY) e S4 (Meio TB), pode-se observar que a mudança da composição do meio (Meio TB) igualmente favoreceu o crescimento celular. Em se tratando do ensaio S4 (Meio TB clone LACK), verificou-se um aumento de aproximadamente 100% na concentração celular final de ( $1,44 \text{ g/L}$ ) para ( $3 \text{ g/L}$ ), com fator de conversão de substrato a células ( $0,904 \text{ g.g}^{-1}$ ) e produtividade em células ( $0,2142 \text{ g/L.h}$ ) superior em relação ao meio 2xTY, com fator de conversão no valor de ( $0,745 \text{ g.g}^{-1}$ ) e produtividade em células ( $0,1931 \text{ g/L.h}$ ). Mais uma vez reforçando a importância do glicerol, presente no meio TB, bem como, ser considerado fonte de carbono mais facilmente assimilável, pode ter contribuído para o metabolismo primário desses clones. O meio 2xTY, caracterizado pela ausência do glicerol, provavelmente, possui menor quantidade de precursores para a síntese de macromoléculas (aminoácidos e vitaminas), assim as células têm de sintetizá-las requerendo mais energia para um determinado valor da concentração celular.

### 5.1.2 – Ensaio com indução por IPTG

O segundo conjunto de ensaios foi realizado procedendo-se uma estratégia de indução por IPTG, conforme descrito no item 4.4, a fim de verificar a influência da composição dos meios testados (2xTY e TB) na expressão dos antígenos (eIF, LACK) da *Leishmania chagasi*.

Com base em dados da literatura, os ensaios foram igualmente conduzidos em incubador rotativo (*shaker*) com velocidade de agitação, temperatura e pH controlados ( $200 \text{ rpm}$ ,  $37^\circ\text{C}$ ,  $7,0$ ). A adição do IPTG na concentração de  $1 \text{ mM}$  ao meio de cultivo aconteceu no início da fase exponencial de crescimento quando atingia-se a densidade ótica ( $\text{DO}_{590\text{nm}}$  entre  $0,4 - 0,5$ ) que ocorria em torno das duas horas de cultivo. As Tabelas 3 e 4,

respectivamente, apresentam uma descrição dos ensaios realizados com indução por IPTG e o resumo dos parâmetros cinéticos conduzidos com as respectivas condições de cultivo..

Tabela 3. Resumo das condições dos ensaios realizados com indução por IPTG conduzidos em incubador rotativo com velocidade de agitação, temperatura e pH controlados (200rpm, 37°C, 7,0).

Ensaio (Incubador Rotativo)	Meios de cultivos	Clones
S5	Meio 2xTY	eIF com indução
S6	Meio TB	eIF com indução
S7	Meio 2xTY	LACK com indução
S8	Meio TB	LACK com indução

Os perfis de concentração celular e consumo da fonte de carbono em relação ao tempo de cultivo dos ensaios S5, S6, S7 e S8 com indução por IPTG estão representados nas Figuras 9 a 12.

## Ensaio S5

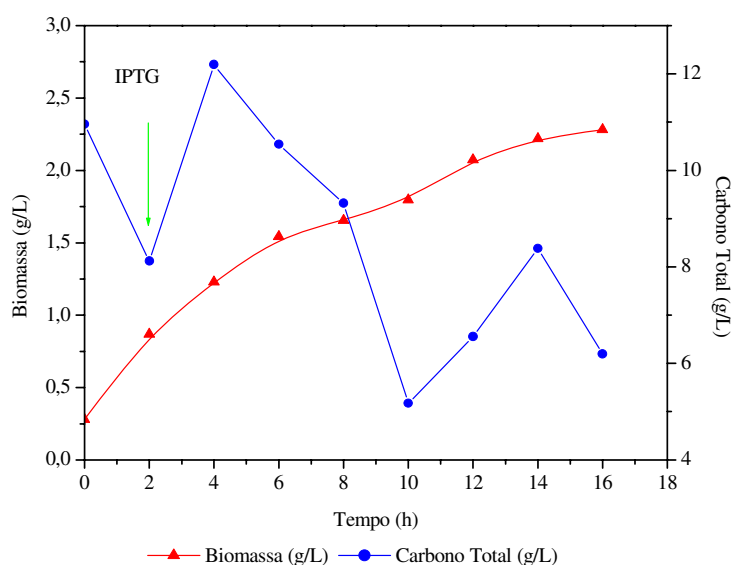


Figura 9 – Curvas de crescimento e consumo da fonte de carbono do clone eIF em meio 2xTY com indução (Ensaio S5, Tabela 3)



### Ensaio S6

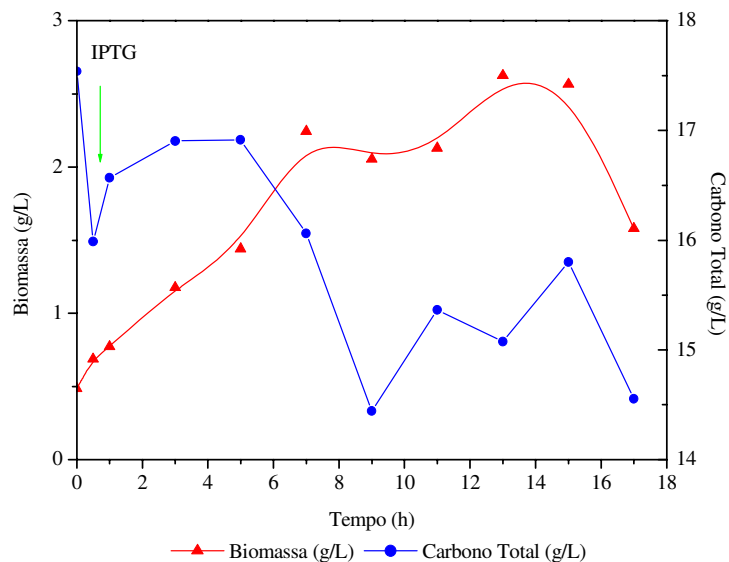


Figura 10 – Curva de crescimento e consumo da fonte de carbono do clone eIF em meio TB com indução (Ensaio S6, Tabela 3)

### Ensaio S7

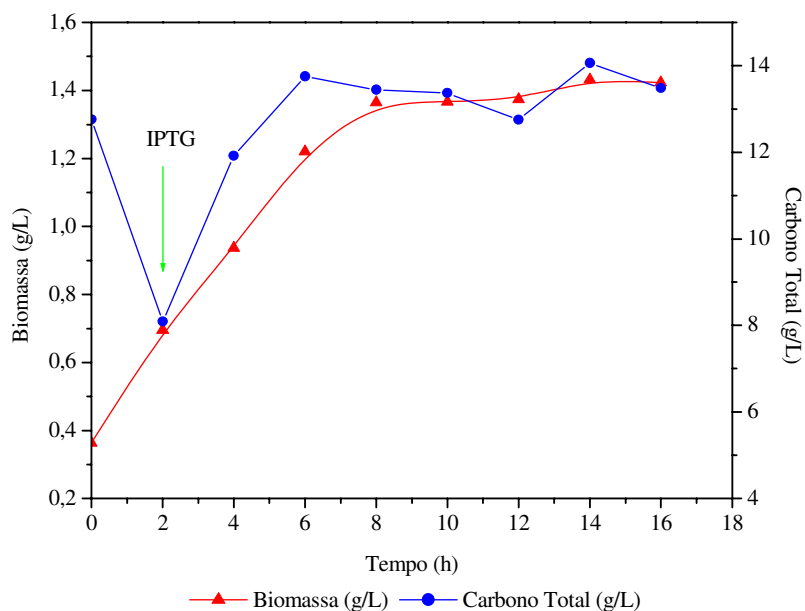


Figura 11 – Curva de crescimento e consumo da fonte de carbono do clone LACK em meio 2xtY com indução (Ensaio S7, Tabela 3)

## Ensaio S8

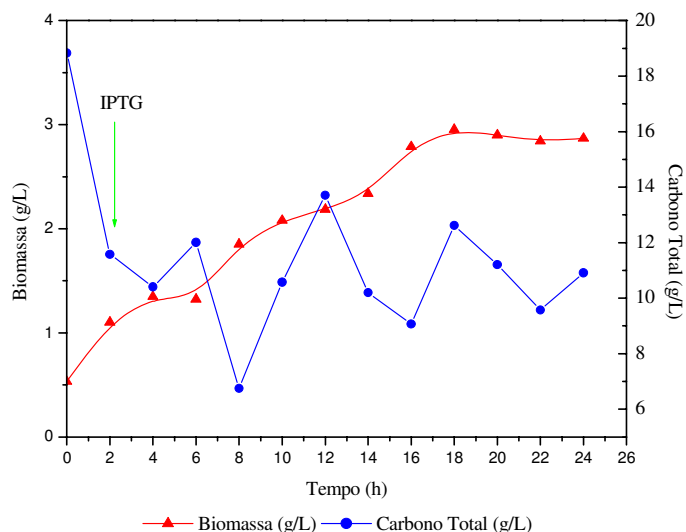


Figura 12 – Curva de crescimento e consumo da fonte de carbono do clone LACK em meio TB com indução (Ensaio S8, Tabela 3)

Tabela 4. Parâmetros cinéticos obtidos dos ensaios com indução.

Ensaios	$X_f$ (g/L)	$X$ (g/L)	$T_f$ (h)	$\mu_{xmax}$ * (h <sup>-1</sup> )	$\mu_x$ (h <sup>-1</sup> )	$[Proteína]_{Max}$ (g/L)	$\mu_p$ (g/g.h)	$t[Prot]_{Max}$ (h)	$t(\mu_{pmá})$ (h)	$P_{p/x}$ (g/g)
S5	2,28	0,868	16	0,144	0,272	0,37	0,046	6	0	0,37
S6	2,87	0,873	20	0,292	0,261	0,26	0,001	8	20	0,14
S7	1,43	0,695	16	0,141	0,206	0,58	0,330	12	0	0,42
S8	3	1,1016	18	0,0375	0,183	0,54	0,006	14	24	0,18

\* Resultados obtidos durante a fase exponencial

A avaliação do processo de produção de proteínas recombinantes permite através da consolidação da engenharia genética viabilizar a síntese de produtos complexos, que não são facilmente obtidos por processos convencionais. Dentre as moléculas recombinantes de elevado potencial de consumo podem-se destacar a produção de hormônios, antibióticos, enzimas e proteínas em geral (Rossi, 2001). Com base nos estudos realizados por Riesemberg *et al.* (1990), a composição adequada do meio de cultivo é uma das variáveis mais estudadas na obtenção de elevada concentração celular e produção de proteínas heterólogas. Por esta

razão, neste segundo grupo de ensaios estudou-se a influência da composição do meio de cultivo na expressão de antígenos recombinantes (eIF, LACK) da *Leishmania chagasi*.

De modo geral, o comportamento cinético do crescimento celular dos dois clones recombinantes (eIF, LACK) não sofreu mudanças significativas nos ensaios com indução quando comparados com os ensaios sem indução. Com relação ao consumo da fonte de carbono, os resultados analíticos dos ensaios com indução não nos permite uma discussão. Entretanto, observa-se em todos os ensaios uma elevação da concentração da fonte de carbono no momento imediatamente após a indução. Tal comportamento sugere a produção de compostos orgânicos mascarando a leitura do consumo da fonte de carbono.

Em se tratando da cinética de crescimento celular quando comparados os ensaios S5 (clone eIF em meio 2xTY) e S6 (clone eIF em meio TB), observa-se que a presença do glicerol na composição do meio TB, provocou um incremento de aproximadamente 26 % na concentração celular final (de 2,28 g/L para 2,87 g/L). Incremento bastante significativo, aproximadamente de 100 %, foi observado no valor da velocidade específica máxima de crescimento (de 0,144 h<sup>-1</sup> para 0,292 h<sup>-1</sup>). Entretanto, com relação à expressão da proteína nota-se melhores resultados no meio 2xTY. Vale salientar que no ensaio S6 (clone eIF meio TB) a velocidade específica de crescimento no instante da indução 0,261 h<sup>-1</sup> é inferior à velocidade específica de crescimento (0,272 h<sup>-1</sup>) do ensaio S5 (clone eIF meio 2xTY), o que pode ter provocado (no meio TB) uma velocidade de síntese protéica mais lenta  $\mu_p$  (0,001 g/g.h) resultando em baixa produção específica  $P_{p/x}$  (0,14 g.g<sup>-1</sup>) enquanto que para o meio 2xTY produção específica (0,37g.g<sup>-1</sup>).

A presença do glicerol na composição do meio TB melhorou a cinética de crescimento dos clones recombinantes. Entretanto, a complexidade do meio TB pode não ter favorecido a síntese de proteínas. Em suma, nota-se que o clone eIF quando cultivado no meio 2xTY apresentou melhor desempenho em termos de expressão da proteína, igualmente, verificou-se que o clone LACK também apresentou melhor desempenho no meio 2xTY.

Em se tratando do clone LACK, observou-se após indução, um decréscimo de aproximadamente 26%, no valor da velocidade específica máxima de crescimento (0,141 h<sup>-1</sup>) em relação ao meio TB (0,0375h<sup>-1</sup>), resultando num incremento de aproximadamente 7% na concentração da proteína [P] (de 0,54 g/L para 0,58 g/L) no meio 2xTY.

Riesemberg *et al.* (1990), mostraram um incremento na concentração da proteína recombinante associado ao declínio da velocidade máxima específica de crescimento após a indução.

É interessante ressaltar que uma das estratégias mais eficientes para aumentar o rendimento volumétrico de um cultivo para a produção de proteínas recombinantes é a realização da indução em momentos de elevada concentração celular, com significativos valores na velocidade específica de crescimento (Castillo, 1997). Deste modo, o conhecimento das condições fisiológicas do microrganismo é um parâmetro importante para síntese de proteína (Menzela, Ceccarelli, Gramajo, 2003).

Neste contexto, através da comparação dos ensaios S6 (Meio TB clone eIF) e S8 (Meio TB clone LACK) em relação aos demais ensaios submetidos a estratégia de indução, pode-se notar que as velocidades específicas de crescimento no instante de indução foram mais baixas, isto é,  $0,183 \text{ h}^{-1}$  e  $\mu_x 0,260 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente, resultando numa reduzida velocidade de síntese de proteína. Provavelmente, a elevada concentração de extrato de levedura na composição do meio TB, confere uma maior complexidade a esse meio, com relação ao 2xTY, acarretando em menor velocidade de síntese da proteína e conseqüentemente menor produção específica.

Pode-se notar em termos de expressão, Tabela 4, o ensaio S7 (clone LACK meio 2xTY), apresentou uma boa produção específica ( $0,42 \text{ g.g}^{-1}$ ) em menor intervalo de tempo, atingindo concentração da proteína ( $0,58 \text{ g/L}$ ) acompanhada pela queda da velocidade máxima específica de crescimento, após a adição do IPTG. Como em todo processo biológico, as mudanças não acontecem instantaneamente, o processo de indução de um produto em um microrganismo recombinante compreende a mudança gradual do metabolismo de crescimento para o metabolismo de produção de proteína. Como conseqüência, ocorre a queda do valor da velocidade máxima específica de crescimento durante a fase de indução (Yee & Blanch, 1992).

A Figura 13 abaixo, ilustra um comportamento semelhante para o perfil produtividade do produto extracelular para o clone LACK e intracelular para o clone eIF em relação a todos os ensaios realizados com indução por IPTG.

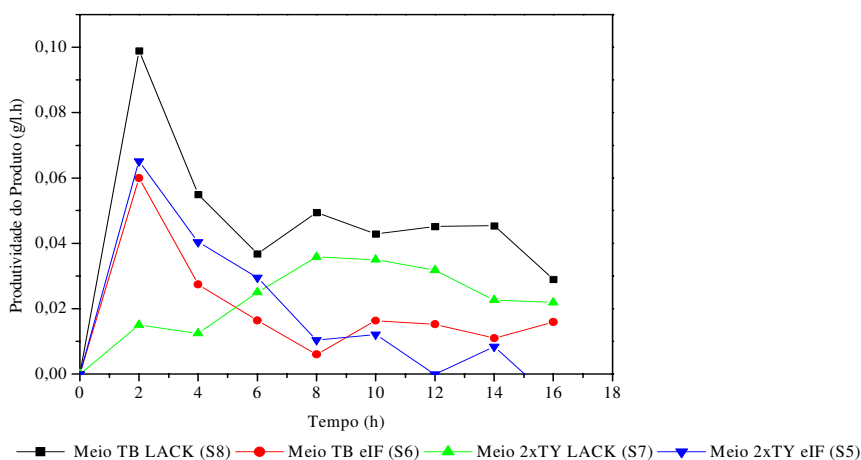


Figura 13 – Curvas da produtividade em produto dos ensaios com adição de IPTG.

Ensaio S5 (Meio 2xTY eIF), S6 (Meio TB eIF), S7 (Meio 2xTY LACK), S8 (Meio TB LACK).

Ao se considerar o parâmetro produtividade, pode-se observar que a maioria dos ensaios, exceto o ensaio S7 (Meio 2xTY LACK), atingiram maior produtividade durante 2 horas de cultivo, no instante em que foi realizada a indução. Entretanto, o ensaio S8 (Meio TB clone LACK) apresentou melhor valor de produtividade (0,1 g/L.h) em relação a todos os demais que atingiram valores de aproximadamente 0,06 g/L.h. É interessante ressaltar que o ensaio S8 (Meio TB clone LACK) foi o que apresentou melhor concentração celular no instante de indução no valor de 1,1026 g/L.

Liria (1995) trabalhando com o cultivo de *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS em processos descontínuo e descontínuo alimentado para a obtenção de elevada produção da proteína Troponina C (TnC), obteve valores de produtividade 0,7 g/L.h, fazendo indução por IPTG no instante em que a concentração celular era de 6,5 g/L.

Castillo (1997) trabalhando com o mesmo processo de Liria, realizou uma indução no instante em que a concentração celular era de 36 g/L, atingindo uma produtividade de 1,33 g/L.h.

Mais uma vez reforçando a importância do conhecimento das condições fisiológicas do microrganismo no instante de indução a fim de otimizar a produção da proteína recombinante.

Em se tratando do parâmetro produtividade em células, Figura 14, pode-se notar que no instante de 2 horas as produtividades são bem diferentes entre os clones e os meios testados, apresentando valores crescentes no instante de 2 horas (fase exponencial). Meio TB clone LACK > Meio TB clone eIF > Meio 2xTY LACK > Meio 2xTY eIF. Verificando-se a maior produtividade em células para o clone LACK meio TB (0,55 g/L. h).

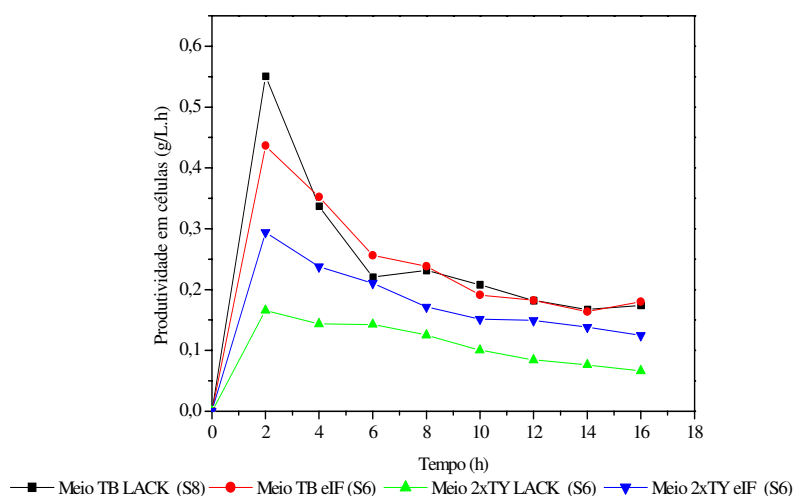


Figura 14 – Curvas da produtividade em células dos ensaios com adição de IPTG. Ensaios S5 (Meio 2xTY eIF), S6 (Meio TB eIF), S7 (Meio 2xTY LACK), S8 (Meio TB LACK).

As condições fisiológicas do microrganismo no instante de indução são fatores importantes para viabilizar a síntese de proteínas recombinante (Liria, 1995). Desta forma, a Tabela 5 apresenta parâmetros indicativos das condições fisiológicas nos ensaios realizados neste trabalho.

Tabela 5. Parâmetros cinéticos dos ensaios com indução.

Ensaios	$\mu_X$ não induzido ( $h^{-1}$ )	$\mu_X$ após indução ( $h^{-1}$ )	X inst de indução (g/L)	$P_{x\text{máx}}$ (g/L.h)	$P_{p\text{máx}}$ (g/L.h)
S5	0,157	0,144	0,868	0,2941	0,0651
S6	0,312	0,292	0,873	0,4366	0,0599
S7	0,177	0,141	0,695	0,1658	0,0357
S8	0,164	0,0375	1,1016	0,5508	0,0985

Com base nos resultados apresentados na Tabela 5 e nos perfis das curvas das produtividades, Figuras 13 e 14, pode-se observar que o ensaio S8 (Meio TB clone LACK) apresentou melhores Produtividades em células ( $P_X$ ), no valor de 0,5508 g/L.h e em Produto ( $P_p$ ) no valor de 0,0985 g/L.h. Cabe ressaltar que o ensaio S8 (Meio TB clone LACK) apresentava melhor concentração celular no instante de indução 1,1026 g/L.

Também foi verificada uma queda na velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{x\text{máx}}$ ) logo após indução para os ensaios S5 (Meio 2xTY clone eIF), S7 (Meio 2xTY clone LACK) e S8 (Meio TB clone LACK), indicando que a adição do IPTG pode ter causado uma

resposta de estresse (Tomazetto, 2006) ou também, à síntese rápida da proteína heteróloga (Castillo, 1997).

As curvas de proteínas expressas intracelular, extracelular, e proteína total (intra e extracelular) referente aos Ensaios S5, S6, S7, S8 com indução por IPTG estão apresentadas nas Figuras 15, 16, 17 e 18.

### Ensaio S5

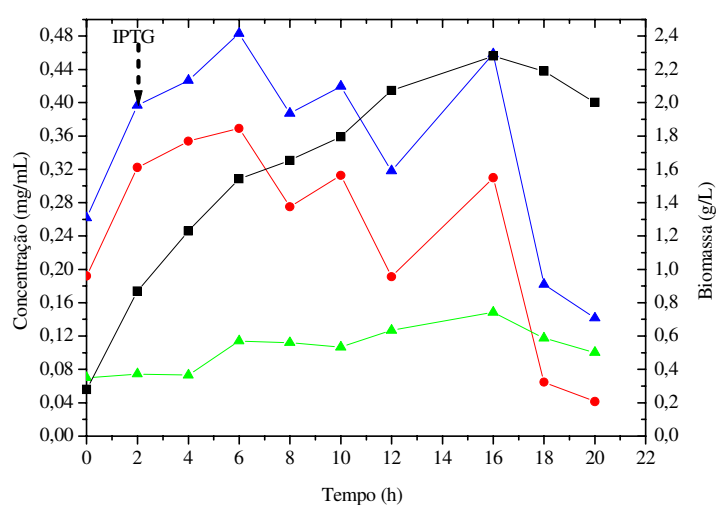


Figura 15– Curvas da expressão da proteína eIF- Meio 2xTY

(●) Intracelular, (▲) Extracelular, (▲) Proteína Total (Intra e Extracelular), (■) Biomassa

Para o ensaio S5 (Meio 2xTY clone eIF), a Figura 15, apresenta os perfis da concentração da proteína eIF intracelular, extracelular e proteína total (intra e extracelular). No cultivo em meio 2xTY, a concentração máxima atingida pela proteína eIF foi de 0,48 mg/mL de proteína total (intra e extracelular). Nota-se que a expressão da proteína eIF apresenta um comportamento associado ao crescimento, com uma expressão específica máxima ( $P_{P/x}$ ) no valor de ( $0,37 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) no instante de 6 h, correspondendo a máxima fração de proteína eIF que a célula pode acumular antes de iniciar a lise. Verifica-se que o momento de maior expressão ocorreu às 6 horas de cultivo tanto para extracelular (expressão máxima de 0,11 mg/ml) quanto para intracelular (expressão máxima de 0,37 mg/ml).

Em termos de localização da expressão (intracelular ou extracelular), pode-se observar que a célula retém a maior parte da proteína durante a fase exponencial de crescimento. Após

esta fase, ocorreu um decréscimo da proteína intracelular e uma elevação da proteína extracelular, podendo ser função da lise celular proveniente de uma saturação da proteína na célula.



## Ensaio S6

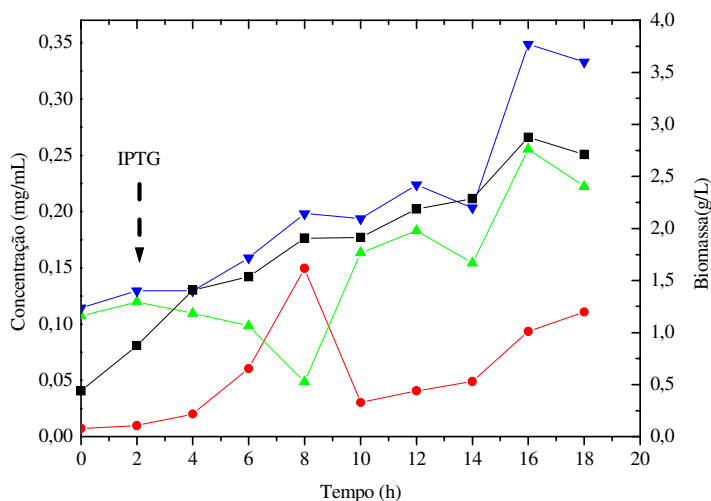


Figura 16– Curvas da expressão da proteína eIF- Meio TB

(●) Intracelular, (▲) Extracelular, (▲) Proteína Total (Intra e Extracelular), (■) Biomassa

Para o ensaio S6 (Meio TB clone eIF), a Figura 16, apresenta os perfis da concentração da proteína eIF intracelular, extracelular e proteína total (intra e extracelular). No cultivo em meio TB, a concentração máxima atingida pela proteína eIF foi de 0,35 mg/mL de proteína total (intra e extracelular). A expressão da proteína eIF apresenta comportamento associado ao crescimento, com uma expressão específica máxima ( $P_{P/x}$ ) no valor de ( $0,095 \text{ g.g}^{-1}$ ) no instante de 16 horas de cultivo. Pode-se observar que o momento de maior expressão intracelular ocorreu às 8 horas de cultivo, nesse instante, a célula retém a maior parte da proteína com uma concentração intracelular de 0,15 mg/mL. Após este instante, igualmente, ocorreu um decréscimo da proteína intracelular e uma elevação da proteína extracelular, podendo ser função da lise celular proveniente de uma saturação da proteína na célula.

## Ensaio S7

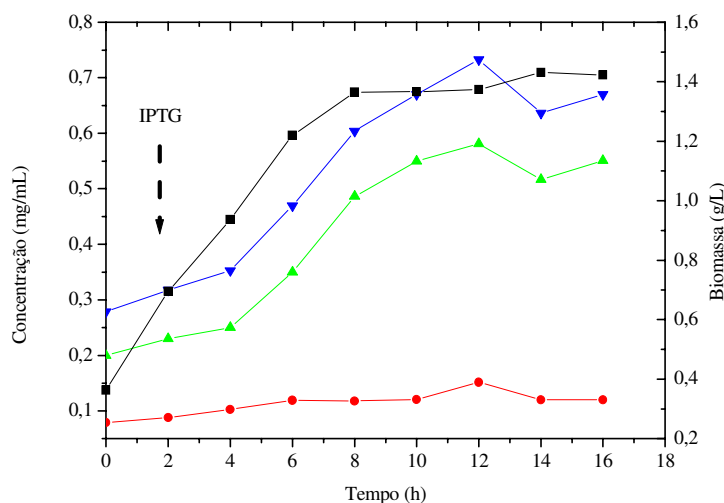


Figura 17- Curvas da expressão da proteína LACK- Meio 2xTY

(●) Intracelular, (▲) Extracelular, (▲) Proteína Total (Intra e Extracelular), (■) Biomassa

Os perfis da concentração da proteína LACK intracelular, extracelular e proteína total (intra e extracelular) em meio 2xTY (Ensaio S7) estão apresentados na Figura 17. No cultivo em meio 2xTY, a concentração máxima atingida pela proteína LACK foi de 0,7325 mg/mL da proteína total (intra e extracelular). Pode-se observar que a expressão da proteína LACK apresenta comportamento associado ao crescimento, com uma expressão específica máxima ( $P_{p/x}$ ) no valor de  $0,42 \text{ g.g}^{-1}$  no instante de 12 h, correspondendo a máxima fração de proteína que a célula pode acumular antes de iniciar a lise. O momento de maior expressão ocorreu às 12 horas de cultivo tanto para intracelular (0,15mg/mL) quanto para extracelular (0,58 mg/mL). Nota-se também, o aumento da concentração da proteína LACK extracelulares ao longo da fase após a indução. Outra vez, a lise celular, deve estar associada ao acúmulo da proteína e a ausência de um sistema de secreção para uma eficiente liberação da proteína recombinante para o meio de cultura (Tomazetto, 2006).

## Ensaio S8

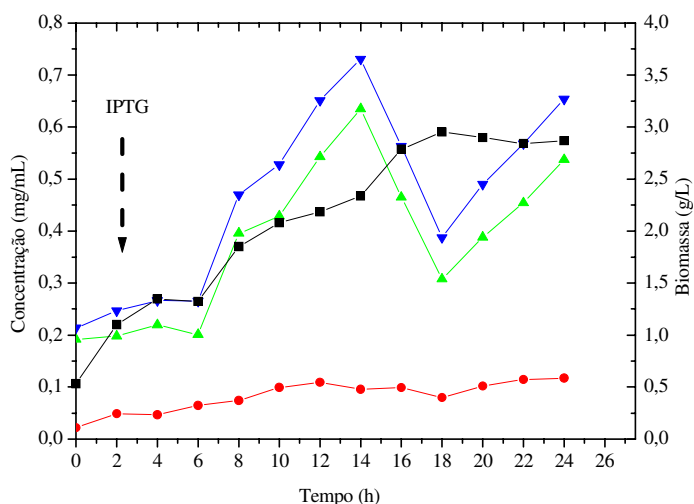


Figura 18 – Curvas da expressão da proteína LACK- Meio TB  
 (●) Intracelular, (▲) Extracelular, (▲) Proteína Total (Intra e Extracelular), (■) Biomassa

Para o ensaio S8 (Meio TB clone LACK), a Figura 18 apresenta os perfis da concentração da proteína LACK intracelular, extracelular e proteína total (intra e extracelular). No cultivo em meio TB, a concentração máxima atingida pela proteína LACK foi de 0,7307 mg/mL da proteína total (intra e extracelular). Também, pode-se verificar, que a expressão da proteína LACK apresenta comportamento associado ao crescimento, com uma expressão específica máxima no valor de  $0,18 \text{ g.g}^{-1}$  no instante de 14 h, correspondendo a máxima fração de proteína LACK que a célula pode acumular antes de iniciar a lise. O momento de maior expressão ocorreu após 14 horas de cultivo tanto para intracelular (0,095mg/mL) quanto para extracelular (0,6351 mg/mL). No tocante expressão da proteína LACK, observa-se também, o aumento da concentração da proteína extracelular ao longo da fase após a indução.

Com base nos resultados apresentados nas Tabelas 4 e 5, mais uma vez verifica-se a importância da velocidade específica de crescimento no instante de indução, parâmetro cinético importante ao se tratar do acúmulo da proteína. Em se tratando da proteína eIF, pode-se observar que o ensaio S5 (Meio 2xTY clone eIF), apresentou elevada produção específica  $P_{p/x}$  no valor de  $0,37 \text{ g.g}^{-1}$  em menor intervalo de tempo quando comparado ao ensaio S6 (Meio TB clone eIF) com produção específica de  $0,14 \text{ g.g}^{-1}$ . Em relação a proteína LACK, nota-se que o ensaio S7 (Meio 2xTY clone LACK) apresentou elevada produção específica

$P_{p/x}$  no valor de  $0,42 \text{ g.g}^{-1}$  em menor intervalo de tempo quando comparado ao ensaio S8 (Meio TB clone LACK) com produção específica de  $0,18 \text{ g.g}^{-1}$ .

Se o importante da análise de um processo de indução for a produtividade do produto, através da análise dos resultados da Tabela 5, o ensaio S8 (Meio TB clone LACK) apresentou melhor desempenho por obter produtividade superior em relação aos demais ensaios, valor de  $(0,0985 \text{ g/L.h})$ . Porém, em processos utilizando a tecnologia do DNA recombinante à produtividade não é um critério importante para definir o desempenho de um cultivo, pois nesse tipo de processo o valor agregado é altíssimo. Então, um critério a ser adotado é a concentração do produto recombinante. Deste modo, o ensaio S7 (Meio 2xTY clone LACK) apresentou o melhor desempenho por apresentar uma concentração máxima da proteína no valor de  $(0,58 \text{ g/L})$ , 7 % superior em relação ao ensaio S8 (Meio TB clone LACK) que apresenta concentração máxima de proteína  $(0,54 \text{ g/L})$ . Além disso, pode-se sugerir que a síntese em menor intervalo de tempo referente ao ensaio S7 (Meio 2xTY clone LACK) pode acarretar numa maior estabilidade na síntese protéica.

Com base nos resultados dos ensaios submetidos a estratégia de indução por IPTG, nas Figuras 19, 20, 21 e 22, pode-se observar os perfis das curvas de concentração da proteína de interesse e da velocidade específica de crescimento. Concluiu-se que a produção das proteínas recombinantes eIF e LACK estão associadas com o decréscimo da velocidade máxima específica de crescimento após a indução.

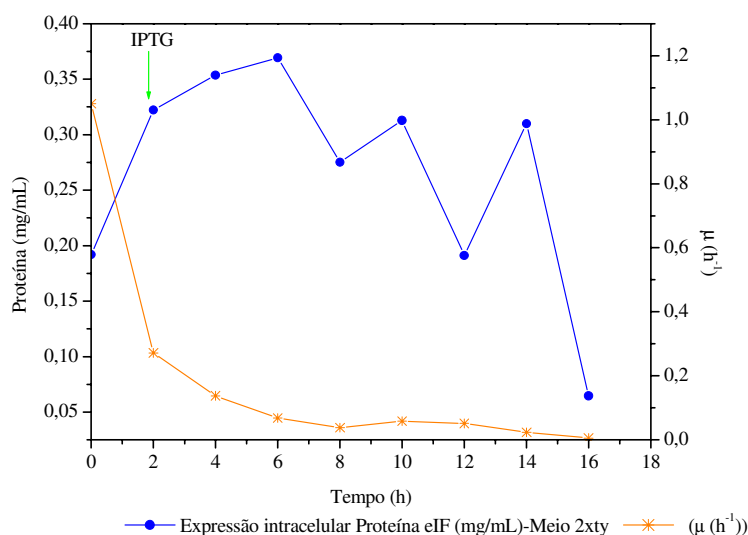


Figura 19 – Curvas da expressão intracelular da proteína recombinante eIF (mg/mL) – Meio 2xTY e da velocidade específica de crescimento  $\mu_x$  ( $\text{h}^{-1}$ ), Ensaio S5, Tabela 3.

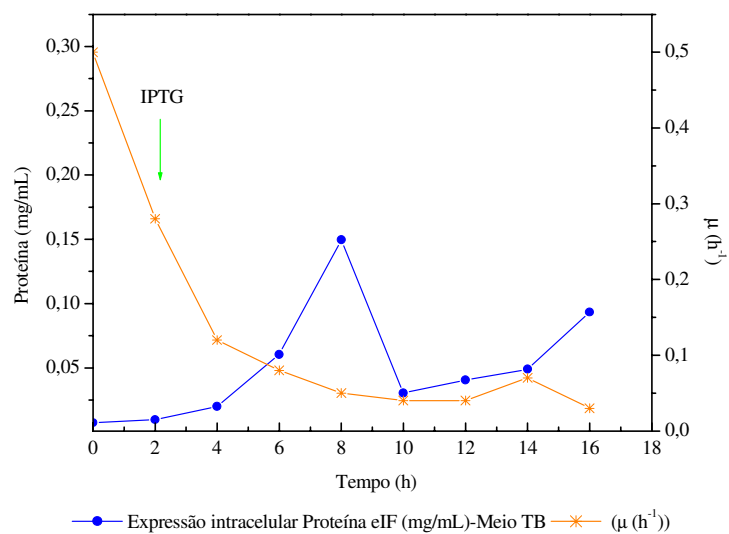


Figura 20 – Curvas da expressão intracelular da proteína recombinante eIF (mg/mL) – Meio TB e da velocidade específica de crescimento  $\mu_x$  ( $h^{-1}$ ), Ensaio S6, Tabela 3.

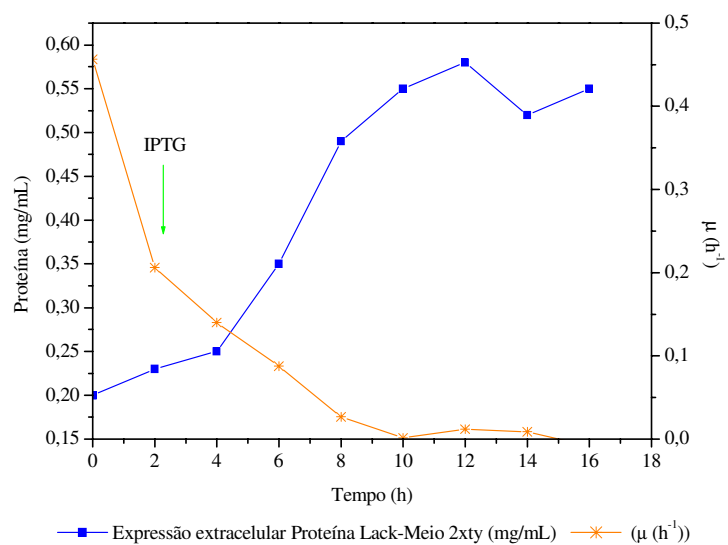


Figura 21 – Curvas da expressão extracelular da proteína recombinante LACK (mg/mL) -Meio 2xTY e da velocidade específica de crescimento  $\mu_x$  ( $h^{-1}$ ), Ensaio S7, Tabela 3.

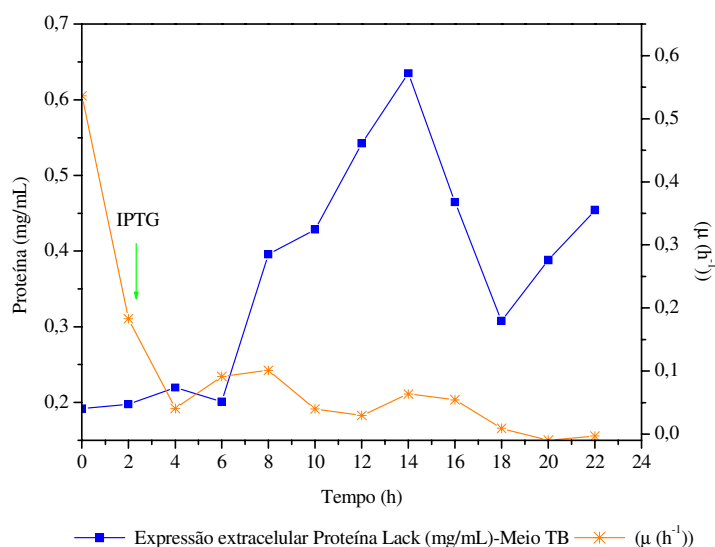


Figura 22—Curvas da expressão extracelular da proteína recombinante LACK (mg/mL) -Meio TB e da velocidade específica de crescimento  $\mu_x$  ( $h^{-1}$ ), Ensaio S8, Tabela 3.

Finalmente, pode-se supor que o processo de indução para esta *Escherichia coli* com este sistema de expressão faz com que a atividade celular mude da fase de crescimento para a produção da proteína recombinante de forma gradual. Esta mudança é bastante acentuada para o ensaio S7 (Meio 2xTY clone LACK), ilustrado pela Figura 21, Tabela 4, no qual apresentou uma queda mais acentuada no valor da velocidade máxima específica de crescimento, resultando na síntese de proteína mais rápida da velocidade de síntese no valor de  $\mu_p=0,330\text{gg}^{-1}\text{h}^{-1}$ , e maior produção específica  $P_{p/x} = 0,42\text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ , em relação a todos os ensaios com indução. Conferindo, em termos de expressão, maior estabilidade para o clone LACK no meio 2xTY. Por outro lado, comparando-se os resultados obtidos neste trabalho com os resultados obtidos por RIESENBERG *et al.* (1990) & PANDA *et al.* (1990), verifica-se que não existem grandes diferenças, pois ambos apontaram um aumento da concentração da proteína com a diminuição da velocidade máxima específica de crescimento.

### 5.3 – Verificação da expressão da proteína por eletroforese em gel de poliácridamida

Neste trabalho, a identificação da expressão da proteína de interesse foi feita por eletroforese, SDS-PAGE 15% (LAEMMLI,1970). A partir, da revelação do gel por nitrato de

prata, a determinação da massa molecular das proteínas eIF, LACK nos diferentes meios de cultivo foi determinada, conforme procedimento descrito no anexo III (BIO RAD, 2007).

Com base nos resultados dos ensaios submetidos a estratégia de indução por IPTG, pode-se observar, através da Figura 23, que a proteína eIF aparece como uma banda nítida após segunda eluição (4-8), com massa molecular de aproximadamente 62 kDa. Nesse instante, a concentração da proteína intracelular foi quantificada pelo método de Lowry *et al* (1951) com concentração de 0,37 mg/mL.

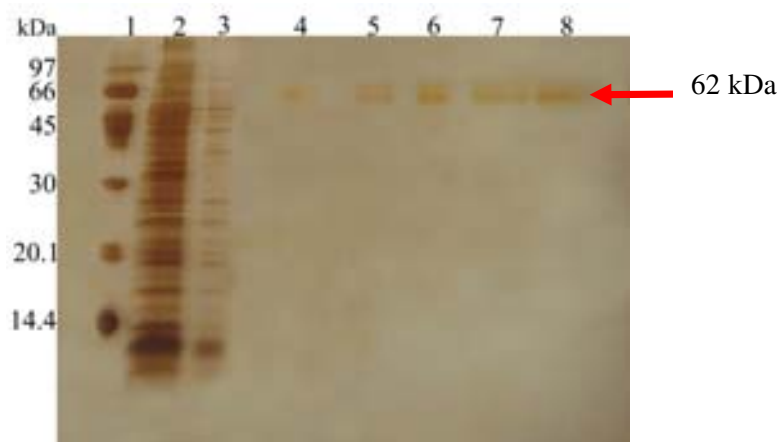


Figura 23 –Perfil Eletroforético das frações da proteína eIF em meio 2xTY obtidas durante os ensaios de indução por IPTG mostrando em (1) Marcador; (2) Extrato Bruto (proteínas totais); (3) Proteínas não ligadas a resina; (4-8) Proteína eluída após ligação com a resina (proteína de interesse); Gel revelado por Nitrato de prata. A seta indica a expressão da proteína eIF em meio 2xTY com massa molecular de aproximadamente 62 kDa.

A expressão da proteína recombinante eIF em meio TB foi confirmada através da análise em eletroforese SDS-PAGE 15%. Pode-se verificar, através da Figura 24, que a proteína eIF aparece com uma banda nítida após segunda eluição (4-8), com massa molecular de aproximadamente 72 kDa. Nesse instante, a concentração da proteína intracelular foi quantificada pelo método de Lowry *et al* (1951) com concentração de 0,15 mg/mL. massa molecular da proteína eIF no meio TB e 2xTY, foi respectivamente, 72 kDa e 62 kDa. A diferença da massa molecular da mesma proteína em meios de cultivo diferentes deve estar sendo influenciada pela composição dos meios. A proteína eIF teve um incremento em sua massa molecular no meio TB o que pode ser explicado pela presença de alguns aminoácidos em sua composição, em particular a histidina (SKEIKY *et al.* 1998). A massa molecular da proteína LACK foi de 36 kDa, no entanto, os valores obtidos da massa molecular da mesma proteína no presente trabalho, em diferentes meios de cultivo, foi respectivamente, 72 kDa e 60 kDa. Conforme, KUBAR & FRAGAKI (2006) a diferença da massa molecular quando são utilizados diferentes meios de cultivo se deve a associação da proteína de interesse a alguns componentes presentes no meio. Além disso, pode-se citar a fusão da proteína eIF a cauda de histidina e associado a isso a não realização de processamento pós-traducional pela *E. coli* (SKEIKY *et al.* 1998).



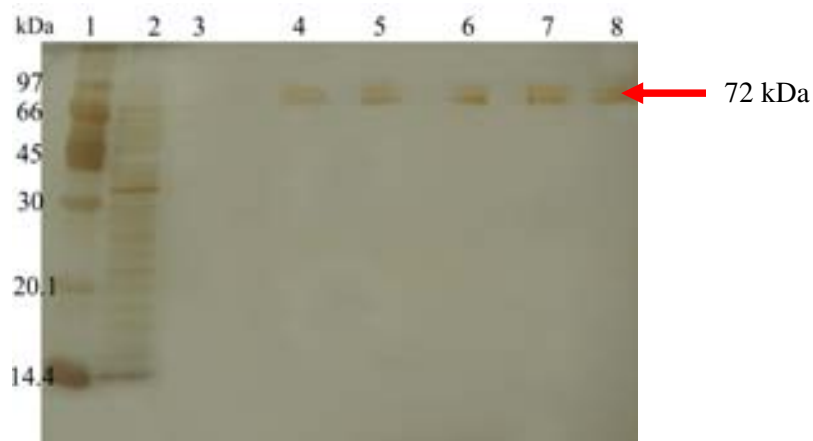


Figura 24—Perfil Eletroforético das frações da proteína eIF em meio TB obtidas durante os ensaios de indução por IPTG mostrando em (1) Marcador ; (2) Extrato Bruto (proteínas totais); (3) Proteínas não ligadas a resina; (4-8) Proteína eluída (proteína de interesse); Gel revelado por Nitrato de prata. A seta indica a expressão da proteína eIF em meio TB com massa molecular de aproximadamente 72 kDa.

Através da Figura 25, a eficácia da indução pode ser comprovada através da análise em eletroforese SDS-PAGE 15%. Nota-se que a proteína LACK aparece como uma banda nítida após segunda eluição (4-7), com massa molecular de aproximadamente 72 kDa. Nesse instante, a concentração da proteína extracelular foi de 0,5809 mg/mL.



Figura 25 –Perfil Eletroforético das frações da proteína LACK em meio 2xTY obtidas durante os ensaios de indução por IPTG mostrando em (1) Marcador ; (2) Extrato Bruto (proteínas totais); (3) Proteínas não ligadas a resina; (4-7) Proteína eluída (proteína de interesse); Gel revelado por Nitrato de prata. A seta indica a expressão da proteína LACK em meio 2xTY com massa molecular de aproximadamente 72 kDa.

A expressão da proteína recombinante LACK foi confirmada através da análise em eletroforese SDS-PAGE 15%. Pode-se observar, através da Figura 26, que a expressão da proteína LACK em meio TB não foi observada uma banda nítida pelo extrato de *Escherichia coli* sem indução (4). No entanto, a eficácia da indução da expressão da proteína LACK foi confirmada através uma banda nítida após segunda eluição (7) com massa molecular de aproximadamente 60 kDa. Nesse instante, a concentração da proteína extracelular foi de 0,63 mg/mL.

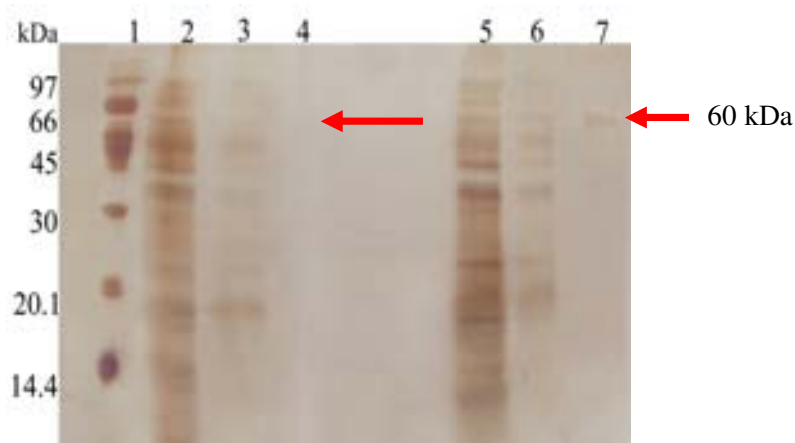


Figura 26 –Perfil Eletroforético das frações da proteína LACK em meio TB obtidas durante os ensaios sem indução e com indução por IPTG mostrando em (1) Marcador ; (2) Extrato Bruto (proteínas totais); (3) Proteínas não ligadas a resina; (4 e 7) Proteína eluída (proteína de interesse); Gel revelado por Nitrato de prata. As setas (4) e (7) indicam, respectivamente, não foi evidenciada a expressão da proteína LACK sem adição de IPTG e a eficácia da indução por IPTG, confirmando a expressão da proteína LACK em meio TB com massa molecular de aproximadamente 60 kDa.

---

## **Capítulo 6**

### **Conclusão**

---

## 6. Conclusões

- Em se tratando dos ensaios sem indução concernente aos clones eIF e LACK, quando comparados os parâmetros cinéticos de crescimento pode-se observar que a composição do meio TB foi a mais adequada para os clones supracitados.
- Em termos de consumo do substrato pelos dois diferentes clones, observa-se que tanto o eIF como o LACK apresentaram um rápido consumo do substrato nas primeiras duas horas de cultivo para o meio 2xTY nos ensaios sem indução. Já ao adotar-se o meio TB não se observa acentuado consumo de substrato nas primeiras duas horas, mas, pelo comportamento das curvas de consumo de substrato, há indicativo de consumo de substrato até aproximadamente 16 horas de cultivo. Desta maneira, o meio TB tem uma composição de extrato de levedura maior do que o meio 2xTY e, associado a isto, o meio TB apresenta uma segunda fonte de carbono (glicerol). A composição do meio pode resultar numa menor reprodução de reposta do metabolismo celular e acarretar um consumo do substrato mais lento. Além disso, pode-se verificar imediatamente após a indução com o IPTG houve uma elevação na concentração da fonte de carbono. Tal comportamento sugere a produção de compostos orgânicos mascarando a leitura do consumo da fonte de carbono em cada instante analisado após indução.
- Nos ensaios submetidos a estratégia de indução por IPTG, pode-se perceber que em termos de crescimento, os melhores resultados foram obtidos no meio TB. Entretanto, apesar da presença do glicerol como fonte de carbono e a elevada complexidade da composição do meio TB, o mesmo não favoreceu a expressão das proteínas recombinantes eIF e LACK. Desta forma, nota-se que em termos de expressão, que o meio 2xTY clone LACK, apresentou melhor desempenho com relação aos demais ensaios, atingindo uma concentração máxima da proteína no valor de 0,58 g/L.
- O conhecimento das condições fisiológicas do microrganismo é um parâmetro importante para síntese de proteína. Desta forma, a elevada concentração celular no instante de indução (1,1016 g/L) acarretou uma boa produtividade em produto (0,1 g/L.h) e em células (0,55 g/L.h) para o Meio TB clone LACK

- A produção das proteínas recombinantes eIF e LACK estão associadas ao decréscimo da velocidade específica de crescimento após indução.
  
- A expressão das proteínas eIF e LACK foram confirmadas por eletroforese, com a identificação da massa molecular. As massas moleculares da proteína eIF nos meios 2xTY e TB foram, respectivamente, 62 kDa e 72 kDa. Em se tratando proteína LACK, obteve-se massa molecular em meio 2xTY e TB, respectivamente, 72 kDa e 60 kDa.

---

## **Referências bibliográficas**

---

## Referências bibliográficas

ALBERTS, B. **Fundamentos da biologia celular**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

APHA, AWWA, WEF. **Standard methods for examination of water and wastewater**. 20 ed. Washington: American public health association, 1988.

BEVILACQUA, P. D.; et al. **Leishmaniose visceral** : história jornalística de uma epidemia em Belo Horizonte, Brasil, v.4, n.7, p.83-102, 2000.

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.

BROWN, T. A. **Clonagem gênica e análise de DNA** – uma introdução. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.

CASTILLO, I. D. S. **Cultivo de *Escherichia coli* recombinante**: desenvolvimento de estratégia para o crescimento e indução a síntese de troponina C. 1997. 171 f. *Dissertação* (Mestrado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica), – Universidade de São Paulo, USP, Departamento de Farmácia, São Paulo/SP.

CHOIN, H. J.; KEUM, K.; LEE, S. Y. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chemical Engineering Science*, v.61, p.876-885, 2006.

COSTA, J. P.C.L. **Estudo cinético do cultivo de *Escherichia coli* alterada geneticamente contendo plasmídeo para a síntese de Troponina C**. 1993. 162 f. *Dissertação* (Mestrado) – Universidade de São Paulo, USP, Departamento de Engenharia Química, São Paulo/SP.

ETIEMME, J. **Bioquímica genética e biologia molecular**. 5. ed. Porto Alegre: Santos Comércio e Importação Ltda, 2003.

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.

JERONIMO, S. M.; DUGGAL, R. F. B.; CHENG, C.; et al. An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*, the protozoan causing *visceral leishmaniasis* in northeast Brazil. *Scand. J. Infect. Dis.*, v.36, n.6-7, p.443-449, 2004.

KILIKIAN, B. V.; GOMBERT, A. K.; ISABEL, D. S.; et al. Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction. *Process Biochemistry*, v.35, p.1019-1025, 2000.

KUBAR, J.; FRAGAKI, K. *Leishmania* proteins derived from recombinant DNA: current status and next steps. *Trends in parasitology*, v.22, n.3, p.112-116, 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.680-685, 1970.

LARENTIS, A. L.; ZARONI, L. S. K.; ALMEIDA, A. L.; et al. *Engenharia de processos recombinantes*. 2003. **Apostila, Escola piloto, Programa Engenharia Química**, Coppe, UFRJ.

LEE, P. S.; LEE, K. H. *Escherichia coli*- A Model system that benefits from and contributes to the evolution of proteomics. *Biotechnology and Bioengineering*, v.84, p.801-814, 2003.

LOSEN, M.; FROLICH, B.; POHL, M.; BUCHS, J. Effect of limitation and medium composition on *Escherichia coli* fermentation in shake-flask cultures. *Biotechnol Prog*, v.2, p.1062-1068, 2004.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUG, N. J.; FARR A. L.; et al. *Journal of Biological Chemistry*, p.193-265, 1951.

LIRIA, C. W. **Processo descontínuo alimentado no cultivo de *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS para produção de proteína recombinante troponina C**. 1995. 128 f. *Tese* (mestrado em Engenharia Química) – Universidade de São Paulo, USP, Departamento de Engenharia Química, São Paulo/ SP.

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.

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



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. *The Journal of Microbiology*, v.44, n.3, p.293-300, 2006.

MENZELA, H.G.; CECCARELLI, E.A. & GRAMAJO, H.C. Novel *Escherichia coli* strain allows efficient recombinant protein production using Lactose as inducer. *Biotechnology and Bioengineering*, v.82, p.809-817, 2003..

NEUBAUER, P. Maximizing the expression of a recombinant gene in *Escherichia coli* by manipulation of induction time using lactose as inducer. *Microbiology and Biotechnology*, v.36, p.739-744, 1992.

OLIVEIRA, A. H. C.; RUIZ, J. C.; CRUZ, A. K.; et al. Expression in *Escherichia coli* and purification of the nucleoside diphosphate kinase B from *Leishmania major*. *Protein Expression and Purification*, v.49, p.244-250, 2006.

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. *Journal of Biotechnology*, v.75, p.161-172, 1999.

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.

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.

SAMBROCK, J. FRITSCH, E. F.; MANATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2nd , 2.ed. New York, 1989.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; et al. **Biotechnologia Industrial**. Engenharia bioquímica. São Paulo: Edgar Blucher, v.2, 2001.

SCHUMANN, W.; FERREIRA, L. C. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genetics and molecular Biology*, v.27, n.3, p.442-453, 2004.

SKEIKY, Y. A. W.; KENNEDY, M.; KAUFMAN, D.; et al. LeIF: A recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12-mediated Th1 Cytokine profile, *The Journal of Immunology*, v.161, p.6171-6179, 1998.

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

SILVA, A. R.; VIANA, G. M. C.; VARONIL, C.; et al. *Leishmaniose visceral (calazar) na ilha de São Luís, Maranhão, Brasil: evolução e perspectiva*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.30, n.5, 1997.

STRYER, L. **Bioquímica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koonan, 1996.

THE QIA EXPRESSIONIST. *A handbook for high-level expression and purification of 6x His-tagged proteins*, Qiagen, 2003.

TOMAZETTO, G. **Estudo da estabilidade do plasmídeo e da expressão de Jaburetox-2Ec em *Escherichia coli* BL21 utilizando a lactose como indutor**. 2006., 72 f. *Tese* submetida ao programa de pós-graduação em Biologia celular e Molecular – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

YEE, L.; BLANCH, H. W. Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. **Bio. Technol**, v.10, p.1550-1556, 1992.

ZABRISKIE, D. W.; WARENHEIM, D. A.; POLANSKY, M. J. Effects of fermentation feeding strategies prior to induction of expression of a recombinant malaria antigen in *Escherichia coli*. **J. Ind. Microbiol**, v.2, p.87-95, 1987.

---

## **ANEXOS**

---

## ANEXO I

Tabela 1. Lista dos tampões dos tampões utilizados no procedimento de lise das células e purificação da proteína de interesse.

Tampão	Composição	Etapa
Tampão de Ligação	Fosfato de sódio 50 mM, NaCl 0,5 M, 30 mM imidazol, pH=7,4.	Purificação
Tampão de eluição	Fosfato de sódio 50 mM, NaCl 0,5 M, 500 mM imidazol, pH=7,4. 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM	Purificação
Tampão de lise	NaCl, 10 mM de imidazol, pH=8,0)	Lise
Tampão de uréia	8 M de uréia Fosfato de sódio 50 mM	Lise dos corpos de inclusão

Referência : Manual Amershan Biosciences

## ANEXO II

### Curva Padrão

O princípio desse método consiste em duas reações colorimétricas: A reação de Biureto, na qual os íons Cu interagem com as ligações peptídicas originando uma coloração azul intensa e a reação, que envolve a adição do reagente de Folin-Ciocalteu em uma mistura complexa de sais inorgânicos cuja reação com a tirosina e o triptofano resulta em uma coloração azul esverdeada intensa. A combinação dessas duas reações fornece um teste muito mais sensível do que as duas reações isoladamente

O procedimento de determinação da proteína consistiu em centrifugar uma massa conhecida da suspensão bacteriana. Após contato com a resina, o sobrenadante era diluído adequadamente com NaOH 1N, para posterior, determinação da quantidade de proteína presente no caldo. Em seguida, adicionava-se 0,5ml desta solução num tubo contendo 5ml da solução D. Agitava-se novamente por 30 segundos. Após 20 minutos adicionava-se 0,5ml do Reagente de Folin. Agitava-se novamente por 30 segundos e deixava-se repousar por 90 minutos. Este tempo foi suficiente para que a amostra desenvolvesse uma coloração roxa.

Após a leitura da absorbância a 660 nm em espectrofotômetro UV-Visível da Thermo Spectronic modelo Genesys 10uV, o valor da concentração das proteínas nas amostras foram obtidas pela interpolação numa curva padrão, utilizando-se para isto soluções de Albumina bovina (Biosystems) como padrão. No anexo II, apresenta-se a curva padrão.

Solução D

Solução A: a 2%(p/v) de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .

Solução B: 4%(p/v) de Tartarato de sódio e potássio.

Solução C: 2%(p/v) de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

Solução D: Juntava-se 2ml da solução A e 2ml da solução B num balão de 100ml, completando-se o volume com a solução C.

Reagente 2: reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma) diluído para 1N.

A partir do reagente de Folin (Merck) 2N, obteve-se uma solução 1N através da diluição com água.

Para obtenção de uma curva padrão foram utilizados padrões a partir de Albumina bovina (Biosystems) com concentrações de 20, 40, 70, 90, 140, 210 e 350 mg/mL, as quais foram relacionadas com suas respectivas absorbâncias. A curva padrão resultante foi  $y = 824,54 - 40,487x$  com coeficiente de correlação de  $R = 0,9834$ .

## ANEXO III

Procedimento de cálculo da massa molecular dos antígenos eIF e Lack (Bio Rad, 2007).

MM	Log(MM)	Rf
97	1,9867	0
66	1,8195	0,2
45	1,6532	0,4
30	1,4771	0,6
20,1	1,3031	0,8
14,4	1,1583	1

Log(MM)	Rf
1,9867	0,0097
1,8195	0,2439
1,6532	0,4024
1,4771	0,5487
1,3031	0,63
1,1583	0,756

Cálculo do Rf

$$Rf = DP/DT$$

deslocamento da Proteína/deslocamento proteína total  
gráfico

y= log MM padrão

x= Rf da proteína de interesse

Plota o gráfico e exibe a equação

**Meio 2xty eIF**

$$y = -1,1344 * 0,2361 + 2,0561$$

$$MM = 10^y$$

$$MM = 62 \text{ kDa}$$

$$X = Rf = 0,236111$$

**Meio 2xty Lack**

Log(MM)	Rf
1,9867	0,11
1,8195	0,21
1,6532	0,34
1,4771	0,47
1,3031	0,71
1,1583	0,95

Rf = 0,166667  
MM=  $10^y$   
MM= 72 kDa  
X = Rf = 0,17

**Meio TB eIF**

Rf = 0,166667  
 $y = -1,1344 * 0,166667 + 2,0561$   
MM=  $10^y$   
MM=72 kDa

**Meio TB Lack**

Rf =0,219512  
 $y = -1,1344 * 0,219512 + 2,0561$   
MM=  $10^y$   
MM=60 kDa