MURILO MARCONI DOS SANTOS

**Quantificação da Expressão gênica de
Amblyomin-X clonado em *Escherichia coli*
BL21(DE3) e correlação com sua síntese
proteica.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo

2018

MURILO MARCONI DOS SANTOS

Quantificação da expressão gênica de *Amblyomin-X* clonado em *Escherichia coli* BL21(DE3) e correlação com sua síntese proteica.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Marisa Chudzinski-Tavassi.

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponíveis na biblioteca no ICB quanto na biblioteca digital de teses e dissertações da USP (BDTD).

São Paulo

2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

dos Santos, Murilo

Quantificação da expressão gênica de Amblyomin-X
clonado em Escherichia coli BL21(DE3) e correlação
com sua síntese proteica / Murilo dos Santos;
orientadora Ana Marisa Chudzinski-Tavassi. -- São
Paulo, 2018.

102 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Biotecnologia. 2. Bioprocessos. 3. PCR. 4.
Proteínas recombinantes. I. Chudzinski-Tavassi, Ana
Marisa, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Murilo Marconi dos Santos

Titulo da Dissertação: Quantificação da expressão gênica de *Amblyomin-X* clonado em *Escherichia coli* BL21(DE3) e correlação com sua síntese proteica.

Orientador:

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-900 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 727/15 referente ao projeto intitulado: *“Otimização de PCR quantitativa em tempo real para detecção e quantificação da transcrição do cDNA da proteína antitumoral e anticoagulante (amblyomin) clonada em Escherichia coli”* sob a responsabilidade de **Murilo Marconi dos Santos**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº466 de 2012.

São Paulo, 24 de março de 2015.

PROF. DR. WOTHIAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a minha família. Ao meu pai José Roberto e minha mãe Maria Carolina pelo apoio e dedicação em todos os momentos de minha vida. A minha esposa Thais e minha filha Luana por compartilhar os momentos sublimes da vida e ao meu sogro Tito Lívio por ser um exemplo a ser seguido no caminho da caridade.

Agradeço as colegas de pós-graduação, Nathalia Marteleto, Telma Marques e Carol Mello, agradeço também ao apoio de Sérgio, Roseli, Bruna, Aline, Daniela, Rodrigo, Henrique, João. A toda a equipe de técnicos e pesquisadores do Laboratório de Biotecnologia Industrial do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo que me auxiliaram na prática dos trabalhos em bancada.

Agradeço especialmente as pesquisadoras Prof^a Dr^a Patricia Léo, Prof^a Dr^a Rosane Piccoli, Prof^a Dr^a Maria Filomena de Andrade Rodrigues e MSc Débora do Carmo Linhares pelas orientações práticas durante os trabalhos realizados.

Agradeço a Prof^a Dr^a Ana Marisa Chudzinski-Tavassi pela oportunidade oferecida para a realização deste trabalho.

Por fim agradeço a agencia Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES) pelo financiamento do projeto

“Anything found to be true of *E. coli*
must also be true of Elephants.”

(MONOD; JACOB, 1961)

RESUMO

DOS SANTOS, M.M. **QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE AMBLYOMIN-X CLONADO EM *Escherichia coli* BL21(DE3) E CORRELAÇÃO COM SUA SÍNTESE PROTEICA.** 2018. 101 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O presente projeto analisou a transcrição de *Amblyomin-X*, uma proteína com potencial terapêutico expressa em *Escherichia coli* BL21(DE3), por intermédio de um vetor de expressão plasmideal induzido por IPTG (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*). A quantificação da transcrição foi realizada utilizando a técnica de RT-qPCR absoluta. A molécula *Amblyomin-X* corresponde a um inibidor de serino protease do tipo Kunitz, que apresenta atividade antitumoral e anticoagulante. Devido a sua importância terapêutica, fez-se necessário implementar um protocolo de escalonamento de produção, utilizando biorreatores. A informação sobre transcrição pode ajudar a interpretar o funcionamento do microrganismo durante os cultivos em frascos agitados e biorreatores, auxiliando na obtenção de protocolos de cultivo. A partir do momento da indução do gene *Amblyomin-X*, a bactéria *Escherichia coli* recombinante direciona grande parte de seu metabolismo para a expressão e produção dessa proteína, que é expressa em forma de corpos de inclusão insolúveis. As proteínas em forma de corpos de inclusão insolúveis permitem uma fácil extração do produto, porém, dificulta na quantificação por técnicas cromatográficas, por esse motivo, buscou-se também uma correlação entre a transcrição e a síntese proteica de *Amblyomin-X*, com o objetivo de validar a quantificação por RT-qPCR como uma forma indireta de quantificação desse tipo de produto proteico. Poucos estudos abordam a correlação existente entre a transcrição e a síntese proteica de um gene e sua proteína, e essa comparação poderia, também, revelar aspectos importantes entre a transcrição e a tradução de proteínas heterólogas em microrganismo. Foram realizados experimentos em frascos agitados em duas diferentes temperaturas indução (37°C e 30°C), com a concentração do indutor IPTG de 1 mM e concentração da biomassa (X) de 0,2 g/L. Para os experimentos em biorreatores utilizou-se o ponto central do planejamento experimental com concentração de IPTG 1mM e mais duas condições com concentração de IPTG 0,1 mM e 2mM. Foi encontrada uma grande similaridade entre os gráficos das análises cinéticas referentes a transcrição e a velocidade específica de formação do produto (qP). Não foi possível Identificar uma semelhança entre o perfil referente a análise cinética da transcrição comparada com a síntese proteica. Esses resultados sugerem que a transcrição apresenta uma cinética semelhante a velocidade específica de formação do produto e não necessariamente a concentração de proteína. Foi encontrada uma correlação positiva no ponto t4 do biorreator na condição central do planejamento experimental, quando foram correlacionadas a transcrição e a velocidade de formação do produto ($r=0,998$ e valor $P=0,03$). Os experimentos mostraram uma melhor condição de transcrição de *Amblyomin-X* quando em condições de 37°C e com indução de IPTG 1mM. A indução com IPTG 2mM não proporcionou aumento significativo na produção da proteína *Amblyomin-X*, contudo apresentou a melhor taxa de transcrição de mRNA nas primeiras horas de indução comparado aos outros ensaios. Pode-se concluir que o monitoramento da transcrição por RT-qPCR apresenta-se como mais uma metodologia válida no acompanhamento dos bioprocessos.

Palavras chave: Transcrição. Síntese proteica. *Amblyomin-X*. Correlação. Bioprocessos.

ABSTRACT

DOS SANTOS, M.M. **GENE EXPRESSION QUANTIFICATION OF *AMBLYOMIN-X* CLONED INTO *Escherichia coli* BL21(DE3) AND CORRELETION WITH THEIR PROTEIN LEVELS**. 2018. 101 p. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The present work analysed the gene expression of Amblyomin-X, a potential therapeutic protein expressed in a recombinant *Escherichia coli* with a plasmid vector inducible by IPTG (*Isopropyl β-D-1- thiogalactopyranoside*). The gene expression was quantified by absolute RT-qPCR method. Amblyomin-X is a Kunitz-type serine protease inhibitor which demonstrates antitumor and anticoagulant activity. Due to Amblyomin-X therapeutic importance, it was necessary to implement a production protocol using bioreactors. The information on gene expression can helps to understand the microorganism behavior during the cultures in shaken flasks and bioreactors. From the moment of the induction of the gene Amblyomin-X, the recombinant *Escherichia coli* directs its metabolism for expression and production of this protein. The Amblyomin-X protein is expressed as insoluble inclusion bodies. Insoluble inclusion bodies proteins can be easily extracted from the cell, however it difficults its quantification by chromatographic techniques. Because of that, besides analysis of the gene expression, by RT-qPCR method, we tried to correlate the gene expression with their protein levels concentration, whose objective was implement the RT-qPCR as an indirect method to quantify these type of protein product. Few studies correlate the gene expression in their protein, and this comparison can contribute to reveal important aspects between transcription and translation of heterologous proteins in *Escherichia coli*, for the achievement of scale up process in biorreactors. Therefore, the quantification by RT-qPCR, represents a most secure way to understand the expression of heterologous proteins in recombinant systems. Experiments were performed in shaken flasks at two different induction temperatures (37°C and 30°C), 0,2 g/L of biomass (X) at the induction moment with IPTG 1mM. Biorreactors are performed with three different IPTG concentrations (0,1 mM, 1 mM and 2 mM). A great similarity was found between the graphs of the kinetic analyzes concerning gene expression and the specific rate of product formation (qP). It was not possible to identify a similarity between the profile concerning kinetic analysis of gene expression compared to protein synthesis. These results suggest that gene expression exhibits similar kinetics to the specific rate of product formation and not necessarily to the protein concentration. were found no significant correlations in the analyzes of each moment after induction, except for point t4 of the bioreactor correspondent to central condition, when the gene expression and the rate of the product formation were positively correlated ($r = 0.998$ and $P \text{ value} = 0.03$). The experiments showed a better transcription condition of *Amblyomin-X* when under conditions of 37 ° C and induction of 1mM IPTG. Induction with 2mM IPTG did not provide a significant increase in the production of the *Amblyomin-X* protein, however it presented the best mRNA transcription rate in the first hours of induction compared to the other assays. It can be concluded that transcription analysis by RT-qPCR is another valid methodology for bioprocesses monitoring.

Keywords: Gene expression. Protein synthesis. *Amblyomin-X*. Correlation. Bioprocesses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da estrutura da molécula <i>Amblyomin-X</i> (BATISTA et al., 2010).....	22
Figura 2: Representação esquemática do mecanismo de indução de um gene alvo por IPTG, na linhagem BL21(DE3) de <i>Escherichia coli</i> . (próprio autor)	24
Figura 3: Representação esquemática da dinâmica de formação dos corpos de inclusão. A formação do corpo de inclusão insolúvel depende da adição ou remoção das proteínas da massa insolúvel. (Adaptado de Middelberg, 2002)	26
Figura 4: Representação esquemática da metodologia não específica utilizada no procedimento de qPCR. (Adaptado de Sakurai e Shibasaki, 2012)	30
Figura 5: Fluxograma dos procedimentos experimentais realizados no projeto.	32
Figura 6: Representação do plasmídeo PJexpress 411 e do inserto.	34
Figura 7: Diagrama representando as etapas dos experimentos em frascos agitados.	37
Figura 8: Sistema para monitoramento do oxigênio dissolvido em frascos agitados. (Foto do próprio autor)	38
Figura 9: Relação entre a biomassa (X) e a densidade óptica (DO_{600nm}) de <i>Escherichia coli</i> referente a seis ensaios em biorreatores	48
Figura 10: Gel de agarose 1,5% realizado para visualizar o plasmídeo PJExpress411.	51
Figura 11: Gráfico de estabilidade plasmideal realizado a partir da média de resultados obtidos em três diferentes ensaios em biorreator.....	52
Figura 12: Purificação de produto de PCR da região plasmideal contendo o inserto do gene <i>Amblyomin-X</i>	52
Figura 13: Sequenciamento do produto de PCR dos plasmídeos PJexpress411 utilizando os oligonucleotídeos iniciadores PJex 5' e 3'.	53
Figura 14: Resultados da padronização da curva padrão utilizada no procedimento de qPCR. gráfico B. A curva padrão apresentou $R^2=0,999$ e eficiência de 104,8%.....	55
Figura 15: Gráfico da amplificação referente a padronização da concentração das amostras utilizadas no procedimento de qPCR.....	57
Figura 16: Gráfico da amplificação da titulação dos oligonucleotídeos iniciadores. A análise dos dados mostra a curva da amostra 200/200 como a que apresentou maior ΔRn , as curvas foram analisadas próximo ao ciclo 30.	58

Figura 17: Gel de SDS-PAGE dos testes de extração de proteína com o reagente Bugbuster®.	61
Figura 18: Gel de SDS-PAGE da fração solúvel das amostras retiradas durante a etapa de indução de um ensaio em biorreator na condição central do planejamento experimental.	62
Figura 19: Análise cinética da biomassa das duas condições de ensaio em frascos agitados (30°C e 37°C).	63
Figura 20: Análise dos níveis da proteína <i>Amblyomin-X</i> nas duas condições de ensaio com as temperaturas de indução de 30°C (linha pontilhada) e 37°C (linha contínua).	64
Figura 21: Análise das quantidades de mRNA nas duas condições de ensaio com as temperaturas de indução de 30°C (linha pontilhada) e 37°C (linha contínua).	65
Figura 22: Porcentagem de oxigênio dissolvido (pO ₂) e cinética de crescimento de <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3).	66
Figura 23: Gráfico da cinética de crescimento celular (X), transcrição de <i>Amblyomin-X</i> (mRNA) e formação do produto proteico em forma de corpos de inclusão (Proteína) durante sete horas de ensaios em frascos agitados.	67
Figura 24: Gel de SDS-PAGE referente a um dos ensaio em frascos agitados com temperatura de indução de 30°C.	68
Figura 25: Quantidade de mRNA e concentração de <i>Amblyomin-X</i> (P) em função da biomassa (X) de 1 g/L nos ensaios em frascos agitados com temperatura de indução de 30°C.	70
Figura 26: Valores dos níveis de mRNA de <i>Amblyomin-X</i> em função da biomassa (X) e da velocidade específica e formação do produto (qP) do experimento realizado com temperatura de indução de 30°C.	72
Figura 27: Gráfico da análise cinética da biomassa (X), do produto proteico <i>Amblyomin-X</i> em forma de corpos de inclusão (P) e dos níveis de mRNA do gene <i>Amblyomin-X</i> (mRNA). (n=3)	74
Figura 28: Gel de SDS-PAGE referente aos ensaios conduzidos com temperatura de indução de 37°C.	75
Figura 29: Gráfico de cinética de quantidade de mRNA de <i>Amblyomin-X</i> em função de X e do produto proteico <i>Amblyomin-X</i> (P) em função de X.	76

Figura 30: Valores de quantidades de mRNA de <i>Amblyomin-X</i> em função da biomassa (X) e da velocidade específica e formação do produto (qP).....	78
Figura 31: Gráfico contendo os valores absolutos de quantidade de mRNA de <i>Amblyomin-X</i> em função da biomassa (X) sobre o tempo do bioprocesso.	80
Figura 32: Gráficos da análise cinética de crescimento de biomassa em três biorreatores, com diferentes concentrações do indutor IPTG.	81
Figura 33: Gráficos da análise cinética da concentração do produto <i>Amblyomin-X</i> (P) referentes a 1 mL de meio de cultivo e em função da biomassa (X).	82
Figura 34: Gráficos da cinética da transcrição de <i>Amblyomin-X</i> , referente a 1mL de meio de cultivo e em função da biomassa (X).	83
Figura 35: Gel de SDS-PAGE referente as amostras retiradas do ensaio em biorreator da condição central do planejamento experimental.	84
Figura 36: Gráfico da cinética de biomassa (X), proteína <i>Amblyomin-X</i> (P) e quantidade de mRNA de <i>Amblyomin-X</i> de um dos ensaios na condição central do planejamento experimental.	85
Figura 37: Gráfico da cinética de quantidade de mRNA de <i>Amblyomin-X</i> em função de X e da concentração de <i>Amblyomin-X</i> (P) em função de X, na condição central do planejamento experimental.	86
Figura 38: Gráfico da análise cinética entre a quantidade de mRNA de <i>Amblyomin-X</i> em função da biomassa (X) e velocidade específica de formação de produto <i>Amblyomin-X</i> (qP), referente a condição central do planejamento experimental.	87
Figura 39: Géis de SDS-PAGE das extrações dos corpos de inclusão da proteína <i>Amblyomin-X</i> , referentes aos ensaios 13 (A) e 14 (B) do planejamento experimental em biorreatores.	88
Figura 40: Gráficos da análise cinética da quantidade de mRNA em função da biomassa (X) e concentração de <i>Amblyomin-X</i> (P) em função da biomassa (X) dos biorreatores 13 e 14.	89
Figura 41: Gráficos da análise cinética da quantidade de mRNA em função da biomassa (X) e velocidade específica de formação do produto proteico (qP) dos biorreatores 13 e 14.	91

Figura 42: Proposição matemática entre as variáveis quantidade de mRNA de <i>Amblyomin-X</i> e velocidade específica de formação de <i>Amblyomin-X</i>	92
Figura 43 : Gráfico da transcrição <i>Amblyomin-X</i> em função da biomassa (X) dos ensaios realizados em frascos agitados e dos ensaios realizados em biorreatores.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de qPCR.	41
Tabela 2: Sequências dos amplicons gerados a partir da qPCR de cada par de oligonucleotídeos iniciadores para a sequência do gene recombinante <i>Amblyomin-X</i> (<i>amb1</i> , <i>amb2</i> e <i>amb3</i>) e para as sequências dos genes endógenos (<i>rrsA</i> , <i>cysG</i> , <i>ihfB</i> e <i>idnT</i>).	42
Tabela 3: Planejamento experimental dos ensaios em biorreatores mecanicamente agitados.	49
Tabela 4: Comparação entre os melhores valores obtidos de coeficientes de determinação (R^2) e eficiência de reação para a curva padrão utilizada na reação de qPCR.	56
Tabela 5: Matriz para reações de titulação dos oligonucleotídeos iniciadores <i>amb1-5'</i> e <i>amb1-3'</i>	58
Tabela 6: Comparação entre a extração de corpos de inclusão utilizando a metodologia de lise por ultrassom e a metodologia de lise pelo reagente <i>Bugbuster</i> ®.	60
Tabela 7: Correlação de <i>Pearson</i> entre a transcrição e a concentração de proteína, referente a 1mL de cultivo do experimento realizado com temperatura de indução de 30°C.	69
Tabela 8: Correlação de <i>Pearson</i> entre a transcrição e a concentração de proteína, referente a 1g/L de biomassa (X) do experimento realizado com temperatura de indução de 30°C.	71
Tabela 9: Correlação de <i>Pearson</i> entre os níveis de mRNA em função da biomassa (X) e da velocidade específica de formação do produto (qP), para os ensaios realizados com temperatura de indução de 30°C.	73

Tabela 10: Correlação de <i>Pearson</i> entre a transcrição e a concentração de proteína, referente a 1mL de cultivo do experimento realizado com temperatura de indução de 37°C.....	75
Tabela 11: Correlação de <i>Pearson</i> entre a transcrição e a concentração de proteína, referente a 1 g/L de biomassa (X), dos experimento realizado com temperatura de indução de 37°C.	77
Tabela 12: Correlação de <i>Pearson</i> dos valores referentes aos níveis de mRNA em função da biomassa (X) e da velocidade específica de formação do produto (qP) dos experimentos realizados com temperatura de indução de 37°C.	78
Tabela 13: Correlação de <i>Pearson</i> entre as variáveis quantidade de mRNA e concentração da proteína para o ensaio de biorreator na condição central do planejamento experimental.....	86
Tabela 14: Correlações entre as variáveis quantidade de mRNA e concentração de P, ambos em função de 1 g/L de biomassa (X) para os biorreatores 13 e 14.	90
Tabela 15: Correlações entre as variáveis quantidade de mRNA em função de X e velocidade específica de formação do produto (qP) para os biorreatores 13 e 14.	91

SUMÁRIO

1. Introdução.....	16
2. Revisão Bibliográfica.....	21
2.1. AMBLYOMIN-X	21
2.2. ESCHERICHIA COLI	22
2.2.1. Linhagem BL21(DE3)	23
2.3. SUPEREXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	24
2.3.1. Corpos de inclusão	25
2.4. BIOPROCESSO	27
2.4.1. Quantificação do produto proteico	27
2.4.2. Análises de velocidades específicas	28
2.5. RT-qPCR.....	29
3. Material e Métodos.....	32
3.1. MICRORGANISMO.....	33
3.2. VETOR	33
3.3. BANCO DE PRESERVAÇÃO DE CÉLULAS	34
3.4. METODOLOGIAS DE CULTIVO CELULAR	35
3.4.1. Antibiótico	35
3.4.2. Indutor.....	35
3.4.3. Meio de cultura Luria-Bertani	35
3.4.4. Solução de Micronutrientes.....	36
3.4.5. Meio Mineral	36
3.4.6. Cultivo em frascos agitados	36
3.4.7. Cultivo em biorreatores.....	38
3.5. AMOSTRAGEM.....	39
3.6. METODOLOGIAS PARA QUANTIFICAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO.....	39
3.6.1. Extração de DNA Plasmideal	39
3.6.2. Análise de DNA por gel de agarose.....	40
3.6.3. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores.....	40
3.6.4. Extração de RNAs totais.....	42
3.6.5. Reação enzimática com DNaseI	43
3.6.6. Quantificação de RNAs totais.....	44
3.6.7. Reação enzimática com transcriptase reversa.....	44
3.6.8. Parâmetros da qPCR	44
3.6.9. Curva padrão para qPCR.....	45

3.7.	METODOLOGIAS PARA QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA.....	45
3.7.1.	Extração de corpos de inclusão	45
3.7.2.	SDS-PAGE.....	46
3.7.3.	Quantificação dos corpos de inclusão.....	47
3.8.	METODOLOGIAS ESTATÍSTICAS	47
3.8.1.	Determinação da biomassa (X)	47
3.8.2.	Planejamento experimental	48
3.8.3.	Correlação de Pearson	49
4.	Resultados e discussão.....	51
4.1.	PADRONIZAÇÃO DA RT-QPCR	53
4.2.	PADRONIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE CORPOS DE INCLUSÃO	59
4.3.	EXPERIMENTOS EM FRASCOS AGITADOS.....	62
4.3.1.	Comparação das variáveis entre os ensaios	63
4.3.2.	Correlação entre a transcrição e a síntese proteica de Amblyomin-X.....	66
4.4.	EXPERIMENTOS EM BIORREADORES.....	79
4.4.1.	Comparação das variáveis entre os ensaios	80
4.4.2.	Correlação entre a transcrição e a síntese proteica de Amblyomin-X.....	83
4.5.	TRANSCRIÇÃO DE AMBLYOMIN-X EM FRASCOS AGITADOS E BIORREADORES.....	93
5.	Conclusões.....	95
	REFERÊNCIAS*	96

1. INTRODUÇÃO

Atualmente diversos grupos de pesquisas empenham seus esforços na identificação de novas moléculas com potenciais usos farmacêuticos. Muitas destas moléculas são proteínas, clonadas em diferentes tipos celulares de variados organismos, que são escolhidos de acordo com a característica de expressão e síntese da molécula a ser produzida por processos biotecnológicos (JAZAYERI et al., 2017; VIEIRA et al., 2017). O controle rigoroso e o estudo detalhado de um bioprocessos, sobretudo em biorreatores que possuem um refinado controle de variáveis como temperatura, pH, aeração e agitação, contribuem para a otimização de processos e do escalonamento de diversos produtos biotecnológicos. A manipulação genética dos microrganismos tem contribuído muito no desdobramento dos bons resultados em bioprocessos, sendo que, atualmente existem diversas tecnologias de clonagem, monitoramento de bioprocessos e extração de proteínas que proporcionaram um grande avanço na área de produção de proteínas recombinantes em bioprocessos industriais. (GUPTA; SHUKLA, 2017)

De acordo com a célula hospedeira, o monitoramento da produção da proteína alvo ainda é um desafio devido às necessidades de métodos específicos para identificação e quantificação das proteínas recombinantes. Além da escolha do método apropriado, nos processos biotecnológicos com microrganismos, nos quais a proteína de interesse não é exportada para o meio extracelular, existe a necessidade de tratamentos especiais para a separação da proteína alvo que deve ser quantificada.

O presente projeto realizou a quantificação da transcrição bem como analisou a correlação existente entre a transcrição e a síntese proteica de um candidato a biofármaco, o *Amblyomin-X*. A quantificação da transcrição e a correlação podem auxiliar nos estudos de otimização e escalonamento do processo de produção de *Amblyomin-X*. Os dados da transcrição da proteína alvo, realizados por RT-qPCR, podem representar uma alternativa metodológica na quantificação e no monitoramento do produto proteico em bioprocessos. Outros trabalhos buscaram correlacionar os níveis de mRNA ao seu produto proteico (PASCAL et al., 2008). Contudo, muitas destas análises ocorrem em estudos de genômica e transcriptômica a partir de organismos eucariotos. Diversos trabalhos relatam uma inconsistência na correlação entre os níveis de mRNA e os níveis da proteína, e muitas destas

diferenças são atribuídas aos mecanismos pós-traducionais existentes em células de organismos eucariotos (VOGEL; MARCOTTE, 2012). Acreditamos que uma análise cinética da transcrição, em um sistema de expressão como *Escherichia coli*, pode mostrar diferenças na correlação entre o mRNA e o produto proteico, uma vez que organismos eucariotos possuem mecanismos pós-traducionais diferentes dos mecanismos encontrados em eucariotos.

O *Amblyomin-X* é um inibidor de protease do tipo Kunitz, cuja sequência foi isolada de uma biblioteca de cDNA obtida por reconhecimento de *ESTs* (*Expressed sequence tag*) das glândulas salivares do carrapato *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) e clonada em *Escherichia coli* pelo Instituto Butantan (BATISTA et al., 2008)

O *Amblyomin-X* apresentou resultados significativos em testes pré-clínicos, demonstrando eficiente atividade antitumoral e baixa anticoagulante, segundo Souza et al. (2016). Por esse motivo, os estudos para o escalonamento da produção desta proteína recombinante tornou-se uma demanda importante. Neste contexto o Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), em parceria com o Instituto Butantan, propôs um projeto para desenvolver uma metodologia de produção para este biofármaco, utilizando biorreatores do tipo *STR* (*stirred tank reactor*) com capacidade de 10 a 100 Litros. Esse projeto conta com o financiamento do BNDES e da empresa União Química. O presente trabalho contempla a etapa de “Implantação da quantificação da transcrição por RT-qPCR”, que faz parte do escopo do IPT no projeto geral, contendo ao todo as seguintes etapas técnicas:

- ✓ Estudo cinético da etapa de crescimento do microrganismo.
- ✓ Estudo cinético da etapa de biossíntese do produto (*Amblyomin-X*).
- ✓ **Implantação da Quantificação da Transcrição por RT-qPCR**
- ✓ Proposição do Modelo Matemático fenomenológico não estruturado.
- ✓ Proposição de Modelos Metabólicos.
- ✓ Otimização matemática baseada em modelos matemáticos propostos.
- ✓ Protocolo do Processo de Produção da proteína recombinante.
- ✓ Scale-up (biorreatores de 10, 50 e 100 Litros).
- ✓ Aplicação de técnicas de CFD.
- ✓ Pré-viabilidade econômica do processo.

Dentro dessa etapa de implantação de método para o monitoramento da transcrição, buscou-se uma alternativa indireta para quantificar o produto proteico, de forma a auxiliar nos ensaios de otimização do bioprocesso e posteriormente auxiliar no monitoramento da produção da proteína recombinante em escala industrial. Sendo assim este trabalho teve como um dos objetivos específicos implantar a metodologia de quantificação da transcrição da proteína *Amblyomin-X* por intermédio da técnica de RT-qPCR (*reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction*). Avaliou-se também a produção de *Amblyomin-X*, na forma de corpos de inclusão, por técnicas de SDS-PAGE e a quantificação por *Bradford*, a fim de que os resultados obtidos por RT-qPCR pudessem ser correlacionados ao produto proteico, visto que apenas a quantificação da transcrição não é suficiente para se analisar a produção da proteína.

A técnica de RT-qPCR quantifica moléculas de DNA complementar (cDNA), formadas a partir dos RNAs mensageiros pela reação da *transcriptase reversa*, e torna possível comparar as diferenças nos níveis da transcrição de um determinado gene. Acreditamos que o uso desta metodologia apresenta uma alternativa analítica para quantificar a formação de um produto em um bioprocessos.

Alguns autores já demonstraram a utilização de técnicas de RT-qPCR para o acompanhamento de bioprocessos pela quantificação relativa da transcrição, por meio da quantificação do número de cópias plasmideais ou mesmo da detecção de moléculas de DNA contaminante em um ensaio (LIN et al., 2015; MAMNOON et al., 2016; SKULJ et al., 2008). Apesar de já estabelecido o uso desta técnica para o monitoramento de bioprocessos, poucos trabalhos buscam acompanhar indiretamente a cinética de formação da proteína por RT-qPCR utilizando a quantificação absoluta dos transcritos. A cinética de formação do produto (P) ao longo de qualquer processo fermentativo ou bioprocessos pode ser calculada pela velocidade específica de formação do produto (q_p) (SHUKLA; CHAND; SRIVASTAVA, 2005). Desta forma, etapas de purificação e quantificação da proteína, com protocolos bem estabelecidos, são imprescindíveis para a realização correta destes cálculos, bem como para a implantação de cálculos de modelagem matemática.

O processo de extração da proteína *Amblyomin-X* e a quantificação das porções insolúveis são importantes para determinar a melhor metodologia de cultivo em que ocorra a maior

produção de proteínas recombinantes. Sabe-se que a proteína *Amblyomin-X* é produzida em sua grande maioria sob a forma de corpos de inclusão insolúveis, que se depositam no interior da célula bacteriana. Segundo Menzella, Gramajo e Ceccarelli (2002) os corpos de inclusão estão relacionados à síntese de grandes quantidades de proteínas heterólogas pelos ribossomos da célula do microrganismo hospedeiro. Apesar da presença destes corpos de inclusão no interior da célula facilitarem os processos de extração e purificação da proteína alvo, dificultam a quantificação por metodologias cromatográficas uma vez que estão em forma insolúvel e não estão enoveladas na sua forma nativa (SANTOS et al., 2012). Além disso, as técnicas de *refolding* utilizadas para enovelar as moléculas em sua forma nativa promovem uma considerável perda de material, fato este que prejudicaria a quantificação do produto no bioprocesso, além de tornar mais lenta a análise, devido a necessidade de se implementar diferentes e complexas. Acreditamos que a técnica de RT-qPCR apresente uma alternativa indireta para a quantificação absoluta da proteína recombinante, e que auxilie na padronização dos protocolos de cultivos em biorreatores.

Na Linhagem recombinante em estudo, *Escherichia coli* BL21(DE3), o vetor utilizado apresenta origem de replicação Ori_pUC mutada de ColE1, e mantém-se em alta cópia por célula (± 500 cópias por célula) garantindo a sua estabilidade ao longo do processo. Contudo, a alta produção de proteína heteróloga, bem como a manutenção do plasmídeo em *Escherichia coli*, pode promover uma sobrecarga metabólica, que pode modificar a velocidade de crescimento e o metabolismo do ciclo de ácidos carboxílicos, e consequentemente favorecer a formação de acetatos (SILVA; QUEIROZ; DOMINGUES, 2012a).

Todas estas alterações no metabolismo geradas pela presença de genes heterólogos no sistema bacteriano hospedeiro, bem como a presença de corpos de inclusão insolúveis e utilização do indutor IPTG (*Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*) em promotores fortes pode refletir na produtividade final do bioprocesso. O acompanhamento da transcrição de mRNA por RT-qPCR, bem como a análise por SDS-PAGE e Bradford, poderá mostrar as variações que ocorrem entre diferentes condições de cultivos do microrganismo, e consequentemente auxiliar na implantação dos protocolos de escalonamento do bioprocesso e futuramente no monitoramento do bioprocesso industrial.

Objetivo Principal:

O projeto tem como objetivo principal a análise cinética da transcrição da proteína recombinante *Amblyomin-X* clonada em *Escherichia coli* BL21(DE3), em cultivos realizados em frascos agitados e biorreatores, buscou-se também correlacionar os dados referentes à quantidade de mRNA e concentração da proteína *Amblyomin-X*, a fim de verificar se a técnica de RT-qPCR representa uma alternativa viável para a quantificação indireta de proteínas heterólogas em bioprocessos, utilizando *Escherichia coli* BL21(DE3).

Apresentam-se como objetivos específicos os seguintes tópicos:

- Padronizar a técnica de RT-qPCR para a quantificação da transcrição da proteína *Amblyomin-X*.
- Padronizar a técnica de extração dos corpos de inclusão e quantificação de proteínas para a proteína *Amblyomin-X*.
- Análise cinética de formação de biomassa (X) (g/L), cinética da transcrição de *Amblyomin-X* (mRNA) (Número de cópias) e cinética de formação da proteína *Amblyomin-X* (P) (g/L) em ensaios realizados em frascos agitados e em biorreatores.
- Comparação da cinética de transcrição entre os ensaios.
- Buscar uma correlação entre a transcrição e a síntese proteica de *Amblyomin-X* em forma de corpos de inclusão.
- Verificar a viabilidade do uso da RT-qPCR na quantificação indireta de proteínas heterólogas em um bioprocessos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Sabe-se que organismos hematófagos, como os carrapatos, representam uma excelente fonte para a busca de moléculas com potenciais farmacêuticos, sobretudo moléculas que atuam nas vias de coagulação sanguínea. Atualmente, apesar de não serem completamente conhecidos os mecanismos fisiopatológicos que relacionam as vias de coagulação sanguínea com o câncer, sabe-se que a ativação da cascata de coagulação possui relação com o crescimento, metástase e angiogênese de células tumorais (CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2016). Neste contexto, foi descoberta uma proteína inibidora de serino protease do tipo Kunitz que atua no fator X (FXa) da via de coagulação, e que possui potenciais farmacêuticos com características antitumorais e anticoagulantes.

2.1. *Amblyomin-X*

A proteína foi isolada a partir de uma biblioteca de cDNA obtida por reconhecimento de *ESTs* (*Expressed Sequence Tag*), de genes localizados nas glândulas salivares do carrapato *Amblyomma sculptum* (BATISTA et al., 2008). Devido ao fato da proteína ser originada de organismos do gênero *Amblyomma*, ser um inibidor de serino protease e atuar no FXa da via de coagulação, a proteína foi nomeada de *Amblyomin-X* (Acesso ao Genbank AAT68575). A molécula do *Amblyomin-X* possui massa molecular de 13,491 kDa e um domínio funcional do tipo Kunitz capaz de inibir o FXa da via de coagulação sanguínea, e consequentemente inibir a coagulação sanguínea, a representação esquemática da estrutura de *Amblyomin-X* está ilustrada na Figura 1. Estudos recentes demonstraram a capacidade anticoagulante e antitumoral *in vitro* e *in vivo* dessa proteína tornando-a um potencial fármaco anti-angiogênico para o tratamento do câncer (BATISTA et al., 2010; CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010, 2016).

Figura 1: Representação da estrutura da molécula *Amblyomin-X* (BATISTA et al., 2010).

Devido ao seu potencial farmacêutico, a sequência do gene de *Amblyomin-X* contendo otimização de códons foi clonada em um vetor de expressão de alta cópia com genes de resistência à canamicina e contendo o promotor T7 da RNA polimerase, regulado pelo sistema *Operon Lac*. O vetor foi introduzido na linhagem industrial BL21(DE3) de *Escherichia coli* com a finalidade de sintetizar a molécula recombinante *Amblyomin-X*.

2.2. *Escherichia coli*

A bactéria gran-negativa *Escherichia coli* tem sido o principal microrganismo utilizado para a expressão e produção de proteínas recombinantes, devido a facilidade em incorporar genes e expressar proteínas heterólogas (CRONAN, 2005). A *Escherichia coli* foi o primeiro microrganismo geneticamente modificado, utilizado para a produção de moléculas com função terapêutica para o uso humano, primeiramente com o hormônio humano somatostatina e em seguida com a produção de insulina humana (GOEDDEL et al., 1979; ITAKURA et al., 1977). Outro fator que torna a bactéria *Escherichia coli* como o microrganismo ideal para a produção de proteínas recombinantes é o baixo custo utilizado nos meios de cultura, facilitando a implementação de metodologias de cultivos. Sobre

nos processos biotecnológicos que envolvem cultivo bacteriano em alta densidade, com a utilização de biorreatores.

2.2.1. Linhagem BL21(DE3)

Dentre as linhagens de *Escherichia coli* mais utilizadas nos processos industriais destaca-se a linhagem BL21(DE3), para a produção de proteínas recombinantes. A linhagem BL21(DE3) tem origem a partir das linhagens B de *Escherichia coli* descritas por Delbück e Luria em 1942, esta linhagem foi identificada como hospedeira dos fagos T1 a T7, e seu estudo possibilitou um grande avanço nas pesquisas das áreas de biologia molecular e biotecnologia (DAEGELEN et al., 2009; JEONG et al., 2009a). A utilização desse microrganismo como sistema de expressão destaca-se pois a regulação da transcrição, de genes heterólogos, pode ser controlada pelo promotor lacUV5 induzível por IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) (JEONG et al., 2009b; STUDIER et al., 1990). O promotor lacUV5 e o gene que transcreve a T7 RNA polimerase de bacteriófagos (T7 gene 1) estão presentes no prófago DE3, inserido por recombinação nos sítios de ligação λ do genoma bacteriano.

A associação da linhagem BL21(DE3) com plasmídeos pET, ou outros que tenham a regulação da expressão do gene alvo controlada pelo promotor T7 de bacteriófago, juntamente com o gene *lacI*, que codifica o repressor do sistema *Operon lac*, consiste em um dos sistemas biológicos mais utilizados para a superexpressão de proteínas recombinantes (MIROUX; WALKER, 1996). Uma representação esquemática do sistema de expressão, regulado pela utilização de IPTG, em *Escherichia coli* BL21(DE3) está ilustrada na Figura 2.

Figura 2: Representação esquemática do mecanismo de indução de um gene alvo por IPTG, na linhagem BL21(DE3) de *Escherichia coli*. (próprio autor)

Nota: O gene *lacI* transcreve a proteína repressora do sistema *Operon lac*. O repressor por sua vez pode ligar-se aos promotores *lacUV5* e *T7*, reprimindo a transcrição de seus respectivos genes. A molécula de IPTG por sua vez liga-se ao repressor, impedindo-o de se ligar aos promotores. Desta forma a presença do IPTG induz a transcrição dos genes *T7 gene1* que codifica a T7 RNA polimerase e consequentemente permite a transcrição do gene alvo.

2.3. Superexpressão de proteínas recombinantes

De acordo com Miroux e Walker (1996) a superexpressão pode ser entendida como a transcrição de uma molécula alvo em *Escherichia coli* que promova uma concentração superior a 1mg/L de cultura bacteriana. Ou seja, a superexpressão corresponde a uma transcrição em níveis considerados superiores aos níveis basais dos genes endógenos de *Escherichia coli*. A superexpressão de proteínas recombinantes em microrganismos pode promover consequências para ao metabolismo celular, ocasionando um *stress* celular denominado de sobrecarga metabólica. A sobrecarga metabólica foi inicialmente correlacionado a expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli* e foi associada à grande quantidade de gasto energético que a célula hospedeira deveria disponibilizar para a manutenção da produção das proteínas heterólogas (BENTLEY et al., 1990; GLICK, 1995).

A origem da sobrecarga metabólica é multifatorial e está associada à manutenção do DNA recombinante e também aos mecanismos que controlam a expressão de proteínas, existe também correlação entre o tamanho e número de cópias do plasmídeo e alterações no

padrão de crescimento e viabilidade de microrganismos (BIRNBAUM; BAILEY, 1991; RYAN; PARULEKAR; STARK, 1989). Alguns autores sugerem que uma das possíveis causas da sobrecarga metabólica plasmideal está relacionada à expressão de proteínas que conferem resistência ao antibiótico do meio de cultura, além disso, verificaram formação de acetatos em cultivos contendo construções plasmideais com genes heterólogos, a presença destes compostos pode inibir ainda mais o crescimento microbiano, sobretudo em bioprocessos de alta densidade, a produção destes acetatos pode estar relacionada a alterações na via metabólica do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) (ROZKOV et al., 2004).

Além das alterações metabólicas e diminuição na taxa de crescimento celular, a superexpressão de proteínas recombinantes pode proporcionar a formação de corpos de inclusão, formados por agregados insolúveis das proteínas recombinantes heterólogas expressas no microrganismo geneticamente modificado.

2.3.1. Corpos de inclusão

Os corpos de Inclusão são aglomerados proteicos insolúveis que se formam no interior das células bacterianas, e geralmente estão associados à expressão de proteínas heterólogas (Basu; Li; Leong, 2011). Muitas são as teorias para a formação dessas proteínas insolúveis, e acredita-se que sua formação ocorra principalmente por duas razões: (i) primeiramente devido ao fato de a célula hospedeira traduzir as proteínas heterólogas em velocidade muito maior do que elas conseguem se reorganizar na sua conformação natural (*refolding*), proporcionando desta maneira, a formação de aglomerados proteicos inativos e insolúveis; (ii) em segundo lugar, o fato da célula bacteriana hospedeira não possuir os mecanismos pós-traducionais necessários para o correto *refolding* da proteína heteróloga, uma vez que a célula pode não possuir todos os mecanismos moleculares necessários para esta etapa (BANEYX; MUJACIC, 2004). A formação dos corpos de inclusão pode ser considerada um processo de equilíbrio dinâmico entre a adição e a remoção de fragmentos proteicos à massa de proteínas insolúveis, o esquema representado pela Figura 3.

Figura 3: Representação esquemática da dinâmica de formação dos corpos de inclusão. A formação do corpo de inclusão insolúvel depende da adição ou remoção das proteínas da massa insolúvel. (Adaptado de Middelberg, 2002)

Os corpos de inclusão podem ser depositados tanto no interior da célula bacteriana quanto no espaço periplasmático das bactérias gram-negativas, tudo dependerá se na construção da proteína existir a sequência sinal para que a célula hospedeira possa exportá-la para o exterior da célula (VALAX; GEORGIU, 1993).

A presença dos corpos de inclusão nas bactérias recombinantes influencia nas etapas de *downstream* do processo industrial por estarem em sua forma inativa e insolúvel. Embora seja fácil de isolar o corpo de inclusão, existe grande dificuldade na etapa de reativação da molécula pelo procedimento de *refolding*, principalmente quando se tratam de proteínas eucarióticas que apresentem resíduos de cisteínas, capazes de formar ligações de dissulfeto (MENZELLA; GRAMAJO; CECCARELLI, 2002). Devido a importância da etapa de *refolding* muitas estratégias diferentes são adotadas para aperfeiçoar este processo, como a oxidação das proteínas por ar controlado e desnaturação por ureia (MENZELLA; GRAMAJO; CECCARELLI, 2002; SANTOS et al., 2012).

2.4. *Bioprocesso*

Entende-se como bioprocesso a utilização de microrganismos ou seus componentes para a obtenção de produtos de interesse. O processo para a obtenção de um protocolo de cultivo em biorreatores passa por diversas etapas de implementação (NAUHA et al., 2015). Inicialmente, realiza-se a cinética de crescimento celular com frascos agitados, em pequenos volumes e baixa densidade celular. Dessa forma o cultivo em frascos agitados está, muitas vezes, associado às fases iniciais de um protocolo de escalonamento de produção. O cultivo de microrganismos em frascos agitados não permite um controle refinado das variáveis envolvidas em um bioprocesso, além de limitar o crescimento devido a baixa transferência de oxigênio entre o ar e o meio de cultura. Os processos em biorreatores, por outro lado, permitem um controle e ajuste preciso de variáveis como temperatura, aeração, agitação, pH, vasão de alimentação do substrato, entre outras. Dentre os bioprocessos mais comumente relatados na literatura encontra-se o processo realizado em batelada alimentada em biorreatores. (LARSSON; TÖRNKVIST, 1996; STEINHOFF et al., 2015).

O cultivo em batelada alimentada caracteriza-se por duas fases principais de cultivo celular. A fase de batelada, na qual o meio de cultura contém o substrato necessário para o crescimento do microrganismo, o crescimento ocorre de forma exponencial até que se esgote o substrato presente no meio de cultura. Passada a etapa de batelada inicia-se a etapa de alimentação com uma solução concentrada de substrato. Na etapa de alimentação, geralmente o crescimento do microrganismo dependerá do perfil de alimentação determinado para o experimento. Muitos ensaios utilizam um perfil de alimentação que promove um crescimento linear da biomassa dos microrganismos. Algumas metodologias de cultivo utilizam do controle da vasão de alimentação para diminuir os riscos de formação de acetatos, um subproduto do metabolismo muito comum em cultivos celulares que superexpressam proteínas recombinantes (GOMBERT; KILIKIAN, 1997; RINAS; HELLMUTH; SANDERS, 1995).

2.4.1. Quantificação do produto proteico

A quantificação das proteínas em bioprocessos geralmente ocorre por metodologias cromatográficas após as etapas de purificação do produto proteico. Existem dois processos importantes para a purificação e quantificação das proteínas recombinantes, o primeiro

passo consiste na centrifugação ou filtração do meio de cultivo, com o objetivo de separar as células de microrganismos do meio líquido. A segunda etapa corresponde a purificação do produto proteico, diversos procedimentos cromatográficos podem ser utilizados para esta etapa de purificação. Contudo, quando a proteína recombinante é sintetizada em forma de corpos de inclusão insolúveis, é necessário que seja realizada uma etapa de *refolding* para que as proteínas tornem-se solúveis e ativas novamente (GUPTA; SHUKLA, 2017).

Os corpos de inclusão podem ser quantificados com a utilização do reagente *Bradford*. Os corpos de inclusão podem ser isolados por uma técnica de lise celular seguida de centrifugação e lavagem do *pellet* contendo a proteína em corpos de inclusão. Após a extração dos corpos de inclusão pode-se solubilizá-los em meio líquido utilizando fortes agentes desnaturantes e redutores. Após a solubilização dos corpos de inclusão, as amostras podem ser quantificadas com a utilização da técnica de *Bradford* seguida de uma confirmação por SDS-PAGE. (BUCHNER; PASTAN; BRINKMANN, 1992). Pode-se utilizar também quantificação dos corpos de inclusão por técnicas mais sofisticadas como citometria de fluxo (BERSUKER; BRANDEIS; KOPITO, 2016).

2.4.2. Análises de velocidades específicas

Segundo Schmidell et al. (2001) “O estudo cinético de um processo fermentativo consiste inicialmente na análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação.”. Durante os bioprocessos realizados em biorreatores são realizadas análises cinéticas de três principais fatores: a biomassa (X), o produto (P) e o substrato (S). A análise cinética dessas variáveis mostra o perfil de crescimento da biomassa, o perfil de formação do produto e o perfil de consumo do substrato em função do tempo do bioprocesso.

Além de se estudar os valores desses componentes em função do tempo é possível calcular a velocidade específica desses componentes. Denomina-se como μ_x , q_p e q_s as velocidades específicas de formação da biomassa, de formação do produto e de consumo de substrato, respectivamente. Sobre o produto proteico é possível calcular sua velocidade específica de formação durante o bioprocessos por intermédio da **Equação 1**. (SCHMIDELL et al., 2001 apud GADEN, 1955). Essa equação leva em consideração o aumento da biomassa durante o bioprocessos.

Equação 1: Velocidade específica de formação do produto (q_p).

$$q_P = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt}$$

Nota: X e P correspondem à concentração de biomassa e produto (g/L), respectivamente, e t corresponde ao tempo. Entende-se por X a biomassa média calculada no intervalo correspondente a derivada do tempo (dt) em um determinado intervalo. A unidade de medida resultante do cálculo de velocidade específica de formação do produto corresponde a unidade de tempo em horas (h^{-1})

2.5. RT-qPCR

A RT-qPCR (*reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*) é uma tecnologia amplamente utilizada nos estudos de biologia molecular e tornou-se o melhor método para a detecção e quantificação de RNA mensageiro (BUSTIN, 2000; BUSTIN et al., 2009). A técnica de RT-qPCR utiliza a mesma base de funcionamento da PCR convencional, contudo, a sua análise parte inicialmente de moléculas de RNA mensageiro (mRNA) da amostra de interesse. Desta forma, torna-se possível quantificar os níveis da expressão de um gene, ou mesmo detectar se um determinado gene de interesse é ou não é expresso em uma determinada amostra.

A técnica de RT-qPCR converte o mRNA em moléculas de cDNA pela enzima transcriptase reversa, esta é uma etapa necessária uma vez que a reação da PCR utiliza a enzima DNA polimerase para a amplificação das moléculas. A metodologia empregada na reação da transcriptase reversa pode influenciar diretamente a eficiência da reação de RT-qPCR. A etapa de transcrição reversa ocorre utilizando oligonucleotídeos iniciadores randômicos ou específicos, sendo que a escolha de cada metodologia dependerá das condições experimentais. Geralmente utilizam-se oligonucleotídeos iniciadores randômicos em amostras cuja molécula de mRNA alvo encontra-se em baixo número de cópias, ao passo que o uso de primers específicos é utilizado quando a molécula de mRNA alvo apresenta-se em alto número de cópias (BUSTIN et al., 2005). Alguns trabalhos mostram que o uso de uma mistura de oligonucleotídeos iniciadores específicos em uma reação multiplex de transcriptase reversa pode proporcionar uma reação de RT-qPCR mais sensível e adequada, quando comparada a uma reação na qual foram usados oligonucleotídeos iniciadores randômicos para a detecção de pequenas quantidades de mRNA (LI et al., 2008; ZEKA et al., 2016)

A análise realizada na metodologia do RT-qPCR consiste na detecção da fluorescência da amostra que apresenta interação com um fluoróforo. Existem duas estratégias principais para a ligação do fluoróforo na molécula DNA alvo. A primeira estratégia utiliza oligonucleotídeos contendo um fluoróforo e um *quencher*, o *quencher* inibe a transmissão do sinal de fluorescência funcionando como uma espécie de abafador, quando se encontra próximo do fluoróforo. Estes oligos ou sondas são altamente específicos à molécula alvo e pouca ou nenhuma especificidade a outras regiões, tornando esta estratégia altamente específica. A segunda estratégia consiste na utilização de uma ligação de alta afinidade ao sulco menor da fita dupla de DNA, neste caso, qualquer molécula de DNA dupla fita irá reagir com este fluoróforo e o sistema de detecção é considerado não específico (Figura 4) (PFAFFL, 2001). Para o sistema não específico pode-se realizar dois tipos diferentes de quantificação, a quantificação relativa e a quantificação absoluta. A quantificação relativa utiliza uma análise comparativa entre a fluorescência do gene alvo e a fluorescência de um gene endógeno. (LI et al., 2011; PFAFFL, 2001; VENDITTELLI et al., 2015).

Figura 4: Representação esquemática da metodologia não específica utilizada no procedimento de qPCR. (Adaptado de Sakurai e Shibasaki, 2012)

A escolha dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes endógenos influencia diretamente a quantificação dos experimentos. É necessário que os oligonucleotídeos iniciadores sejam sequências de genes que possuam pouca alteração em seus níveis de expressão durante os experimentos, pois a quantificação exige uma associação entre os níveis de expressão do gene alvo e do gene de endógeno. Em *Escherichia coli* os dois genes mais comumente usados em reações de RT-qPCR são o gene da subunidade ribossomal 16S (*rrsA*) e a

subunidade beta do *Integration host factor (ihfB)*, por apresentarem maior estabilidade na sua expressão (ZHOU et al., 2011). Diversos trabalhos mostram que os genes de referência possuem variação na sua expressão em diferentes condições, sendo assim, é importante que se busque constantemente alternativas para a obtenção de novos controles, que apresentem a menor variação possível na reação de RT-qPCR (BHATIA et al., 1994; ZHOU et al., 2011).

Para a quantificação absoluta da transcrição é necessário que se obtenha uma curva padrão que apresente alta especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade (PFAFFL; HAGELEIT, 2001). A curva padrão pode ser realizada com DNA genômico, DNA plasmídeo, RNA e produtos de PCR e deve representar o mesmo padrão de amplificação das amostras, é importante que não existam componentes que possam inibir a eficiência da amplificação de qPCR. Neste caso a confiabilidade da reação de qPCR deve-se a curva padrão utilizada em cada experimento (PFAFFL, 2012).

5. CONCLUSÕES

A partir dos experimentos e ensaios em diferentes concentrações, foi possível encontrar uma similaridade entre a transcrição à velocidade específica de formação do produto proteico (qP), indicando uma possível relação da transcrição com a velocidade de formação de proteína e não necessariamente com a concentração da proteína. Essa informação auxilia na compreensão geral sobre o comportamento da síntese proteica da proteína alvo. Os estudos em frascos agitados promoveram um auxílio na interpretação e na compreensão dos estudos em biorreator. A informação sobre a transcrição mais acentuada em ensaios com temperatura de indução de 37°C auxiliou a tomada de decisão e na condução do ensaio em biorreator, sobretudo na vazão de alimentação na fase de batelada alimentada.

A partir dos experimentos realizados em frascos agitados e em biorreatores pode-se concluir que a transcrição de *Amblyomin-X* não possui relação direta com a concentração de seu produto proteico. Os resultados em diferentes metodologias de cultivo, bem como em diferentes condições de temperatura de indução e concentrações do indutor IPTG não evidenciou qualquer similaridade entre as curvas cinéticas de transcrição e a concentração de *Amblyomin-X*. De certa forma os resultados da correlação de *Pearson* condizem com os dados da literatura indicando uma ausência de correlação entre essas duas variáveis. A transcrição e a síntese proteica de um gene e sua proteína não são dados facilmente associados. Sendo assim, não foi possível quantificar, indiretamente, a proteína *Amblyomin-X* por intermédio de sua transcrição. Contudo as análises da transcrição de *Amblyomin-X* permitiu verificar uma melhor condição de ensaio. Obteve-se melhores resultados de transcrição sob temperatura de 37°C no momento da indução e concentração de IPTG de 2mM. Verificou-se também que após 4 horas de ensaio a taxa de transcrição começa a decair, indicando uma diminuição da velocidade de produção de *Amblyomin-X*.

As análises de correlações realizadas para cada momento após a indução não apresentaram valores significativos, exceto pelo ponto t4 do biorreator 14 evidenciado na Tabela 15.

Não se pôde inferir indiretamente a síntese proteica por intermédio da transcrição, contudo, apesar das conclusões, observou-se que a informação cinética sobre a transcrição de *Amblyomin-X* representa mais um importante parâmetro para auxiliar a conduções dos ensaios em biorreator.

REFERÊNCIAS*

BANEYX, F.; MUJACIC, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1399–1408, 2004.

BASU, A.; LI, X.; LEONG, S. S. J. Refolding of proteins from inclusion bodies: Rational design and recipes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 2, p. 241–251, 2011.

BATISTA, I. F. C. et al. Expressed sequence tags (ESTs) from the salivary glands of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Toxicon**, v. 51, p. 823–834, 2008.

BATISTA, I. F. C. et al. A new Factor Xa inhibitor from *Amblyomma cajennense* with a unique domain composition. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 493, n. 2, p. 151–156, 2010.

BENTLEY, W. E. et al. Plasmid-Encoded Protein : The Principal Factor in the “ Metabolic Burden “ Associated with Recombinant Bacteria. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, p. 668–681, 1990.

BERSUKER, K.; BRANDEIS, M.; KOPITO, R. R. Protein misfolding specifies recruitment to cytoplasmic inclusion bodies. **Journal of Cell Biology**, v. 213, n. 2, p. 229–241, 2016.

BHATIA, P. et al. Comparison of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase and 28S-Ribosomal RNA Gene Expression as RNA Loading Controls for Northern Blot Analysis of Cell Lines of Varying Malignant Potential. **Analytical Biochemistry**, v. 216, n. 1, p. 223–226, 1994.

BIRNBAUM, S.; BAILEY, J. E. Plasmid presence changes the relative levels of many host cell proteins and ribosome components in recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, n. 8, p. 736–745, 1991.

BUCHNER, J.; PASTAN, I.; BRINKMANN, U. A method for increasing the yield of properly folded recombinant fusion proteins: Single-chain immunotoxins from renaturation of bacterial inclusion bodies. **Analytical Biochemistry**, v. 205, n. 2, p. 263–270, 1992.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, n. 2, p. 169–93, 2000.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS.

NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002, 24 p.

BUSTIN, S. A. et al. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 34, p. 597–601, 2005.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines : Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments SUMMARY : **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CARBONELL, X.; VILLAVERDE, A. Protein aggregated into bacterial inclusion bodies does not result in protection from proteolytic digestion. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 23, p. 1939–1944, 2002.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. et al. Toxicon A new tick Kunitz type inhibitor , Amblyomin-X , induces tumor cell death by modulating genes related to the cell cycle and targeting the ubiquitin-proteasome system. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1145–1154, 2010.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. et al. Tick salivary gland as potential natural source for the discovery of promising antitumor drug candidates. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 77, p. 14–19, 2016.

CRONAN, J. E. Escherichia coli as an Experimental Organism. **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1–6, 2005.

DAEGELEN, P. et al. Tracing Ancestors and Relatives of Escherichia coli B, and the Derivation of B Strains REL606 and BL21(DE3). **Journal of Molecular Biology**, v. 394, n. 4, p. 634–643, 2009.

FUTAMI, J. et al. Convenient and efficient in vitro folding of disulfide-containing globular protein from crude bacterial inclusion bodies. **Journal of Biochemistry**, v. 127, n. 3, p. 435–441, 2000.

GLICK, B. R. Metabolic load and heterogenous gene expression. **Biotechnology Advances**, v. 13, n. 2, p. 247–261, 1995.

GOEDDEL, D. V et al. Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 1, p. 106–110, 1979.

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

GÜELL, M. et al. Bacterial transcriptomics: What is beyond the RNA horiz-ome? **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 658–669, 2011.

GUPTA, S. K.; SHUKLA, P. Sophisticated cloning, fermentation, and purification technologies for an enhanced therapeutic protein production: A review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. JUL, p. 1–17, 2017.

ITAKURA, K. et al. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. **Science**, v. 198, n. 4321, p. 1056–1063, 1977.

JAZAYERI, S. H. et al. Comparative Assessment on the Expression Level of Recombinant Human Follicle-Stimulating Hormone (FSH) in Serum-Containing Versus Protein-Free Culture Media. **Molecular Biotechnology**, v. 59, n. 11, p. 1–9, 2017.

JEONG, H. et al. Genome Sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3). **Journal of Molecular Biology**, v. 394, n. 4, p. 644–652, 2009a.

JEONG, H. et al. Genome Sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3). **Journal of Molecular Biology**, v. 394, n. 4, p. 644–652, 2009b.

KILIKIAN, A. K. .; GOMBERT, B. V. A simple way of achieving a high cell concentration in recombinant *Escherichia coli* cultivation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 14, n. 2, 1997.

LARSSON, G.; TÖRNKVIST, M. Rapid sampling, cell inactivation and evaluation of low extracellular glucose concentrations during fed-batch cultivation. **Journal of Biotechnology**, v. 49, n. 1–3, p. 69–82, 1996.

LI, J. et al. Improved RNA quality and TaqMan Pre-amplification method (PreAmp) to enhance expression analysis from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) materials. **BMC biotechnology**, v. 8, p. 10, 2008.

LI, Q. et al. Evaluation of potential reference genes for relative quantification by RT- qPCR in different porcine tissues derived from feeding studies. **International Journal of Molecular**

Sciences, v. 12, n. 3, p. 1727–1734, 2011.

LIN, P. P. et al. Consolidated bioprocessing of cellulose to isobutanol using *Clostridium thermocellum*. **Metabolic engineering**, v. 31, p. 44–52, 2015.

MAMNOON, B. et al. Quality control of widely used therapeutic recombinant proteins by a novel real-time PCR approach. **Iranian Biomedical Journal**, v. 20, n. 1, p. 56–62, 2016.

MARSCHALL, L.; SAGMEISTER, P.; HERWIG, C. Tunable recombinant protein expression in *E. coli* : enabler for continuous processing ? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 13, p. 5719–5728, 2016.

MENZELLA, H. G.; GRAMAJO, H. C.; CECCARELLI, E. A. High recovery of prochymosin from inclusion bodies using controlled air oxidation. **Protein Expression and Purification**, v. 25, n. 2, p. 248–255, 2002.

MIDDELBERG, A. P. J. Preparative protein refolding. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 10, p. 437–443, 2002.

MIROUX, B.; WALKER, J. E. Over-production of Proteins in *Escherichia coli* : Mutant Hosts that Allow Synthesis of some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels. **Journal of Molecular Biology**, v. 260, n. 3, p. 289–298, 1996.

MONOD, J.; JACOB, F. General Conclusions: Teleonomic Mechanisms in Cellular Metabolism, Growth, and Differentiation. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 26, p. 389–401, 1961.

NAUHA, E. K. et al. A new simple approach for the scale-up of aerated stirred tanks. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 95, n. October, p. 150–161, 2015.

NEUBAUER, P.; LIN, H. Y.; MATHISZIK, B. Metabolic load of recombinant protein production: Inhibition of cellular capacities for glucose uptake and respiration after induction of a heterologous gene in *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83, n. 1, p. 53–64, 2003.

PASCAL, L. E. et al. Correlation of mRNA and protein levels: Cell type-specific gene expression of cluster designation antigens in the prostate. **BMC Genomics**, v. 9, n. 1, p. 246, 2008.

PETERNEL, S.; KOMEL, R. Isolation of biologically active nanomaterial (inclusion bodies) from

bacterial cells. **Microbial cell factories**, v. 9, n. 66, p. 1–16, 2010.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT – PCR. **Nucleic**, v. 29, n. 9, p. 16–21, 2001.

PFAFFL, M. W. Quantification Strategies in Real-time RT-PCR (RT-qPCR). In: FILION, M. (Ed.). . **Quantitative Real-time PCR in Applied Microbiology**. [s.l.] Caister Academic Press, 2012. p. 242.

PFAFFL, M. W.; HAGELEIT, M. Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 4, p. 275–282, 2001.

RINAS, U.; HELLMUTH, K.; SANDERS, E. A. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of Escherichia coli. **Journal of Biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 59–65, 1995.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. April, p. 1–17, 2014.

ROZKOV, A. et al. Characterization of the metabolic burden on Escherichia coli DH1 cells imposed by the presence of a plasmid containing a gene therapy sequence. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 909–915, 2004.

RYAN, W.; PARULEKAR, S. J.; STARK, B. C. Expression of beta-lactamase by recombinant Escherichia coli strains containing plasmids of different sizes--effects of pH, phosphate, and dissolved oxygen. **Biotechnology and bioengineering**, v. 34, n. 3, p. 309–19, 1989.

SAKURAI, A.; SHIBASAKI, F. Updated values for molecular diagnosis for highly pathogenic avian influenza virus. **Viruses**, v. 4, n. 8, p. 1235–1257, 2012.

SANTOS, C. A. et al. A novel protein refolding protocol for the solubilization and purification of recombinant peptidoglycan-associated lipoprotein from Xylella fastidiosa overexpressed in Escherichia coli. **Protein Expression and Purification**, v. 82, n. 2, p. 284–289, 2012.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial**. 1. ed. São Paulo, SP, Brasil: [s.n.].

SHUKLA, R.; CHAND, S.; SRIVASTAVA, A. K. Batch kinetics and modeling of gibberellic acid production by Gibberella fujikuroi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 4, p. 492–

497, 2005.

SILVA, F.; QUEIROZ, J. A.; DOMINGUES, F. C. Plasmid DNA fermentation strategies: Influence on plasmid stability and cell physiology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 6, p. 2571–2580, 2012a.

SILVA, F.; QUEIROZ, J. A.; DOMINGUES, F. C. Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 691–708, 2012b.

SKULJ, M. et al. Improved determination of plasmid copy number using quantitative real-time PCR for monitoring fermentation processes. **Microbial Cell Factories**, v. 7, n. 1, p. 6, 2008.

SOUZA, J. G. DE et al. Promising pharmacological profile of a Kunitz-type inhibitor in murine renal cell carcinoma model. **Oncotarget**, v. 7, n. 38, p. 62255–62266, 2016.

STEINHOFF, R. F. et al. High-throughput nucleoside phosphate monitoring in mammalian cell fed-batch cultivation using quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Biotechnology Journal**, v. 10, n. 1, p. 190–198, 2015.

STUDIER, F. et al. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods in enzymology**, v. 185, p. 60–89, 1990.

VALAX, P.; GEORGIU, G. Molecular characterization of beta-lactamase inclusion bodies produced in *Escherichia coli*. 1. Composition. **Biotechnology progress**, v. 9, p. 539–547, 1993.

VENDITTELLI, F. et al. Absolute quantitative PCR for detection of molecular biomarkers in melanoma patients: a preliminary report. **Clinica chimica acta**, v. 444, p. 242249, 2015.

VIEIRA, S. M. et al. Heterologous expression of the antimyotoxic protein DM64 in *Pichia pastoris*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1–20, 2017.

VOGEL, C.; MARCOTTE, E. M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 4, p. 227–232, 2012.

ZEKA, F. et al. Straightforward and sensitive RT-qPCR based gene expression analysis of FFPE samples. **Scientific reports**, v. 6, n. February, p. 21418, 2016.

ZHOU, K. et al. Novel reference genes for quantifying transcriptional responses of Escherichia coli to protein overexpression by quantitative PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 12, n. 1, p. 18, 2011.