



AVALIAÇÃO POR PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS DOS EFEITOS
DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA E DAS VARIÁVEIS DE INDUÇÃO NA EXPRESSÃO DE
PNEUMOLISINA DE *Streptococcus pneumoniae* EM *Escherichia coli*

Guillermo Marini

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadores: Tito Lívio Moitinho Alves
Ariane Leites Larentis
Marco Alberto Medeiros

Rio de Janeiro
Janeiro de 2011

AVALIAÇÃO POR PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS DOS EFEITOS
DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA E DAS VARIÁVEIS DE INDUÇÃO NA EXPRESSÃO DE
PNEUMOLISINA DE *Streptococcus pneumoniae* EM *Escherichia coli*

Guillermo Marini

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM
ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

Prof. Helen Conceição Ferraz, D.Sc.

Dra. Ariane Leites Larentis, D.Sc.

Dr. Marco Alberto Medeiros, D.Sc.

Prof. Rodrigo Volcan Almeida, D.Sc.

Dr. Celso Raúl Romero Ramos, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

JANEIRO DE 2011

Marini, Guillermo

Avaliação por planejamento de experimentos dos efeitos da composição do meio de cultura e das variáveis de indução na expressão de pneumolisina de *Streptococcus pneumoniae* em *Escherichia coli*. Guillermo Marini. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2011.

XIX, 103 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Tito Lívio Moitinho Alves

Ariane Leites Larentis

Marco Alberto Medeiros

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2011.

Referências Bibliográficas: p. 88-98.

1. Expressão de proteína recombinante. 2. rPly
3. *Escherichia coli*. 4. Planejamento de Experimentos.
5. Otimização da Expressão. I. Alves, Tito Lívio Moitinho
et al. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE,
Programa de Engenharia Química. III. Título.

Dedico este trabajo a mi familia, por el incentivo y complicidad, en las horas más precisas. En especial, a mis padres, quienes me dieron el ejemplo de la perseverancia y del camino del crecimiento personal.

“Todo país que desejar sobreviver no mundo do terceiro milênio,
precisa de cientistas de alto nível”
(Cesar Milstein)

AGRADECIMENTOS

Embora uma dissertação seja, pela sua finalidade acadêmica, um trabalho individual, há contribuições de natureza diversa que não podem nem devem deixar de ser realçadas. Por essa razão, é para mim um verdadeiro prazer utilizar este espaço para ser justo e conseqüente com as pessoas e instituições que facilitaram as coisas para a concretização deste trabalho, expressando-lhes meus agradecimentos.

Aos meus orientadores, Ariane, Marco e Tito pela sua generosidade ao me disponibilizarem a oportunidade de recorrer a sua capacidade e experiência científica, em um prova de confiança, afeto e amizade, fundamentais para a concretização deste trabalho. Agradeço pela motivação permanente assim como também pela atenção disponibilizada durante o trabalho.

Aos doutores Marco Alberto Medeiros e Ariane Leites Larentis por terem disponibilizado a estrutura do Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) – Bio-Manguinhos/Fiocruz e fornecido todo o suporte para a realização deste trabalho. Agradeço também ao pessoal do LATER pelo auxílio neste trabalho, em especial à Júlia, pela ajuda essencial em vários experimentos na etapa inicial.

Ao pessoal do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ pela ajuda oferecida ao longo do mestrado, pois sempre tiveram respostas a todos os meus requerimentos, desde os mais simples até os mais complexos.

Ao pessoal do Laboratório de Tecnologia Imunológica (LATIM) – Bio-Manguinhos/Fiocruz, em especial à Andréa Marques Vieira da Silva, pela disponibilização do leitor de placas para avaliação da atividade hemolítica. Ao Laboratório de Produtos Biológicos – INCQS/Fiocruz, por disponibilizar os equipamentos e o espaço para realização das análises de densitometria.

Faço uma menção de reconhecimento aos distintos colegas que tive a oportunidade de conhecer no Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ. Aos colegas do Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares (LECC) – PEQ –

UFRJ, Marcela, Ester, Daniel Ribeiro e Tait, Paola, Joyce, Elsayed, Fernanda Morales e Bittencourt, e à Maíra em especial pela sua permanente ajuda, em todas as ocasiões que precisei dela, mas principalmente na última etapa do mestrado. Aos pesquisadores do Centro de Ingeniería Genética y Biotecnológica de Cuba, Osnel García e Oliberto Ramos pela sua amizade e disposição para me transmitir seus valiosos conhecimentos e experiências. Aos meus novos colegas de trabalho do Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais (LATAM) – Bio-Manguinhos/Fiocruz, pela ajuda geral na correção de meu português, em especial à Aline e à Sheiva.

Aos grandes amigos que ganhei aqui no Rio de Janeiro, particularmente ao Aldo, Claudia, Elis, Fabio, Felipe, Gisele, Karen e Lívia, pelos grandes momentos compartilhados ao longo destes anos no Rio. Ao Felipe e à Elis, pela prezada ajuda e por terem me “adotado” nesta última etapa do mestrado.

Também agradeço aos dois argentinos, Mercedes e Andrés, por estar comigo desde o primeiro momento que cheguei ao Rio de Janeiro. Agradeço de coração o grande apoio, principalmente logo no início, quando tudo foi muito difícil.

E finalmente, quero agradecer e reconhecer a minha família acima de tudo, que de alguma forma sempre está presente. Aos meus pais por toda a força, dedicação e pelo incentivo para que nunca desista dos meus sonhos, por mais arriscados que estes possam parecer. Seu unestimável apoio preencheu as diversas falhas que fui tendo por força das circunstâncias ao longo deste tempo. A vinda para o Brasil, embora tenha sido uma das melhores experiências de vida que já tive, não foi fácil nem para mim nem para eles. Por isso, muito obrigado por tudo o que fizeram e ainda fazem por mim. Lamento que eles não possam estar aqui para poder participar da concretização desta etapa que tantos esforços requereu.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

AVALIAÇÃO POR PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS DOS EFEITOS
DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA E DAS VARIÁVEIS DE INDUÇÃO NA EXPRESSÃO
DE PNEUMOLISINA DE *Streptococcus pneumoniae* EM *Escherichia coli*

Guillermo Marini

Janeiro/2011

Orientadores: Tito Lívio Moitinho Alves

Ariane Leites Larentis

Marco Alberto Medeiros

Programa: Engenharia Química

Várias doenças graves, incluindo pneumonia, septicemia e meningite são causadas pelo *S. pneumoniae*. A Organização Mundial de Saúde estima que a pneumonia causa em torno de 1,9 milhões de mortes por ano em crianças menores de cinco anos de idade. Portanto, o desenvolvimento de uma vacina composta por proteínas é uma alternativa para resolver este problema. Para avaliar os efeitos de oito variáveis relacionadas com a composição do meio de cultura e com as condições de indução da expressão de pneumolisina solúvel do *S. pneumoniae* em *E. coli*, um desenho fatorial 2^{8-4} foi realizado. A expressão da pneumolisina de forma solúvel foi avaliada pela determinação da atividade hemolítica, e as diferentes condições avaliadas foram comparadas por análise estatística. A condição definida, validada em triplicata, foi de indução da expressão em 0,8 (medido em absorbância 600nm) com 0,1mM IPTG durante 4h a 25 °C, em meio com 5g/L extrato de levedura, 5g/L triptona, 10g/L NaCl, 1g/L glicose, com adição de 30µg/mL canamicina e sem glicerol. A atividade hemolítica obtida foi a maior comparada com aquelas dos experimentos iniciais. Assim, a metodologia de planejamento experimental permitiu reduzir os custos operacionais, mantendo a expressão de Ply solúvel em *E. coli* no nível máximo.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

EVALUATION BY EXPERIMENTAL DESIGN OF EFFECTS OF
MEDIUM COMPOSITION AND INDUCTION VARIABLES ON THE EXPRESSION
OF PNEUMOLYSIN OF *Streptococcus pneumoniae* IN *Escherichia coli*

Guillermo Marini

January/2011

Advisors: Tito Lívio Moitinho Alves
Ariane Leites Larentis
Marco Alberto Medeiros

Department: Chemical Engineering

S. pneumoniae causes several serious diseases including pneumonia, septicaemia and meningitis. World Health Organization estimates pneumonia causes approximately 1.9 million deaths per year in children under five years of age. Therefore, the development of a vaccine composed of proteins is an alternative to overcome this problem. To study the effects of eight variables, related with medium composition and induction conditions, on the soluble expression of pneumolysin of *S. pneumoniae* in *E. coli*, a 2^{8-4} factorial design was applied. Soluble expression of pneumolysine was evaluated by hemolytic activity assay, and statistical analysis was done to compare the different assessed conditions. The defined condition, validated in triplicate, was inducing the expression at 0.8 (measured by absorbance at 600nm) with 0.1mM IPTG during 4h at 25°C in a 5g/L yeast extract, 5g/L tryptone, 10g/L NaCl, 1g/L glucose medium, with addition of 30ug/mL kanamycin and without glycerol. The hemolytic activity obtained was the highest activity when compared with the ones in the initial experiments. Thus, the experimental design methodology allowed reducing operational costs, keeping the soluble expression of Ply in *E. coli* at the highest level.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS	xviii
1.- INTRODUÇÃO	1
2.- REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 - <i>Streptococcus pneumoniae</i> e a infecção pneumocócica.	5
2.2 - Grupos e fatores de risco.	7
2.3 - Estrutura de <i>S. pneumoniae</i> .	8
2.4 - Fatores de virulência.	9
2.5 - Tratamento das infecções de <i>S. pneumoniae</i> .	17
2.6 - Processo de expressão.	20
2.7 - Planejamento de experimentos.	23
2.7.1 - Planos fatoriais completos e fracionados.	23
2.8 - Objetivo de trabalho.	27
3.- MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 - Lote de trabalho e curvas de crescimento.	29
3.2 - Construção do plano fatorial fracionado e definição das variáveis avaliadas no planejamento experimental.	30
3.3 - Ordem de realização dos experimentos.	35
3.4 - Expressão da pneumolisina recombinante.	37
3.5 - Determinação da solubilidade da pneumolisina.	39

3.5.1 - <i>Preparação das amostras.</i>	39
3.5.2 - <i>Teste de Atividade Hemolítica.</i>	40
3.5.2.1 - <i>Desenvolvimento da Metodologia.</i>	40
3.5.2.1.1 - <i>Método do ponto final.</i>	41
3.5.2.1.2 - <i>Método Cinético.</i>	47
3.6 - <i>Determinação da glicose nos sobrenadantes dos cultivos.</i>	49
3.7 - <i>Determinação do glicerol nos sobrenadantes dos cultivos.</i>	51
3.8 - <i>Avaliação qualitativa da expressão por géis SDS-PAGE.</i>	52
3.9 - <i>Determinação da velocidade específica de crescimento.</i>	53
4. - RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1 - <i>Experimentos de expressão da proteína pneumolisina.</i>	54
4.2 - <i>Avaliação do crescimento celular.</i>	56
4.3 - <i>Avaliação do pH final do meio de cultivo.</i>	61
4.4 - <i>Avaliação da atividade biológica.</i>	65
4.5 - <i>Avaliação da produtividade.</i>	72
4.6 - <i>Validação da condição definida pelo planejamento de experimentos - Estudo da cinética de produção da proteína.</i>	74
4.7 - <i>Comparação da condição definida a 25 °C e a 30 °C.</i>	78
5.- CONCLUSÕES	84
6.- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
APÊNDICE A	99
APÊNDICE B	100
APÊNDICE C	101
APÊNDICE D	103

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** A pneumonia é a maior causa de mortalidade infantil em todas as regiões do mundo. Adaptado de WARDLAW *et al.* (2006). 6
- Figura 1.2** Distribuição global das principais causas de morte em crianças menores de cinco anos. Adaptado de WARDLAW *et al.* (2006). 7
- Figura 1.3** Imagem de microscopia de varredura eletrônica do *S. pneumoniae*. O microorganismo está formando um diplococo. O contorno do microorganismo de cor mais escura é a cápsula polissacarídica, camada mais densa (PLETZ *et al.*, 2008). 8
- Figura 1.4** Esquema dos fatores de virulências que apresenta *S. pneumoniae* na superfície como também no espaço citoplasmático (JEDRZEJAS, 2001). 11
- Figura 1.5.** Estrutura monomérica da Ply, com 4 domínios globulares. O domínio 1 (azul) é a região amino terminal, enquanto que o domínio 4 (amarelo) é a região carboxí terminal. O domínio 4 apresenta uma região rica em resíduos de triptofano que estão envolvidos na interação com a membrana celular. O domínio 3 apresenta duas regiões (vermelha e laranja); uma delas consiste em 3 pequenas α hélices (laranja), próximas ao domínio 2 (verde), onde sofrem um reorganização para uma configuração em agulha β , podendo assim atravessar a membrana plasmática durante a formação do poro (GILBERT *et al.*, 1999, TILLEY 2005, SONNEN 2008). 15
- Figura 1.6.** Mudança estrutural da pneumolisina estando ancorada na membrana celular. O domínio 3 apresenta uma estrutura conformacional de 3 pequenas α hélices (A - laranja), próximas ao domínio 2 (verde), quando esta formando o complexo pré-poro (B). Essas estruturas sofrem uma reorganização para uma configuração em agulha β (C), podendo assim atravessar a membrana plasmática durante a formação do poro (D) (Adaptado de TILLEY *et al.*, 2005). 16

Figura 1.7 Esquema da atuação simplificada das chaperonas moleculares no enovelamento das proteínas em <i>Escherichia coli</i> (Adaptado por LARENTIS <i>et al.</i> , 2006).	21
Figura 3.1 Esquema dos procedimentos realizados nos experimentos de expressão e análise de solubilidade da proteína.	37
Figura 3.2 Esquema dos procedimentos realizados para a análise de viabilidade celular.	38
Figura 3.3 Esquema das diluições feitas numa microplaca de 96 poços. Nas filas A e B da placa são feitas as curvas do padrão de hemólise, mediante diluições seriadas ao 1/2 com tampão TEN. As curvas começam com 1UH/mL. Nas filas C, D, E, F, e G são feitas as curvas das amostras com pneumolisina, mediante diluições seriadas ao 1/2 com tampão TEN. As curvas começam com uma diluição de 1/50. Na coluna 12 estão os controles negativos de cada fila.	43
Figura 3.4 Exemplo de microplaca após o período de incubação. Nos primeiros poços das filas pode se perceber hemólise completa e, portanto, sem formação de precipitados de hemácias. Já nos poços da metade até o final da fila apresentam formação de precipitados de hemácias. Os precipitados são maiores quanto mais diluídas são as amostras de pneumolisina. Nos poços últimos das filas estão os controles negativos.	44
Figura 3.5 Exemplo de microplaca com os sobrenadantes. Nos primeiros poços onde as amostras estão mais concentradas, a hemólise é maior e, portanto o sobrenadante apresenta maior quantidade de hemoglobina livre o que determina que a cor vermelha seja mais intensa. Nas sucessivas diluições das amostras de pneumolisina, a lise celular vai sendo gradativamente menor e, portanto, a quantidade de hemoglobina livre também é menor, o que determina que a cor vermelha seja menos intensa.	44

Figura 3.6 Varredura do comprimento de onda para avaliar os picos máximos de absorvância e a variabilidade que apresenta na medição por duplicata de uma mesma amostra. A seta mostra o comprimento de onda escolhido.

45

Figura 3.7 Gráfico da curva padrão (—■—) e das curvas de 3 amostras (—●—; —▲—; —★—). O eixo inferior indica a atividade hemolítica do padrão em escala logarítmica; o eixo superior mostra as diluições das amostras em escala logarítmica; os eixos direito e esquerdo correspondem à absorvância. As linhas pontilhadas de cor laranja indicam a região de linearidade escolhida para a determinação da atividade hemolítica das amostras. Para um determinado valor de absorvância (Abs), da curva padrão pode se conhecer a atividade hemolítica do padrão (A_{Abs}) (seta laranja que desce até o eixo da atividade hemolítica); para esse mesmo valor de absorvância Abs, das curvas de amostras 1, 2, e 3 podem se conhecer as diluições (D) correspondentes a essa Abs (D_{Abs^1} ; D_{Abs^2} ; D_{Abs^3}). Os valores das atividades hemolítica das amostras 1, 2, e 3, são obtidos dividindo A_{Abs} por D_{Abs^1} , D_{Abs^2} , e D_{Abs^3} respectivamente.

46

Figura 3.8 O gráfico mostra a queda da turbidez por causa da hemólise das hemácias. A medição de absorvância foi a 600nm. A curva da cinética de hemólise apresenta três partes, um platô superior, seguida de uma queda da turbidez, e finalmente um valor de absorvância inferior (platô inferior). Dependendo da concentração de pneumolisina presente na amostra, pode ou não se observar o platô inferior.

49

Figura 3.9 Esquema das reações que acontecem no processo oxidativo da glicose.

50

Figura 3.10 Reações enzimáticas do processo de dosagem de Glicerol.

51

Figura 4.1 Gel de SDS-PAGE 12,5% dos extratos protéicos totais obtidos do processo total da expressão da proteína Ply por *E. coli* BL21 Star (DE3). M, padrão de massa molecular; 1, 3, 5, e 7, amostras do extrato total não

induzido, dos experimentos 9, 10, 11, e 12 respectivamente; **2, 4, 6, e 8**, amostras do extrato total no final do processo dos experimentos 9, 10, 11, e 12, respectivamente. Os experimentos 9 e 11 são com nível +1 de concentração de glicose; os experimentos 10 e 12 são com nível -1 de concentração de glicose. As amostras foram normalizadas por Abs_{600nm}. 64

Figura 4.2 Gel de SDS-PAGE 12,5% dos extratos protéicos totais e de suas frações, solúvel e insolúvel, obtidos através da expressão da proteína Ply por *E. coli* BL21 Star (DE3) a 25°C, 31°C, e 37°C. **M**, padrão de massa molecular; **1, 2 e 3**, amostras do extrato total, fração solúvel, e fração insolúvel da expressão da Ply a 25°C, respectivamente; **4, 5 e 6**, amostras do extrato total, fração solúvel, e fração insolúvel da expressão da Ply a 31°C, respectivamente; **7, 8 e 9**, amostras do extrato total, fração solúvel, e fração insolúvel da expressão da Ply a 37°C, respectivamente. As amostras a 25°C, 31°C, e 37°C, correspondem respectivamente aos experimentos 9, 17, e 8 do planejamento fatorial fracionado usado. As amostras aplicadas no gel foram normalizadas por Abs_{600nm}. 70

Figura 4.3 Cinética do crescimento celular e da expressão da pneumolisina biologicamente ativa na condição definida a 25°C. 76

Figura 4.4 Cinética do crescimento celular e da expressão da pneumolisina biologicamente ativa na condição definida a 30°C. 80

Figura 4.5 Gel em SDS-PAGE 12,5% dos extratos protéicos totais e de suas frações, solúvel e insolúvel, obtidos através da expressão da proteína Ply por *E. coli* BL21 Star (DE3) na validação a 25°C e a mesma condição de validação a 30°C. **M**, padrão de massa molecular; **1, 2, e 3**, amostras do extrato total, fração solúvel, e fração insolúvel da expressão da Ply no final do processo a 25°C, respectivamente; **4, 5 e 6**, amostras do extrato total, fração solúvel, e fração insolúvel da expressão da Ply, no final do processo a 30°C, respectivamente. 82

LISTA DE TABELAS

- Tabela 3.1** Plano fatorial fracionado empregado. V1=Absorbancia na indução, V2=Concentração do indutor, V3=Temperatura de indução, V4=Concentração de extrato de levedura, V5=Concentração de triptona, V6=Concentração de glicose, V7=concentração de glicerol, V8=concentração de canamicina. Para a geração deste plano foram feitas as combinações: V5=V2xV3xV4, V6=V1xV3xV4, V7=V1xV2xV3, e V8=V1xV2xV4. O plano fatorial inclui 16 condições experimentais diferentes, e oito replicas do ponto central (PC). Entre parênteses os valores normalizados das variáveis. 35
- Tabela 3.2** Ordem de realização dos diferentes conjuntos de experimentos com seus respectivos controles. 37
- TABELA 4.1** Respostas obtidas mediante o planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} com oito réplicas do ponto central. As respostas avaliadas foram Atividade Hemolítica da rPly (UH/mL), Crescimento Celular ao final do processo (Abs), e Atividade Hemolítica em relação ao tempo total do processo de expressão da rPly (UH/mL/min). 55
- Tabela 4.2** Efeitos das variáveis sobre o crescimento celular. Os fatores em negrito apresentaram significância estatística com um nível de confiança de 90% ($p < 0,1$). 57
- Tabela 4.3** Respostas avaliadas mediante o planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} com oito replicas do ponto central apresentado na seção 2. As respostas avaliadas foram pH final dos meios de cultivos e concentração final de glicose no meio de cultivo (g/L). 62
- Tabela 4.4** Efeitos das variáveis sobre o pH final dos meios. Os fatores em negrito apresentaram significância estatística com um nível de confiança de 90% ($p < 0,1$). 63

Tabela 4.5 Efeitos das variáveis sobre a atividade hemolítica. Os fatores em negrito apresentaram significância estatística com um nível de confiança de 90% ($p < 0,1$).	66
Tabela 4.6 Níveis de expressão da pneumolisina em três condições diferentes de temperatura pós-indução (25 °C, 31 °C, e 37 °C) nos extratos solúveis e insolúveis com seus valores obtidos na desintometria de banda e os respectivos percentuais em relação ao extrato total.	71
Tabela 4.7 Efeitos das variáveis sobre a produtividade. Em negrito estão indicados os fatores que apresentaram significância estatística com um nível de confiança de 90% ($p < 0,1$).	73
Tabela 4.8 Crescimento celular dos experimentos de validação do planejamento fatorial.	75
Tabela 4.9 Concentração de Ply recombinante produzida ao longo das 4 horas de expressão nos experimentos da validação.	75
Tabela 4.10 Rendimento por célula (UH/mL/Abs) ao longo do tempo de indução a 25 °C.	77
Tabela 4.11 Crescimento celular dos experimentos do processo definido a 30 °C.	79
Tabela 4.12 Concentração de Ply recombinante produzida ao longo das 4 horas de expressão nos experimentos a 30 °C.	80
Tabela 4.13 Rendimento por célula (UH/mL/Abs) ao longo do tempo de indução a 30 °C.	81

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
4-AF	4-Aminoantipirina
A _{Abs}	Atividade Hemolítica da curva padrão na absorbância Abs
Abs	Absorbância
Abs _{540nm}	Absorbância a 540nm
Abs _{600nm}	Absorbância a 600nm
ADP	Adenosine Di-Fosfato
AMPc	Adenosine Mono-Fosfato cíclico
ATP	Adenosine Tri-Fosfato
cm	Centímetro
CRM 197	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> C7 / β197
D	Diluição
D _{Abs} ¹	Diluição da curva 1 na absorbância Abs
dL	Decilitros
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Fc	Fração constante das imunoglobulinas
g	Gramma
GSK	GlaxoSmithKline Biologicals
GOD	Glicose Oxidase
GST	Glutathione-S-transferase
h	Hora
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance/pressão
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactosídeo
kDa	Kilodaltons
L	Litro
LB	(Luria-Bertani)
LMW	<i>Low Molecular Weight</i>
M	Padrão de massa molecular

mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>p</i>	<i>p</i> -valor
PBS	Tampão fosfato salina
PC	Ponto Central
PCV-7	Vacina conjugada heptavalente
Ply, rPly	Pneumolisina (recombinante)
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de Eletroforese Desnaturante de Poliacrilamida
t	Tempo
TB	<i>Terrific Broth</i>
TEN	Tris – EDTA – NaCl
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UH	Unidade Hemolítica
UV	Ultravioleta
V	Volt
v/v	Volume/volume
X	Biomassa
μ	Taxa específica de crescimento celular
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromol

1.- INTRODUÇÃO

A bactéria *Streptococcus pneumoniae*, que normalmente habita as vias respiratórias altas dos seres humanos saudáveis, encontra-se entre as principais prioridades como problema de saúde pública nos países desenvolvidos, assim como nos países em desenvolvimento. Ela é responsável por uma grande variedade de doenças que comprometem o aparelho respiratório superior e inferior, sendo o principal agente etiológico de infecções como otite média, sinusite aguda, pneumonia, meningite e septicemia (PRADO, 2001, ALVAREZ DE LUNA *et al.*, 2005, FELDMAN e ANDERSON, 2008).

Dados da Organização Mundial da Saúde indicam que a pneumonia foi responsável pela morte de aproximadamente 1,9 milhões de crianças menores de 5 anos de idade em 2007 - mais que AIDS, malária e tuberculose em conjunto - e uma quantia similar de pessoas maiores de 60 anos no mundo inteiro, sendo a maioria dos casos em países em desenvolvimento (OMS, 2010). A maioria dessas mortes é causada por *S. pneumoniae* como agente único ou associado a vírus respiratórios, demonstrando o grande impacto que produz na saúde pública do mundo inteiro (PRADO, 2001, ALVAREZ DE LUNA *et al.*, 2005, OMS 2010).

Nas últimas décadas, o impacto das infecções causadas por *S. pneumoniae* se agravou como consequência tanto da mudança na epidemiologia das infecções por este agente, principalmente em países em desenvolvimento, como do contínuo surgimento de cepas resistentes à penicilina, antibiótico que constitui o tratamento por eleição, como também a outros antibióticos como as cefalosporinas de terceira geração, cloranfenicol e cotrimoxazol (PRADO, 2001).

Sendo os humanos os únicos portadores de *S. pneumoniae*, teoricamente é possível erradicar esta bactéria mediante tratamentos que favoreçam sua eliminação, da mesma forma que aconteceu com a varíola humana (PLETZ *et al.*, 2008). Devido ao emprego de tratamentos terapêuticos com antibióticos não ter conseguido erradicar o microorganismo, recorreu-se aos tratamentos profiláticos

preventivos como a vacinação, a qual promove no organismo humano o desenvolvimento da imunidade adaptativa profilática contra esse agente patogênico, permitindo ao humano se proteger contra futuras infecções.

As cepas virulentas da bactéria produzem uma espessa cápsula polissacarídea, altamente heterogênea entre os sorotipos existentes, a qual constitui o principal fator de virulência antigênica. Os adultos e crianças de mais de 4-5 anos de idade são capazes de desenvolver imunidade contra esses antígenos, seja por uma infecção prévia, seja por vacinação (ALONSO DE VELASCO *et al.*, 1995). A imunidade desenvolvida desta forma confere proteção contra infecções posteriores. Baseando-se neste conceito, vacinas que incluem um número limitado de polissacarídeos correspondentes aos sorotipos prevalentes foram desenvolvidos nas últimas décadas, embora a grande heterogeneidade que apresenta a cápsula seja um grande obstáculo para desenvolver uma vacina universal (BAROCCHI *et al.*, 2007).

Atualmente, existem duas vacinas dominantes no mercado compostas por polissacarídeos capsulares: Pneumovax (Merck), constituída unicamente por polissacarídeos, e Prevnar (Wyeth), constituída por polissacarídeos conjugados a proteínas carreadoras. A vacina Pneumovax é capaz de induzir boa proteção em pessoas de mais de 2 anos de idade, pois crianças abaixo de dois anos não apresentam capacidade de induzir resposta imune dependente das células T, nem de gerar linfócitos B de memória, necessária para uma boa proteção (BOGAERT *et al.*, 2004, BRAIDO *et al.*, 2008, PLETZ *et al.*, 2008, SCHACHERN *et al.*, 2009). A Prevnar é uma vacina de polissacarídeos conjugados a proteínas, que apresenta proteção efetiva em longo prazo (BRAIDO *et al.*, 2008). Ela tem se mostrado eficaz em crianças dos países desenvolvidos (~90%), mas não nos países ditos em desenvolvimento, onde mostrou ter uma cobertura limitada de sorotipos além de ter um custo elevado de produção para poder ser incluída nos programas nacionais de vacinação na maioria destes países (BOGAERT *et al.*, 2004, BAROCCHI *et al.*, 2007, GARCÍA-SUÁREZ *et al.*, 2006; OMS, 2007). Até o presente, poucos países incluíram vacinas pneumocócicas conjugadas em seus programas nacionais de imunização (OMS, 2010). O Brasil, através de um acordo de transferência tecnológica com a empresa multinacional *GlaxoSmithKline Biologicals* (GSK),

passou a fazer parte deste grupo a partir do ano 2010 (MINISTERIO DE SAÛDE DO BRASIL, 2010).

Embora existam no mercado várias vacinas conjugadas polissacarídicas para a prevenção de doenças pneumocócicas, nas últimas décadas vários grupos de pesquisa têm investigado diversas proteínas associadas à virulência de *S. pneumoniae* como potenciais antígenos candidatos a vacinas baseadas em proteínas, como também para substituir as proteínas usadas em conjugação com os polissacarídeos nas vacinas conjugadas, e assim aumentar a cobertura dessa vacina. A imunização com essas proteínas, em combinação umas com outras ou em conjugação com polissacarídeos capsulares, tem apresentado altos níveis de proteção em modelos animais contra os diversos sorotipos de *S. pneumoniae*, uma vez que, em geral, estes alvos são altamente conservados em todos eles (TAI, 2006, BAROCCHI *et al.*, 2007, SCHACHERN *et al.*, 2009).

A pneumolisina (Ply) é uma proteína citoplasmática formadora de poros transmembranares produzindo lise celular (SCHACHERN *et al.*, 2009). Existem evidências suficientes que indicam a Ply como um importante fator de virulência pneumocócica na pneumonia, assim como também na disseminação extra pulmonar do *S. pneumoniae*. Esta proteína tem a capacidade de destruir as células alveolares, inibir o movimento ciliar do epitélio respiratório, e reduzir a migração das células polimorfonucleares fagocíticas. As ações citotóxicas da Ply no endotélio pulmonar e nas células epiteliais alveolares facilitam a penetração do *S. pneumoniae* desde os alvéolos até o interstício, e logo à corrente sanguínea (KANCLERSKI e MÖLLBY, 1987, FELDMAN e ANDERSON, 2008). Foi demonstrado que os anticorpos contra a Ply neutralizam os efeitos tóxicos e bloqueiam *in vitro* a ativação do sistema complemento (um dos mecanismos efetores mais importantes da resposta imune inata). A vantagem da Ply como antígeno de uma vacina é sua seqüência conservada e antigenicidade entre os diferentes sorotipos isolados clinicamente (BAROCCHI *et al.*, 2007).

Através do emprego das técnicas de engenharia genética e com o conhecimento dos genomas dos diversos sorotipos da bactéria, podem ser desenvolvidas tecnologias e sistemas de expressão para a produção destes

antígenos como alvos para compor uma vacina contra *S. pneumoniae*. A escolha do sistema de expressão para a produção de proteínas recombinantes depende de vários fatores. Eles incluem as características do crescimento celular, os níveis de expressão, a expressão intracelular ou extracelular, as modificações pós-traducionais, e a atividade biológica da proteína de interesse, assim como as questões relacionadas à legislação em vigor para a produção de proteínas terapêuticas. Além disso, a escolha de um sistema adequado de expressão deve levar em consideração os custos de processo. As diversas vantagens que *Escherichia coli* tem demonstrado como sistema hospedeiro de expressão de proteínas heterólogas, como, por exemplo, sua habilidade de crescer rapidamente em altas concentrações celulares e em substratos baratos, sua genética ser bem estabelecida e de existirem diversos vetores de clonagem como também diversas cepas para expressão (SØRENSEN e MORTENSEN, 2005, PETI e PAGE, 2007, CHOI et al., 2006), faz desse sistema hospedeiro um dos mais utilizados para a produção em grande escala de produtos recombinantes, com rendimentos e produtividades em níveis consideravelmente elevados (JANA e DEB, 2005, CHOI et al., 2006).

Nestes sistemas, a concentração de produto obtido pode variar de algumas até dezenas de miligramas por litro, dependendo da natureza da proteína expressa e das condições de processo empregadas. Desta forma, a estratégia de alimentação, aeração, composição do meio e fontes de carbono na alimentação, temperatura, concentração dos antibióticos influenciam no cultivo de *E. coli*, uma vez que permitem controlar o metabolismo celular e evitar a formação de produtos indesejáveis, além de controlar/evitar a formação de corpos de inclusão (ALBA e CALVO, 2000; SØRENSEN e MORTENSEN, 2005; PETI e PAGE, 2007).

Pelo previamente descrito, nesta dissertação de mestrado, é proposto o desenvolvimento de um processo de produção da proteína Ply recombinante de forma solúvel escolhendo como sistema de expressão heteróloga a bactéria *E. coli*. Para isto, planejamento experimental foi empregado, permitindo avaliar os efeitos de diferentes variáveis associadas às condições de indução e de meio de cultura na produção da proteína, buscando o aumento dos níveis de produção da proteína solúvel e a redução de custos de processo.

2.- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - *Streptococcus pneumoniae* e a infecção pneumocócica.

Streptococcus pneumoniae é uma bactéria Gram-positiva alfa-hemolítica do gênero *Streptococcus* pertencente à família Streptococcaceae. Este agente patogênico é membro da flora comensal do trato respiratório superior, colonizando as mucosas da nasofaringe e orofaringe de seres humanos saudáveis, portadores assintomáticos desse microorganismo (GARCIA SUARES *et al.*, 2006, VIEIRA *et al.*, 2007). Encontra-se presente em 60% das crianças saudáveis e em 30% dos adultos saudáveis. As crianças geralmente adquirem uma sucessão de sorotipos logo no começo da vida e são os propagadores primários do microorganismo às populações mais vulneráveis. Normalmente o sistema imunológico de humanos saudáveis impede que a colonização no trato respiratório avance para a infecção dos tecidos e, assim, ponha em risco a vida do portador (GARCIA SUARES *et al.*, 2006). No entanto, a alteração do equilíbrio homeostático patógeno - hospedeiro está associada à infecção dos tecidos e, por conseguinte, com o desenvolvimento de doenças graves como pneumonia (infecção respiratória aguda nos pulmões, com geração de pus e líquido neles, tornando difícil o processo de captação do oxigênio), septicemia (infecção que pode progredir rapidamente para choque séptico e falência de múltiplos órgãos devido à deficiência do oxigênio) e meningite (infecção que causa inflamação das membranas que envolvem o cérebro e a medula espinhal). *S. pneumoniae* também é a principal causa de doenças não invasivas e menos severas como a otite média aguda, a peritonite e a sinusite (BAROCCHI *et al.*, 2007).

Em geral, 30% a 40% das otites médias agudas, 40% das sinusites agudas e 60% das pneumonias bacterianas adquiridas são produzidas por *S. pneumoniae* (ÁLVARES DE LUNA *et al.*, 2005). Entre as principais síndromes clínicas associadas às infecções pneumocócicas, a pneumonia é a de maior importância em relação à morbidade (taxa de portadores de determinada doença em relação à população total estudada, em determinado local e em determinado momento) e à mortalidade total. Estima-se que a incidência de pneumonia em crianças com menos de cinco

anos de idade seja de 0,29 casos por criança-ano nos países em desenvolvimento e 0,05 casos por criança-ano em países desenvolvidos. Isso se traduz em aproximadamente 156 milhões de novos casos cada ano no mundo inteiro, onde 151 milhões acontecem nos países em desenvolvimento (OMS, 2010). Assim, as infecções pneumocócicas continuam sendo altamente prevalentes em todas as regiões do mundo (Figura 1.1), tornando-se uma prioridade como problema de saúde pública tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento (OMS, 2010, GARCIA SUARES *et al.*, 2006, PRADO, 2001).

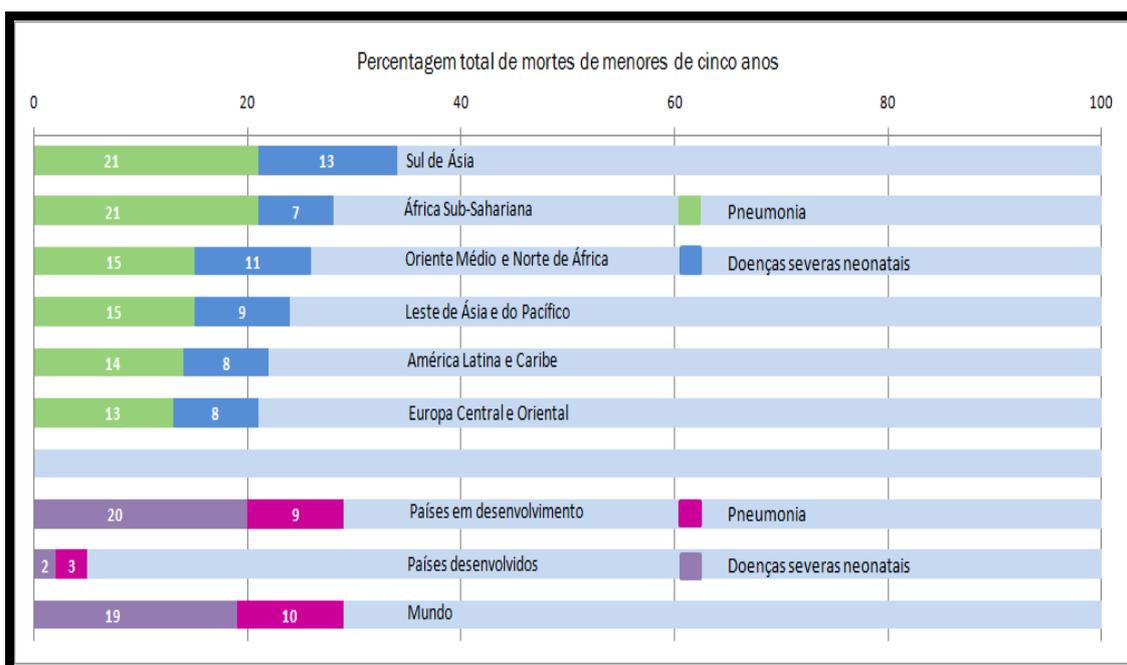


Figura 1.1 A pneumonia é a maior causa de mortalidade infantil em todas as regiões do mundo. Adaptado de WARDLAW *et al.* (2006).

Em relação às mortes por infecções pneumocócicas, a Organização Mundial da Saúde (2010) estima que das 10 milhões de mortes anuais no mundo de crianças menores de cinco anos, mais de 1,9 milhões sejam devido às infecções por essa bactéria, mais que qualquer outra doença. Isso representa 19% de todas as mortes de menores de cinco anos, sem incluir os óbitos por pneumonia durante as primeiras quatro semanas de vida. Incluindo esses óbitos, a pneumonia seria responsável por até três milhões (29%) das mortes anuais de menores de cinco anos (Figura 1.2).

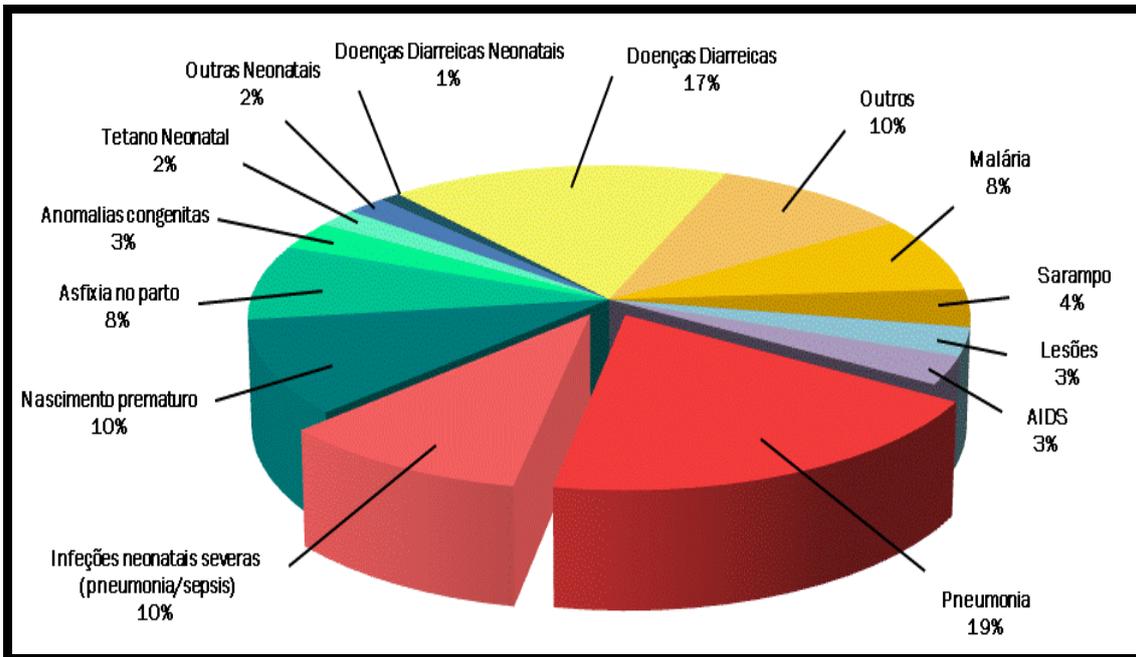


Figura 1.2 Distribuição global das principais causas de morte em crianças menores de cinco anos. Adaptado de WARDLAW *et al.* (2006).

2.2 - Grupos e fatores de risco.

Os principais grupos de risco associados a doenças pneumocócicas são as crianças e os idosos. Crianças menores de dois anos de idade e as pessoas de mais de 60 anos de idade representam os principais alvos das doenças pneumocócicas, além dos imunodeficientes, seja por fatores genéticos, ou por quimio ou radioterapias, ou por serem portadores de VIH. Este último grupo apresenta um risco ainda maior, de 30 a 40 vezes, de contrair pneumonia. Entretanto, diversos fatores de riscos contribuem para a existência desproporcionada de doenças pneumocócicas nos países em desenvolvimento/países pobres. Exemplos destes fatores de riscos são certas doenças freqüentes nestes países, como a doença de células falciformes (condição genética que afeta as células vermelhas do sangue e é mais comum entre pessoas de ascendência africana), doenças ou lesões que prejudicam o funcionamento normal do baço (FELDMAN E ANDERSON, 2008, COHEN *et al.*, 2010). Entre todos esses fatores de riscos, os que contribuem principalmente para essa desproporção são as condições de pobreza e a deficiência dos sistemas públicos de saúde, que

dificultam o acesso da população mais carente à vacinação contra este microorganismo.

2.3 – Estrutura de *S. pneumoniae*.

S. pneumoniae é uma bactéria gram-positiva encapsulada. Na superfície da bactéria podem ser identificadas três estruturas principais; a membrana plasmática, a parede celular e a cápsula que é a camada mais externa e espessa (Figura 1.3). Uma característica importante para destacar sobre a parede celular é sua composição, sendo formada por capas de peptidoglicanos onde estão ancorados os polissacarídeos da parede celular, os polissacarídeos capsulares e outras proteínas. Embora os polissacarídeos da parede celular sejam comuns a todos os sorotipos de *S. pneumoniae*, a estrutura química dos polissacarídeos capsulares é específica do sorotipo (ALONSO DE VELASCO *et al.*, 1995).

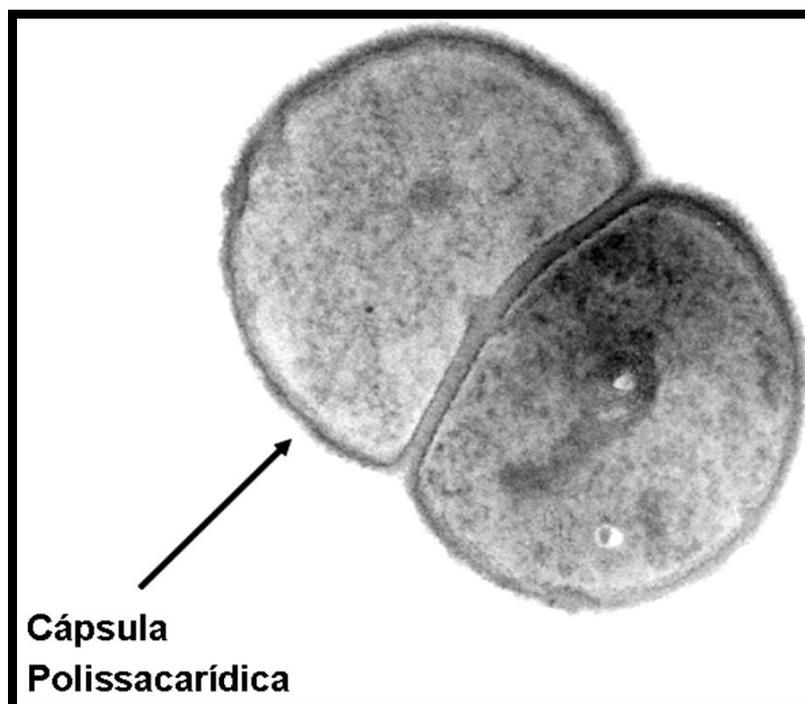


Figura 1.3 Imagem de microscopia de varredura eletrônica do *S. pneumoniae*. O microorganismo está formando um diplococo. O contorno do microorganismo de cor mais escura é a cápsula polissacarídica, camada mais densa (PLETZ *et al.*, 2008).

Até o presente, foram identificados pouco mais de noventa sorotipos diferentes de *S. pneumoniae* com base na única diferença estrutural que apresenta a bactéria, os polissacarídeos capsulares, demonstrando ter uma população altamente heterogênea. Mas, de acordo com estudos prévios, aproximadamente 12 sorotipos são os principais causadores de 70% das infecções pediátricas invasivas em todas as regiões do mundo. A distribuição dos sorotipos isolados, responsáveis pelas doenças de adultos, difere substancialmente dos sorotipos isolados em crianças. Um estudo (GRAY *et al.*, 1979) observou que os sorotipos pediátricos mais importantes (6A, 14, 19F, e 23F) são os responsáveis por quase 60% de todas as infecções. Nos adultos, os sorotipos 3, 19F, e 6A representam 31% dos sorotipos isolados. Além de variar com a idade, os sorotipos também diferem muito dependendo da doença, de sua severidade e da região geográfica, sendo os sorotipos que prevalecem nos Estados Unidos diferentes daqueles da Europa e dos países Asiáticos (ALONSO DE VELASCO *et al.*, 1995, LI KOROTKY *et al.*, 2009). No Brasil, no período de 1977 a 2000, foram identificados os sorotipos mais freqüentes associados às doenças invasivas: 1, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F. Das cepas isoladas, 76,5% foram encontradas em crianças menores de 5 anos de idade com meningite. Entre o período 2000 a 2008, os sorotipos mais freqüentes associados às doenças invasivas foram: 14 (27,9%), 6B (9,7%), 19F (5,4%), 23F (5,4%), 18C (5,1%), 3 (4,5%), 6A (4,3%), 1 (3,8%), 5 (3,5%), 19A (3,3%), 9V (3,2%), 4 (2,8%), 7F (2,1%) e outros (19,1%). Pode-se perceber que os sorotipos mais importantes (14, 6B, 19F, e 23F) são os responsáveis por quase 50% de todas as infecções (MINISTÉRIO DE SAÚDE, 2010), similar ao observado no estudo de Gray (1979). A experiência clínica mundial acumulada mostra que são poucos os sorotipos com maior impacto clínico. Só doze sorotipos (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 14, 18, 19 e 23) são os responsáveis por mais de 80% das infecções pneumocócicas invasoras (PRADO, 2001).

2.4 – Fatores de virulência.

A patogenicidade de *S. pneumoniae* é atribuída a diversas estruturas celulares, localizadas na superfície da bactéria como também no citoplasma. Essas estruturas celulares são conhecidas como fatores de virulência, pois elas são

essenciais para os processos de aderência, colonização e invasão do microrganismo no hospedeiro. Além disso, estes fatores de virulência têm a capacidade de produzir resposta inflamatória no hospedeiro (EINSFELDT, 2010).

A cápsula polissacarídica é o principal fator de virulência de *S. pneumoniae* ao prover resistência à fagocitose e permitir que o microorganismo não seja reconhecido pelo sistema imunológico do hospedeiro (ALONSO DE VELASCO *et al.*, 1995, JEDRZEJAS, 2001, EINSFELDT, 2010). A estrutura química dos polissacarídeos capsulares e, em menor medida, a espessura da cápsula, determinam a capacidade diferencial que os sorotipos de *S. pneumoniae* têm de sobreviver na corrente sanguínea e de causar doenças invasivas. Provavelmente isso acontece por diferenças nos processos de ativação da via alternativa do sistema complemento, de deposição e degradação dos componentes do complemento na cápsula (ALONSO DE VELASCO *et al.*, 1995, PRADO, 2001), de resistência à fagocitose (PRADO, 2001), como também por diferenças na habilidade de induzir anticorpos, de proporcionar resistência à autólise espontânea ou induzida por antibióticos, e da remoção mediada por estruturas do tipo lectina nos fagócitos (ALONSO DE VELASCO *et al.*, 1995, KADIOGLU *et al.*, 2008).

No entanto, certos componentes protéicos da parede celular e alguns citoplasmáticos são responsáveis diretos pelo processo inflamatório causado nas infecções pneumocócicas, e, portanto, principais responsáveis pela morbidade e mortalidade do hospedeiro. Por isso, esses componentes protéicos também têm sido sugeridos como fatores de virulência do microorganismo (ALONSO DE VELASCO *et al.*, 1995, JEDRZEJAS, 2001, EINSFELDT, 2010). Frequentemente, essas proteínas também estão envolvidas nos processos de interação da bactéria com os tecidos do hospedeiro e nos processos que a bactéria tem para dificultar o reconhecimento dela pelo sistema imune do hospedeiro em ausência de anticorpos específicos (BAROCCHI *et al.*, 2007).

Diversos estudos têm sugerido que, dentro deste grupo de fatores de virulência, certas proteínas pneumocócicas (Figura. 1.4), como a hialuronato liase (Hyl), neuraminidases (NanA and NanB), IgA protease, proteína de superfície pneumocócica A (PspA), autolisina (LytA), proteína de choque térmico ClpP

protease, proteína de ligação a colina A (CbpA), adesina de superfície pneumocócica A (PsaA) e pneumolisina (Ply), são candidatas potenciais para a formulação de uma vacina (JEDRZEJAS, 2001; SCHACHERN *et al.*, 2009).

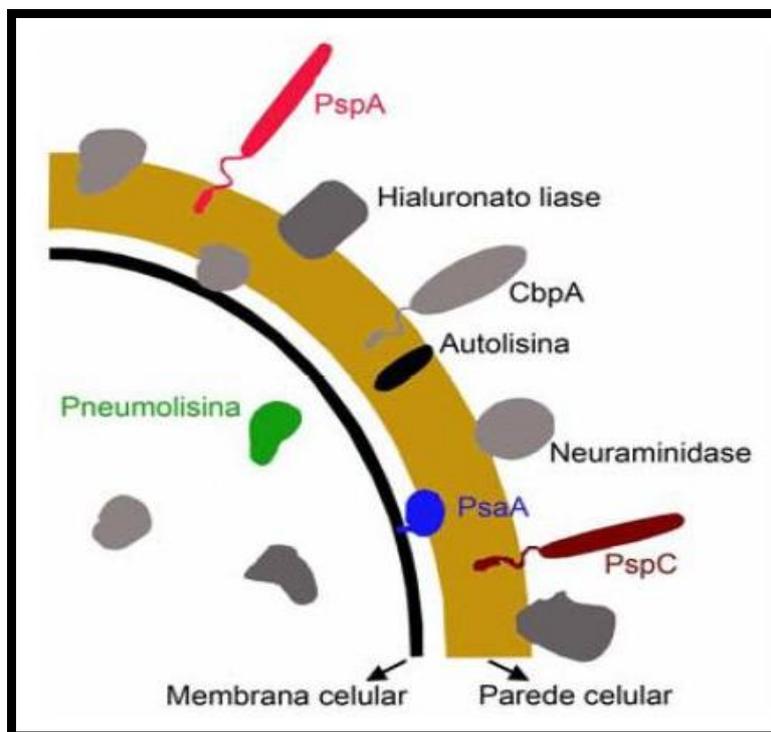


Figura 1.4 Esquema dos fatores de virulências que apresenta *S. pneumoniae* na superfície como também no espaço citoplasmático (JEDRZEJAS, 2001).

A **Hialuronato liase (Hyl)** é uma das principais proteínas de superfície de *S. pneumoniae* que pode contribuir para sua virulência. Ela é liberada nos tecidos do hospedeiro com a finalidade de aumentar a permeabilidade dos tecidos mediante a clivagem dos componentes da matriz extracelular, principalmente o ácido hialurônico, e facilitar a invasão desses tecidos (JEDRZEJAS, 2001; AKHTAR e BHAKUNI, 2004).

A proteína **Neuromidase** está amplamente presente nas cepas de *S. pneumoniae*, em duas formas, NanA e NanB. É uma enzima que tem um papel importante na disseminação e multiplicação da bactéria nos tecidos infectados. Ela tem a capacidade de clivar os ácidos siálicos das glicoproteínas e dos glicolípidos das células epiteliais do hospedeiro e, portanto mudar o padrão de glicosilação, diminuindo a viscosidade do muco que recobre o epitélio respiratório, expondo os

receptores e permitindo a adesão da bactéria a essas células, o que facilita o processo de colonização (PRADO, 2001, BOGAERT *et al.*, 2004).

A **IgA Protease** é uma enzima cuja função é inativar, mediante clivagem das ligações peptídicas específicas, os anticorpos IgA1 presentes principalmente nas mucosas, e facilitar a aderência e colonização inicial de *S. pneumoniae* (MISTRY e STOCKLEY, 2006, ROMANELLO *et al.*, 2006). Esta protease é um fator de virulência importante produzido também por outras bactérias capazes de produzir infecções severas como o *Haemophilus influenzae* tipo b e a *Neisseria meningitidis* (PRADO, 2001).

As **autolisinas** são capazes de degradar a parede celular mediante hidrólise da capa de peptideo glicanos no sítio específico entre o ácido *N*-acetilmurâmico e o resíduo alanina da ligação peptídica (PRADO, 2001). Um exemplo destas autolisinas é a enzima conhecida como LytA amidase (*N*-acetilmuramil-L-alanina amidase), também pertencente ao grupo de proteínas de superfície ligantes à colina, que está envolvida na patogenicidade do microrganismo e já mostrou bons resultados quando utilizada como antígeno em modelo animal (JEDRZEJAS, 2001). No entanto, o papel exato das autolisinas na patogênese ainda precisa ser estudado com mais profundidade, assim como as propriedades de proteção desta proteína (BOGAERT *et al.*, 2004).

A **PspA** (*pneumococcal surface protein A*) é uma proteína com estrutura e antigenicidade variável entre as diferentes cepas pneumocócicas, embora ela apresente reatividade cruzada. Está presente em todas as cepas conhecidas até o presente, o que torna ela atrativa como uma candidata para uma vacina (VILA-CÓRCOLES, 2007; SCHACHERN *et al.*, 2009). Ela inibe o processo de ativação do complemento e a eliminação por fagocitose, favorecendo assim a virulência de *S. pneumoniae*. Imunizações feitas em camundongos com esta proteína ou com fragmentos N-terminal dela mostraram proteger o camundongo da invasão deste microrganismo. Estudos demonstraram esta proteína como potencial alvo para uma vacina protéica contra *S. pneumoniae* (JEDRZEJAS, 2001; GARCIA SUARES *et al.*, 2006; FELDMAN e ANDERSON, 2008).

A proteína **CbpA** (*Choline binding protein A*) é exposta na superfície de *S. pneumoniae* e está envolvida na aderência e colonização nas mucosas nasofaríngeas do hospedeiro, mediante interação com os receptores de imunoglobulinas poliméricas (JEDRZEJAS, 2001; OGUNNIYI *et al.*, 2001). A CbpA é altamente conservada, e compartilha domínios estruturais similares com a PspA. Imunizações com esta proteína induzem proteção contra a sepsis por *S. pneumoniae*, e essa proteção é mediada por anticorpos que reconhecem também domínios de PspA (OGUNNIYI *et al.*, 2001).

A **PsaA** (*Pneumococcal surface adhesin A*) é uma proteína de membrana, hidrofóbica, geneticamente conservada e detectada na superfície de todos os sorotipos de *S. pneumoniae*. Apresenta um papel chave no processo de aderência da bactéria nas células epiteliais da nasofaringe, e na proteção dos portadores assintomáticos contra esse microorganismo. Tem capacidade de inibir a ativação do sistema de complemento. Seu uso como antígeno sorotipo independente tem se mostrado adequado para uma vacina contra *S. pneumoniae* (BOGAERT *et al.*, 2004), devido a sua capacidade de reduzir a colonização nasofaríngea e ao alto grau de conservação entre os diferentes sorotipos. Diversos estudos de imunização de animais com PsaA, em combinação com outras proteínas como PspA, Ply, PspC, apresentaram resultados promissores do uso da PsaA como uma proteína candidata para uma vacina contra *S. pneumoniae* (BRILES *et al.*, 2000, BOGART *et al.*, 2004, TAI, 2006, SCHACHERN *et al.*, 2009). A PsaA é uma das proteínas incluídas no projeto de Bio-Manguinhos/Fiocruz para desenvolver uma vacina pneumocócica (LARENTIS *et al.*, 2011 submetido).

A **ClpP** é uma protease pertencente ao grupo das proteínas de choque térmico (HSPs) (KWON *et al.*, 2004). Esta proteína é altamente conservada entre os vários sorotipos de *S. pneumoniae* (CAO *et al.*, 2009). Localiza-se no citoplasma, no entanto, em virtude do choque térmico, esta é direcionada para a parede celular (KWON *et al.*, 2004). A ClpP modula a expressão de genes de virulência, assim como ocorre com outras proteínas de choque térmico. A ClpP é requerida para a sobrevivência intracelular e aumenta a estabilidade de RNAm a altas temperaturas (KWON *et al.*, 2004). Cepas mutantes na proteína ClpP mostram-se sensíveis a altas temperaturas, corroborando a hipótese de que esta proteína protege a

bactéria em situações adversas (KWON *et al.*, 2004). Vários trabalhos têm clonado, expressado e avaliado a imunogenicidade da ClpP em modelo animal. A clonagem e avaliação da segregação plasmidial de vetor pET em diferentes concentrações de IPTG e canamicina no sistema foram realizadas em recente trabalho desenvolvido no LATER/Bio-Manguinhos/Fiocruz em colaboração com o PEQ/COPPE e IQ da UFRJ (EINSFELDT, 2010). KWON *et al.* (2004) demonstraram que ratos imunizados com ClpP produzem uma forte resposta humoral contra essa proteína. CAO *et al.* (2007) também demonstraram que a ClpP protease, expressa em *E. coli*, conferiu proteção em modelo animal contra infecções pneumocócicas, sendo que, quando misturada a outras duas proteínas, PspA e PspC, produziu níveis ainda maiores de proteção.

A **pneumolisina (Ply)** é um dos fatores de virulência de *S. pneumoniae* mais estudado por ser considerado um dos fatores mais relevantes e com potencial para seu uso numa vacina protéica (HOSKINS *et al.*, 2001, JEDRZEJAS, 2001, HIRST *et al.*, 2004). Ela é produzida por todos os sorotipos de *S. pneumoniae* isolados clinicamente (JEDRZEJAS, 2001, GARCIA SUARES *et al.*, 2006). Pertence ao grupo das citolisinas dependentes do colesterol (CDCs), e possuem homologia com outras toxinas, como a perfringolisina O, e a estreptolisina O. Diferente dos outros fatores de virulência pneumocócicos, esta proteína não está exposta na superfície da bactéria, ela é uma enzima citoplasmática que é liberada pela ação da autolisina pneumocócica de superfície (JEDRZEJAS, 2001, MARRIOTT *et al.*, 2008). A proteína é monomérica, composta por 471 aminoácidos, de massa molar de 53 kDa, enovelada em quatro domínios globulares (MARRIOTT *et al.*, 2008) (Figura 1.5).

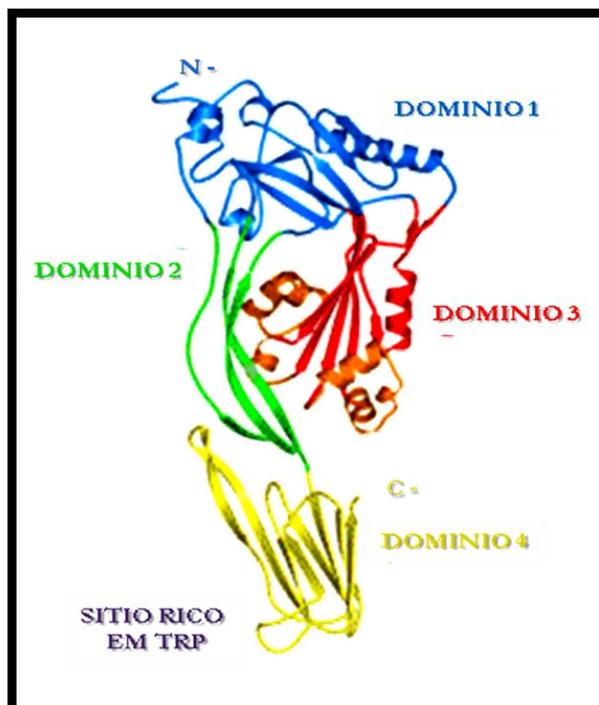


Figura 1.5. Estrutura monomérica da Ply, com 4 domínios globulares. O domínio 1 (azul) é a região amino-terminal, enquanto que o domínio 4 (amarelo) é a região carboxi-terminal. O domínio 4 apresenta uma região rica em resíduos de triptofano que estão envolvidos na interação com a membrana celular. O domínio 3 apresenta duas regiões (vermelha e laranja); uma delas consiste em 3 pequenas α hélices (laranja), próximas ao domínio 2 (verde), onde sofrem uma reorganização para uma configuração em agulha, podendo assim atravessar a membrana plasmática durante a formação do poro (GILBERT *et al.*, 1999, TILLEY 2005, SONNEN 2008).

O monômero apresenta uma região, na sua seqüência de 11 resíduos, altamente conservada na base do domínio 4, que é rica em triptofano (resíduos ECTGLAWEWWR). Mutações ou modificações químicas nesta região reduzem ou eliminam a ligação na membrana e a formação do poro (GILBERT *et al.*, 1999). Uma vez ligada à membrana, a unidade monomérica sofre uma mudança conformacional, expondo as partes hidrofóbicas e permitindo assim que outros monômeros possam acoplar-se lado a lado, mediante interações entre os domínios (1 e 2) dos monômeros de Ply, formando o complexo pré-poro composto por 40 - 50 unidades. Uma pequena região do domínio 3 apresenta configuração α hélice. A transição dessas seis estruturas α hélice para duas conformações em forma de agulha, e a conseqüente inserção e integração dentro da membrana para formar a parede do complexo transmembranar é o que se conhece como formação

do poro (Figura 1.6). A formação do poro transmembranar acaba com o delicado equilíbrio osmótico entre a célula e o entorno, o que permite a liberação de material celular, e conduzir assim à lise celular (GILBERT *et al.*, 1999, JEDRZEJAS, 2001, SONNEN, 2008, MARRIOTT *et al.*, 2008).

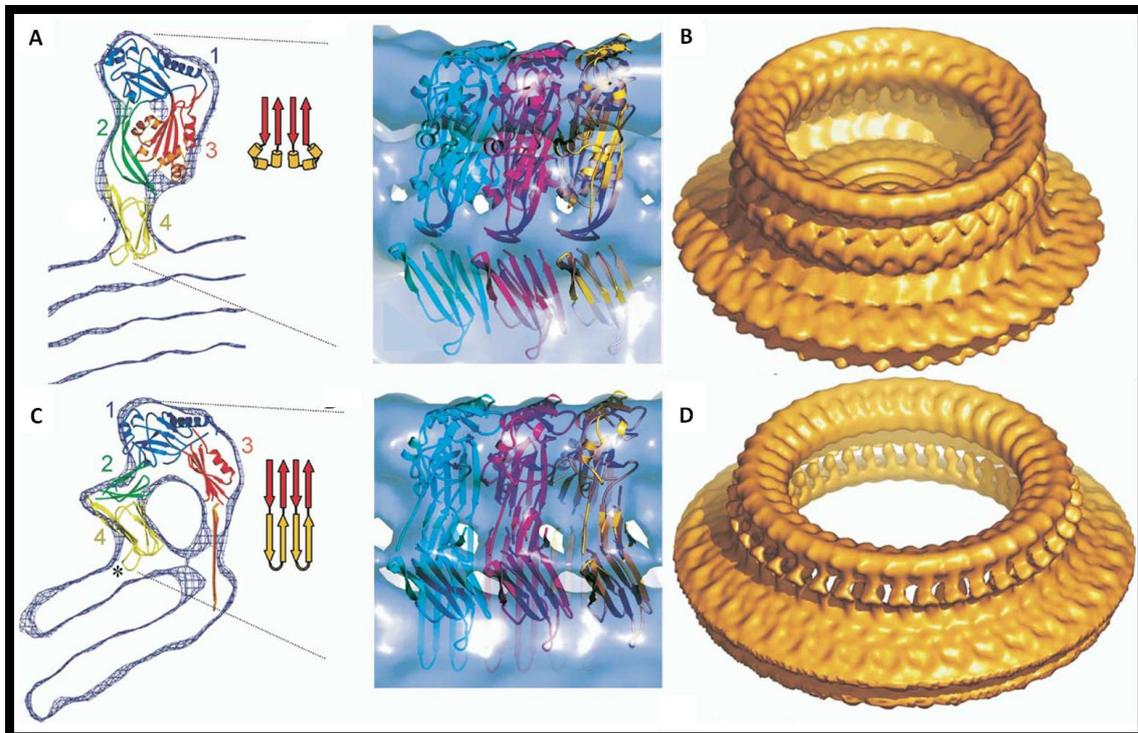


Figura 1.6. Mudança estrutural da pneumolisina estando ancorada na membrana celular. O domínio 3 apresenta uma estrutura conformacional de 3 pequenas α hélices (A - laranja), próximas ao domínio 2 (verde), quando esta formando o complexo pré-poro (B). Essas estruturas sofrem uma reorganização para uma configuração em agulha (C), podendo assim atravessar a membrana plasmática durante a formação do poro (D) (Adaptado de TILLEY *et al.*, 2005).

Dependendo da concentração, a pneumolisina apresenta diferentes atividades biológicas, especialmente na etapa inicial da patogênese da infecção pneumocócica. Em alta concentração, a enzima é tóxica para as células epiteliais ciliadas dos bronquios, reduzindo o movimento ciliar, destruindo as juntas celulares e a integridade da monocamada epitelial bronquial, o que faz com que a capacidade das células ciliadas bronquiais de limpar o muco do trato respiratório inferior seja reduzida, facilitando assim o espalhamento da infecção pneumocócica. Ela também interage com as células epiteliais dos alvéolos e as células endoteliais pulmonares, causando edema alveolar e hemorragia durante a pneumonia

pneumocócica, além de facilitar a penetração do epitélio ao interstício pulmonar e finalmente à corrente sanguínea. (JEDRZEJAS, 2001). Em baixas concentrações de Ply, esta enzima é capaz de inibir as funções efetoras (“brotos respiratórios”) dos neutrófilos e monócitos, a quimiotaxia, a atividade bactericida, e a produção de linfoquinas e imunoglobulinas (JEDRZEJAS, 2001). Em concentrações baixas, a toxina também tem outros efeitos produzindo diretamente a inibição da atividade fagocítica e da atividade celular do hospedeiro. A pneumolisina estimula a produção de citocinas inflamatórias como o Fator de Necrose Tumoral alfa e a Interleuquina 1b pelos monócitos humanos. Além disso, a pneumolisina inibe a ativação pela via clássica do complemento na ausência de anticorpos anti-toxina, atividade que parece estar mediada pela ligação dos anticorpos através de seus fragmentos Fc (região carbóxi-terminal dos anticorpos, que não interage com os antígenos) (ALONSO DE VELASCO *et al.*, 1995, RUBINS e JANOFF, 1998, MARRIOTT *et al.*, 2008).

2.5 – Tratamento das infecções de *S. pneumoniae*.

Diversos métodos terapêuticos para enfrentar o problema das infecções causadas por *S. pneumoniae* foram propostos desde o começo do século passado. O surgimento dos antibióticos e o entusiasmo no mundo da medicina pela eficácia terapêutica comprovada que este tipo de medicamento apresentava, fez com que a penicilina rapidamente fosse empregada para o tratamento de pacientes com infecções pneumocócicas.

No entanto, a taxa de mortalidade por infecções pneumocócicas continuava elevada. Deste modo, e devido ao aparecimento das cepas de *S. pneumoniae* resistentes à penicilina e multidrogas, novos esforços foram feitos na década de 1970 para obter uma vacina composta por polissacarídeos pneumocócicos (ALONSO DE VELAZCO *et al.*, 1995).

Em 1978, uma vacina polissacarídica capsular pneumocócica contendo polissacarídeos de 14 sorotipos diferentes de *S. pneumoniae* foi aprovada para uso em humanos, mas rapidamente foi substituída, em 1983, por outra vacina

polissacarídea 23-valente, a Pneumovax (Merck), que continha novos sorotipos baseados nos últimos conhecimentos da distribuição sorotípica e das reações cruzadas existentes entre vários sorotipos (ALONSO DE VELAZCO *et al.*, 1995). Esta vacina, licenciada no Brasil em 1992, protege contra os sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F, que são os causadores do 88% das doenças pneumocócicas invasoras nos Estados Unidos. Embora ela tenha demonstrado uma eficácia boa em adultos, não demonstrou a mesma eficácia em crianças menores de dois anos, pois elas ainda não têm o sistema imune completamente desenvolvido. Também não permite conferir imunidade dependente das células T, não induz uma boa memória imunológica e tem pouco ou nada de impacto nos portadores nasofaríngeos do agente infeccioso (PLETZ *et al.*, 2008).

Como consequência do pobre desempenho imunogênico apresentado pela vacina polissacarídea em crianças menores de dois anos e em adultos maiores de sessenta anos, outro tipo de vacina polivalente de polissacarídeos conjugados a proteínas carreadoras foi desenvolvida, sendo esta um maior avanço na profilaxia contra as infecções bacterianas (PLETZ *et al.*, 2008). As vacinas conjugadas são física e imunologicamente diferentes de suas concorrentes não conjugadas. As vacinas conjugadas são altamente imunogênicas em crianças, indutoras da imunidade dependente de células T e geradoras de altos níveis de anticorpos no soro, conferindo assim imunidade protetora contra infecções pneumocócicas invasivas. Também são eficazes para reduzir o número de portadores nasofaríngeos dos sorotipos presentes na formulação da vacina (PLETZ *et al.*, 2008).

A primeira vacina conjugada licenciada no mundo foi a Prevnar ou Prevenar (Wyeth) (PCV7), nos Estados Unidos em 2000 e lentamente tornou-se disponível a nível mundial, sendo licenciada no Brasil em 2001. Ela é uma vacina composta por polissacarídeos capsulares de sete sorotipos diferentes, 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F, causadores de 86% das doenças pneumocócicas pediátricas em países da Europa e Estados Unidos, os quais estão ligados a uma variante não tóxica do antígeno protéico CRM197 da difteria. A vacina apresentou uma eficácia muito boa tanto em crianças como em pessoas idosas. No entanto, essa eficácia é específica

contra os sorotipos que estão presentes na composição da vacina, e não dos sorotipos causadores de sérias doenças pneumocócicas na maioria dos países menos desenvolvidos. A distribuição dos sorotipos na Ásia e África difere enormemente, onde a maioria das meningites e pneumonia pneumocócicas é causada pelos sorotipos 1, 3, 5 e 7F, os quais não estão presentes na formulação da vacina (PLETZ *et al.*, 2008). Por outro lado, o custo desta vacina é muito maior que o custo das outras vacinas presentes nos programas de imunização de muitos países em desenvolvimento.

Atualmente, uma nova vacina conjugada esta disponível no mercado, a vacina 10-valente (PHiD-CV) com o nome de Synflorix (GSK). Na sua composição, a PHiD-CV apresenta os mesmos polissacarídeos capsulares da vacina 7-valente PCV7, mais três novos polissacarídeos dos sorotipos 1, 5, e 7F. Oito destes polissacarídeos estão conjugados à proteína D do *Haemophilus influenzae* e os outros dois polissacarídeos estão conjugados à proteína CRM197 da difteria e à toxina tetânica. O Ministério da Saúde brasileiro, mediante um acordo de transferência de tecnologia entre a FIOCRUZ/Bio-Manguinhos e o empresa multinacional GSK, incluiu esta vacina no calendário público de vacinação em março deste ano (MINISTERIO DE SAÚDE, 2010).

Muitas outras vacinas conjugadas estão em etapa clínica de avaliação. Todas elas, junto com a PCV7 e a PHiD-CV, apresentam como principal problema o custo elevado do processo de produção. Uma alternativa para a baixa proteção em determinadas faixas etárias e para os custos elevados é o desenvolvimento de uma vacina composta de antígenos protéicos altamente conservados diretamente relacionados com a virulência de *S. pneumoniae*. Imunizações com este tipo de proteína de forma separada ou combinada pode levar a níveis significativos de proteção em modelos animais contra diferentes sorotipos de *S. pneumoniae*. Tais proteínas também podem ser empregadas em vacinas conjugadas como proteínas carreadoras dos polissacarídeos pelo qual elas são importantes antígenos para seu uso em vacinas pneumocócicas (RUBINS e JANOFF, 1998, BRILES *et al.*, 2000, HUO *et al.*, 2004, BOGAERT *et al.*, 2004, TAI, 2006, OGUNNIYI *et al.*, 2007).

Finalmente, e para destacar a importância que têm as proteínas de *S. pneumoniae*, atualmente está sendo realizado em Bio-manguinhos/Fiocruz um projeto para o desenvolvendo de tecnologias de produção de diversos alvos protéicos para uma vacina contra pneumococcus. Proteínas como a pneumolisina, PsaA e ClpP protease fazem parte desse projeto, além de outros alvos que também têm sido considerados a partir do estudo de genoma dos sorotipos de *S. pneumoniae* em trabalho desenvolvido no LATER.

2.6 – Processo de expressão.

Diferentes hospedeiros são empregados para a expressão de proteínas recombinantes, como as bactérias, os fungos e as células animais e vegetais. *E. coli* é o hospedeiro bacteriano mais usado nesta tecnologia. Atingir concentrações celulares altas e com elevada expressão da proteína recombinante, objetiva uma produção tanto de máxima rentabilidade quanto viabilidade econômica. No entanto, não existe um processo único e universal para a expressão de todas as proteínas recombinantes neste hospedeiro, pois os níveis de expressão de um gene heterólogo vão depender de múltiplos fatores que são específicos de cada sistema recombinante. Exemplos desses fatores são: a interação entre o vetor e o hospedeiro, a estabilidade plasmidial, a indução eficiente do promotor, a estabilidade da proteína, a fase de crescimento celular no momento da indução da expressão protéica, a concentração da biomassa e outros. Todos estes fatores devem ser cuidadosamente avaliados por terem grande influência no sistema, levando a baixa previsibilidade de seu comportamento (JANA e DEB, 2005). Deste modo, para otimizar um processo de expressão protéica é necessário do conhecimento e melhoramento das condições do cultivo relacionadas com a composição do meio, a fisiologia microbiana, as condições de crescimento e indução, minimização da inibição metabólica, sendo estes parâmetros determinados, na maioria das vezes, de forma empírica. Sabe-se que em alguns sistemas que foram otimizados mediante mudanças chave nas condições do cultivo permitiram que fossem alcançados rendimentos elevados de proteína recombinante, mas não necessariamente de forma solúvel, sendo estes níveis de até 40% do total de proteínas expressas na célula (MURBY *et al.*, 1996).

Um fato importante a destacar é que o uso de *E. coli* como sistema de expressão apresenta algumas dificuldades relacionadas à produção de proteínas heterólogas funcionais, biologicamente ativas e solúveis (LARENTIS *et al.*, 2006). A expressão de proteínas complexas, com múltiplas sub-unidades, pontes de enxofre ou modificações pós-traducionais, é dificultada pela falta de maquinaria celular capaz de realizar as adequadas modificações nas proteínas, essenciais para sua funcionalidade. Além disso, uma das características da superprodução de proteínas heterólogas no citoplasma de *E. coli* é a perda de sua conformação (*misfolding*) e a tendência à agregação das proteínas expressas, com possível formação de agregados insolúveis (corpos de inclusão) (BANEYX, 1999). Isto pode acontecer porque, em altos níveis de expressão heteróloga, a capacidade do sistema de chaperonas pode ser excedida. Chaperonas são proteínas de bactérias e leveduras que mediam o correto enovelamento, secreção de proteínas expressas e, conseqüentemente, a ação proteolítica sobre outras proteínas (LARENTIS *et al.*, 2006). Um mecanismo simplificado da atuação molecular das chaperonas no enovelamento das proteínas é mostrado na Figura 1.7. A superexpressão de proteínas incorretas pode seqüestrar e eventualmente saturar o sistema de chaperonas, dificultando a produção das proteínas heterólogas de forma solúvel e com características da proteína nativa (URBAN *et al.*, 2003).

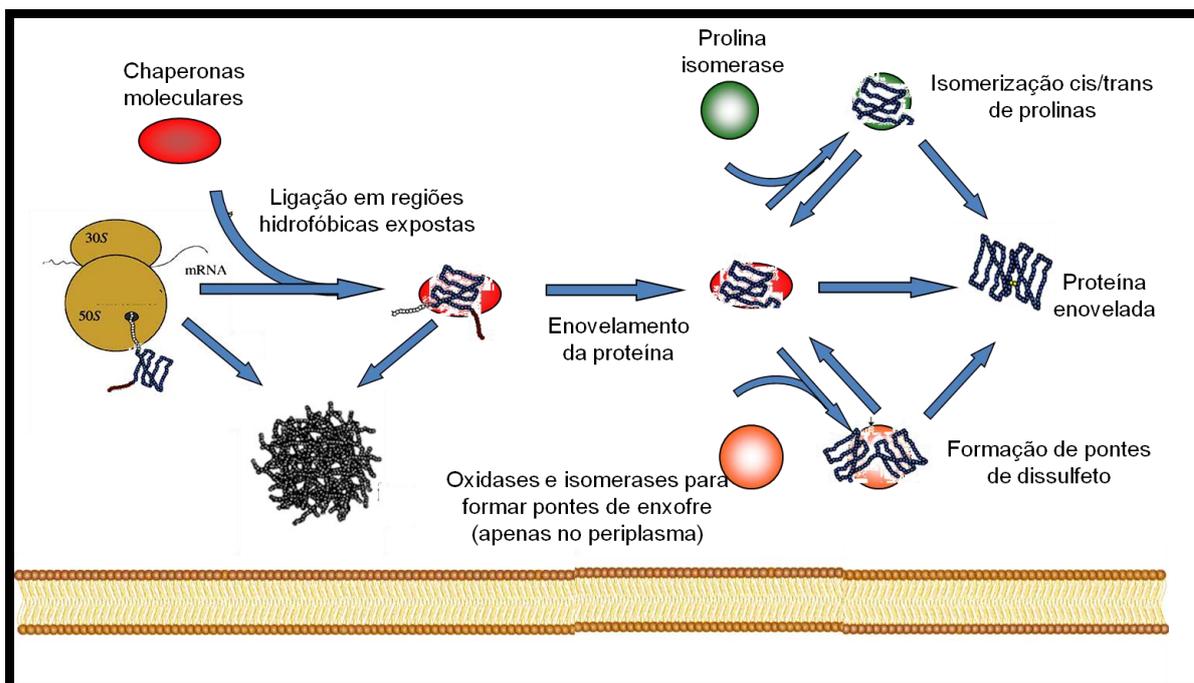


Figura 1.7 Esquema da atuação simplificada das chaperonas moleculares no enovelamento das proteínas em *Escherichia coli* (Adaptado por LARENTIS *et al.*, 2006).

Opiniões contrárias existem entre diferentes grupos de pesquisa sobre a formação desses corpos de inclusão. Muitos artigos consideram a formação de corpos de inclusão como uma desvantagem do sistema de expressão em *E. coli*, devido a eles requererem a adição posterior de um complexo processo de isolamento e purificação onde eles são desnaturados e re-enovelados *in vitro*, sulfitolisados, dialisados, passados por cromatografias de troca iônica, HPLC de fase reversa, etc. Nessa etapa de enovelamento, a recuperação da proteína é muito baixa, o que somado às perdas em todas as etapas seguintes de purificação, faz com que a recuperação global possa ser baixa (SHIN *et al.*, 1997). Entretanto, outros artigos na literatura consideram que a formação destes agregados é capaz de simplificar a purificação das proteínas, embora exija uma etapa de re-enovelamento (*refolding*) *in vitro*, que pode não ter sucesso na produção de grandes quantidades de proteínas biologicamente ativas (LARENTIS *et al.*, 2006).

As características da etapa de produção da proteína recombinante (*upstream processing*), como por exemplo, a procedência da proteína recombinante expressa, bacteriana ou de mamíferos, e localização da molécula, extra- ou intracelular, a expressão de forma solúvel ou na forma de corpos de inclusão, assim como também a finalidade que a proteína vai ter, para estudos estruturais ou de atividade, ou para ser empregada em animais ou em humanos, determinaram o processo de extração e purificação (*downstream processing*) desse bioproduto. Dentro dos processos de produção de biofármacos, a etapa mais importante é a de extração e purificação, responsável por 80 a 90% do custo do produto, pois geralmente se obtém baixo rendimento nessa etapa do processo. No entanto, a quantidade de proteína purificada não depende apenas do rendimento global dessa etapa, mas também da quantidade e qualidade da proteína obtida no processo de expressão, pois quanto melhor for a sua qualidade e quantidade, menor o número de etapas que serão necessárias para purificá-la, e assim, menor a perda global da biomolécula purificada. Assim é que uma melhora no processo de expressão das proteínas recombinante favorecerá a etapa subsequente de purificação (MORAES *et al.*, 2008). Pelo previamente discutido, o aperfeiçoamento do processo de produção de proteínas recombinantes é uma etapa essencial no desenvolvimento de um bioprocessos.

2.7 –Planejamento de experimentos.

Diversos trabalhos de otimização de processos de produção de proteínas recombinantes demonstram que o desenvolvimento de um bioprocessamento economicamente viável é uma tarefa relevante e difícil de realizar. Isso se deve à grande quantidade de variáveis, relacionadas às diferentes condições que devem ser consideradas no processo de expressão de uma proteína recombinante. O objetivo da experimentação é obter informação de qualidade, que permita compreender melhor o sistema estudado e tomar decisões sobre como melhorar ou aperfeiçoar o processo. Tanto pela importância das decisões que se podem adotar como pelo custo elevado da experimentação, não parece adequado deixar a seleção dos experimentos e a avaliação dos resultados à mera intuição do pesquisador. É mais razoável utilizar ferramentas e metodologias matemáticas e estatísticas que indiquem como planejar (desenhar, organizar) a seqüência de experimentos de uma forma ótima, de modo que se minimize tanto o custo da experimentação como a influência do erro experimental sobre a informação buscada. Essa planificação e análise é o principal objetivo do planejamento estatístico de experimentos, também conhecido como desenho estatístico de experimentos ou DoE (DIDIER *et al.*, 2007, NIKEREL *et al.*, 2005).

2.7.1 – Planos fatoriais completos e fracionados.

O método tradicional de experimentação é a forma mais intuitiva de estudar um sistema, consistindo em variar um fator por vez e manter os demais fatores fixos. Assim, a variação na resposta do sistema pode ser atribuída à variação desse fator. O procedimento é repetido para os outros fatores. Entretanto, esta estratégia exige a realização de um grande número de experimentos para poder estudar todos os fatores, o que implica elevado custo e tempo de realização, além de não assegurar que a condição ótima seja atingida (MONTGOMERY, 1991, RODRIGUES e IEMMA, 2009). Esse inconveniente de não conseguir determinar a condição ótima do sistema, embora sejam feitos muitos experimentos, deve-se ao método tradicional não prover informação sobre as possíveis interações existentes entre diferentes fatores significativos. Isto acontece quando o efeito de um fator é diferente de acordo com o valor de outro fator e vice-versa. A solução então deve

consistir em variar mais de um fator simultaneamente ao realizar um novo experimento, o que permitirá melhorar a eficiência do esforço do pesquisador e obter informação sobre as interações entre os diversos fatores (variáveis). A dificuldade se encerra na forma de desenhar uma experimentação reduzida onde essas mudanças simultâneas se complementem entre si e permitam obter a informação buscada ao combinar os resultados de todos os experimentos (WANG *et al.*, 2005, DIDIER *et al.*, 2007).

O planejamento estatístico de experimentos é uma abordagem organizada que produz informação muito mais confiável que quaisquer outras abordagens não planejadas. Ele possui o fundamento matemático que permite mudar todos os fatores simultaneamente e obter a informação desejada com um número reduzido de experimentos. O planejamento de experimentos multivariáveis é muito importante, pois consome menos tempo, esforço e recursos que um processo univariante e permite a obtenção de grandes quantidades de informação, como as interações entre os fatores, reduzindo o número de experimentos (DIDIER *et al.*, 2007, NIKEL *et al.*, 2005).

O planejamento de experimentos aplicado ao desenvolvimento de meios de cultura vem sendo cada vez mais empregado, pois nesse tipo de estudo normalmente vários fatores podem ter efeito direto sobre uma resposta de um sistema. Cada fator pode ser quantitativo ou qualitativo, e geralmente ele é avaliado em dois níveis diferentes, um nível superior e outro inferior; por isso é que este tipo de desenho é conhecido como planejamento fatorial em dois níveis (MONTGOMERY, 1991, RODRIGUES e IEMMA, 2009).

O emprego dos planejamentos experimentais e em particular o fatorial, além de definir as múltiplas interações entre diferentes fatores, permite também determinar a existência ou não de linearidade da resposta. A linearidade significa que a variação da resposta do sistema ao mudar um fator de um nível até outro é diretamente proporcional. Se não houver linearidade, o que acontece é que a mudança da resposta do sistema não vai ser diretamente proporcional à mudança no nível do fator. Nesses casos, o que pode acontecer é que a resposta aumente até um máximo e depois se mantenha nesse máximo ou decline, ou que a resposta

diminua até um mínimo e depois se mantenha nesse mínimo ou aumente, quando o fator muda de um nível para outro. Para poder determinar esse comportamento linear ou não da resposta, além dos experimentos nos níveis inferior e superior, deve ser feito um experimento a mais nos níveis médios de todas as variáveis (ponto central). Nessa condição, é importante realizar um mínimo de três réplicas, pois a reprodutibilidade do experimento nesse ponto central do plano fatorial permite estimar o erro experimental global, considerando que este erro é uniforme em todo o plano experimental (MONTGOMERY, 1991).

Em relação ao número de fatores a estudar em um planejamento fatorial a dois níveis, é importante saber que quanto maior for o número de fatores a avaliar, maior vai ser o número de experimentos a realizar, sendo esse número igual a $2^{(\text{número de fatores})}$. De forma geral, quando o número de fatores a avaliar é maior do que cinco, a quantidade de experimentos a fazer em um planejamento completo a dois níveis torna-se difícil de realizar na prática, pois supera-se rapidamente os recursos da maioria dos experimentadores. A realização de um planejamento fatorial completo de 2^8 , como é o caso desta dissertação, requer a realização de 256 experimentos. Deste plano fatorial, pode-se obter informação sobre os oito efeitos principais, sobre as 28 possíveis interações entre dois fatores, e sobre as demais possíveis interações entre três ou mais fatores (MONTGOMERY, 2001, RODRIGUES e IEMMA, 2009).

No entanto, em casos onde a finalidade do investigador é ter um conhecimento dos efeitos significativos principais sobre a resposta, a realização de um plano fatorial completo acima de quatro fatores não é necessária, pois nesses casos é mais adequada a utilização de planejamento fatorial fracionado. O emprego de planos fatoriais fracionados é possível dado que estatisticamente é comprovado que eles permitem a avaliação dos efeitos principais das variáveis envolvidas, sacrificando os efeitos das interações de três ou mais fatores (interações de segunda ordem ou maior), que são na prática irrelevantes, e assim simplificar a estrutura do modelo fatorial completo. Estas frações são porções do plano fatorial completo, podendo ser $1/2$, $1/4$, $1/8$ ou $1/16$ desse plano completo. No entanto, um fato a se destacar é que não é qualquer metade ou qualquer porção do plano completo, pois estas frações ainda devem conservar a propriedade

de ortogonalidade. A ortogonalidade é a propriedade do plano fatorial que garante que os efeitos sejam avaliados de forma independente entre si, sem que exista correlação entre eles (MONTGOMERY, 2001, RODRIGUES e IEMMA, 2009).

Dependendo da redução do número de experimentos, alguns efeitos podem não ser estimados de forma individual e sim em conjunto com outros efeitos. Isso se conhece como confusão de efeitos, e dependendo do padrão de confusões que apresenta o plano fatorial pode se reconhecer três categorias chamadas resoluções. Os “planos de resolução III” são aqueles em que nenhum efeito principal está confundido com outro efeito principal, mas sim está confundido com os efeitos das interações entre dois fatores (que não são irrelevantes na prática), e esses efeitos das interações entre dois fatores estão confundidos entre si. Os “planos de resolução IV” são melhores que os de III, pois nele nenhum efeito principal está confundido com outro efeito principal, nem com nenhum efeito das interações entre dois fatores (interações de primeira ordem). No entanto, os efeitos das interações de dois fatores estão confundidos entre si. Finalmente, o terceiro padrão de confusão é o “plano de ordem V”, onde nenhum efeito principal ou de interação de dois fatores estão confundidos com nenhum outro efeito principal ou de interação de dois fatores. Entretanto, os efeitos das interações de dois fatores estão confundidos com os efeitos das interações de três e mais fatores. Padrões de confusão com resoluções maiores do que V são encontrados, indicando que os efeitos principais estão confundidos com as interações de ordem igual ao da resolução desse plano fatorial. Nestes casos, as interações de três ou mais fatores (interações de segunda ordem ou maior) são, na prática, irrelevantes como já discutido (MONTGOMERY, 2001, RODRIGUES e IEMMA, 2009).

Uma aplicação desses planejamentos fatoriais fracionados é a realização de estudos exploratórios (*screening*), onde um número grande de variáveis é avaliado com o objetivo de identificar aquelas que apresentam efeitos significativos sobre a resposta do sistema. Os experimentos de exploração são realizados geralmente nas primeiras fases de um projeto quando muitos dos fatores inicialmente são considerados relevantes, mas que na realidade têm pouco ou nenhum efeito significativo sobre a resposta. Os fatores que são identificados como relevantes, são avaliados posteriormente, com maior detalhe, em outros desenhos fatoriais,

para poder determinar as condições ótimas desse sistema. Este tipo de planejamento fatorial fracionado é um dos mais empregados para o planejamento de processos e produtos (MONTGOMERY, 1991, RODRIGUES e IEMMA, 2009).

2.8 – Objetivo do trabalho.

O trabalho desta dissertação tem como objetivo principal definir um processo de expressão da proteína recombinante pneumolisina de *Streptococcus pneumoniae* no hospedeiro *Escherichia coli*, de forma solúvel, para favorecer e simplificar as subseqüentes etapas de recuperação e purificação dessa proteína e visando um processo mais econômico de produção.

Para poder definir esse processo, serão avaliados os efeitos de oito variáveis relacionadas ao meio de cultura e à indução, com potenciais significâncias estatísticas sobre o nível de expressão da pneumolisina de forma solúvel. As oito variáveis que serão avaliadas são: crescimento celular no momento da indução da expressão da proteína recombinante, concentração do indutor empregada para induzir a expressão, temperatura na qual é realizada a indução da expressão da pneumolisina, concentração do extrato de levedura no meio de cultivo da *E. coli*, concentração de triptona nesse mesmo meio de cultivo, concentração de glicose empregada como repressor da expressão da pneumolisina, concentração de glicerol como uma fonte alternativa de carbono para evitar a formação de acetato, produto metabólico que reduz a taxa de crescimento por acidificação do meio, e a concentração do marcador de seleção, o antibiótico canamicina, no meio de cultivo do hospedeiro recombinante.

Serão avaliadas três respostas do sistema: crescimento celular, nível de pneumolisina expressa de forma solúvel mediante avaliação da atividade biológica e produtividade do sistema no final do processo. A escolha da avaliação do crescimento celular no final do processo deve-se a que a pneumolisina é produzida no interior da célula, então quanto maior biomassa celular obtida, maior deveria ser o nível de pneumolisina expressa. Para determinar se essa correlação é verdadeira, será avaliado o nível de pneumolisina expressa de forma solúvel por dosagem da

atividade hemolítica (pois permite conhecer o nível da proteína expressa de forma específica). Como os tempos de processo podem variar de acordo com as alterações dos níveis das variáveis, a atividade hemolítica será comparada normalizada por tempo, empregando a produtividade.

Identificadas as variáveis com efeitos estatísticos significativos, será definida a melhor condição de processo escolhendo os níveis dessas variáveis de forma que maximizem a expressão da pneumolisina solúvel e reduzam o custo e tempo operacional. A validação desta condição de processo será realizada em triplicata.

3.- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Lote de trabalho e curvas de crescimento.

Na realização deste trabalho, a cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star™ (Invitrogen) foi empregada como hospedeiro para o plasmídeo pET28a (Novagen) contendo genes responsáveis pela expressão da pneumolisina, e pela resistência à canamicina. O clone produtor da proteína recombinante pneumolisina foi obtido no Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos de Bio-Manginhos da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). A criopreservação a -70°C do clone foi feita mediante armazenamento de alíquotas em glicerol (Invitrogen) 50%. A partir deste lote foram realizadas todas as expressões da proteína rPly deste trabalho. Os lotes de trabalho do clone de *E. coli* BL21 Star (DE3) / pET28a / *ply* apresentaram viabilidade celular na faixa de $2,8 \times 10^{10}$ UFC/mL.

Para a determinação dos valores de absorvância no momento da indução a serem empregados no delineamento experimental, foram realizadas curvas de crescimento celular em meio TB (*Terrific broth*, extrato de levedura: 23,6g/L, triptona: 11,8g/L, fosfato monobásico de potássio: 2,2g/L, fosfato dibásico de potássio: 9,4g/L) a 37°C e em meio LB (Luria-Bertani, extrato de levedura: 5g/L, triptona: 10g/L, cloreto de sódio: 10g/L) a 37°C. Foi acompanhado o crescimento celular da cepa nos meios de cultivo TB e LB mediante medições sucessivas da absorvância no espectrofotômetro UV-1201 (Shimadzu) a 600nm de comprimento de onda até o final da fase exponencial. Das curvas obtidas, determinaram-se os valores de absorvância 0,8 (correspondente à fase exponencial inicial) e 2,0 (correspondente à fase exponencial média), como os momentos para a indução da expressão da proteína a avaliar.

O extrato de levedura Bacto™, e a triptona foram adquiridos da empresa BD (Becton, Dickinson and Company); os sais de potássio (K_2HPO_4 and KH_2PO_4), a glicose e o NaCl foram da empresa Merck; o glicerol foi adquirido da empresa Invitrogen; a canamicina foi da empresa Sigma; e o IPTG foi da Promega.

3.2 - Construção do plano fatorial fracionado e definição das variáveis avaliadas no planejamento experimental.

Para analisar os possíveis efeitos significativos que as variáveis escolhidas podem ter sobre a expressão da proteína pneumolisina de forma solúvel, empregou-se a estratégia estatística do delineamento fatorial fracionado 2^{8-4} , com réplicas no ponto central.

O plano fatorial fracionado empregado neste trabalho é de resolução IV, adequado para determinar os efeitos principais das variáveis avaliadas, mas não para avaliar efeitos de interações (RODRIGUES e IEMMA, 2009).

Devido à grande variabilidade inerente aos bioprocessos, foram considerados significativos os parâmetros com p -valores menores que 10% ($p < 0,1$). O uso de 90% de confiança na análise estatística permite incluir possíveis fatores relevantes que ficariam excluídos numa análise estatística mais estrita com um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Uma vez escolhido o delineamento experimental a realizar, procedeu-se à normalização dos níveis dos fatores avaliados para dar aos oito fatores estudados a mesma importância estatística sobre as respostas do sistema. Assim, determinada as faixas de valores na qual cada uma das oito variáveis vai ser estudada, designou-se o valor -1 para o nível inferior da faixa de estudo, e o valor +1 para o nível superior da faixa de estudo. O valor 0 é o valor médio desses dois níveis.

Oito variáveis do processo de expressão, relacionadas tanto com a composição do meio de cultivo como das condições de expressão, foram escolhidas para serem avaliadas mediante planejamento experimental. As cinco variáveis associadas com a composição do meio de cultivo foram:

- **Extrato de levedura:** os meios de cultivos normalmente empregados para a expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli* são os meios LB e TB. No caso do meio LB a concentração de extrato de levedura é de 5g/L, e no caso do

meio TB a concentração de extrato de levedura é de 23,6g/L. Por isso, a avaliação deste fator foi feita nesses dois níveis de concentração, incluindo o valor intermediário de 14,3g/L no ponto central.

- **Triptona:** é empregada nos meios de cultivos de bactérias, pois promove eficientemente o crescimento celular e a redução de agregados por ser um componente rico em aminoácidos, sais e fosfatos (PISTORINO e PFEIFER, 2009). No entanto, dado que a triptona é obtida da degradação enzimática da caseína bovina pela enzima tripsina (derivada do pâncreas suíno), o seu emprego nos meios de produção de proteínas recombinantes para uso em humanos é um problema, pelo fato de ser potencial fonte de contaminação por agentes adventícios. Novos requerimentos das agências reguladoras incluem a redução máxima, ou eliminação por completo, de todos os componentes de origem animal no processo da produção de biofármacos e vacinas (OMS, 2005). Dado que a concentração de triptona empregada normalmente nos meios de cultivos de *Escherichia coli* é em torno de 10g/L (11,8g/L para TB e 10g/L para LB), e visando a possibilidade de suprimir este componente do meio de cultivo, os níveis de triptona no quais foi avaliada são 0g/L e 10g/L, com 5g/L no ponto central.

- **Glicose:** embora seja empregada na formulação de meios de cultivos de *Escherichia coli*, também é utilizada como repressor da expressão das proteínas recombinantes na etapa de pré-indução, para favorecer o crescimento celular. O principal inconveniente do uso de glicose em meios de cultivos é a geração de ácido acético por parte da célula durante o catabolismo da glicose, o qual acidifica o meio de cultivo e pode reduzir as taxas de crescimento celular. A concentração de glicose habitualmente empregada em meios de cultivos é de 10g/L (1%, conforme indicação das empresas fornecedoras dos plasmídeos comerciais usualmente empregados na área de biologia molecular). Como este componente deve estar presente no meio para manter os níveis de AMPc baixos, essenciais para evitar a transcrição do gene de interesse empregando o promotor T7, pode-se tentar reduzir o máximo possível sem retirá-lo. Desta forma, neste trabalho optou-se por avaliá-lo nas concentrações 10g/L e 1g/L (5,5g/L para o ponto central), visando à possibilidade de diminuir este componente para evitar a excessiva acidificação do meio. A condição mínima foi selecionada para que a glicose possa cumprir de

forma eficiente sua função de “repressor” da expressão da proteína recombinante como foi indicado no trabalho de SØRENSEN e MORTENSEN (2005).

- **Glicerol:** uma alternativa ao emprego de glicose como fonte de carbono pela célula, o que conduz à geração de ácido acético e, portanto, à possível redução do crescimento celular, é a adição de glicerol no meio de cultivo. Trabalhos na literatura demonstraram que o emprego de glicerol faz com que a célula possa empregá-lo como fonte de carbono, sem geração de ácido acético e, por conseguinte, sem a redução do pH do meio de cultivo. Para estudar o efeito deste fator, a faixa de estudo foi de 0% v/v e 0,4% v/v, com 0,2% v/v no ponto central.

- **Canamicina:** antibiótico empregado no processo de expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* como marcador de seleção, que permite a sobrevivência exclusiva das células que contêm o gene de interesse. No entanto, devido à natureza tóxica e ao elevado custo deste antibiótico, a redução dos níveis no meio de cultivo é desejado. Neste trabalho as concentrações de canamicina avaliadas foram de 50µg/mL, e 10µg/mL (30 µg/mL no ponto central). A escolha dos níveis de canamicina foi de acordo com a informação que a concentração empregada deste antibiótico varia de 10ug/mL para plasmídeos superenovelados (*stringent*) e 50ug/mL para plasmídeos relaxados (com solução estoque de 10mg/mL em H₂O a 20°C) (SAMBROOK, 2001). No caso deste trabalho, o pET28a, em gel de agarose apresentou 3 bandas de similar quantidade, indicando ambas as formas, sem predominância de uma delas.

As outras três variáveis estão relacionadas com as condições de indução da proteína recombinante foram:

- **Absorbância no momento da indução:** o estado fisiológico da célula é um fator importante para a expressão correta de proteínas recombinantes. Existem determinados casos onde a produção de proteínas recombinantes está associada ao crescimento, e portanto uma taxa elevada de produção é atingida somente quando as células estão na sua fase exponencial de crescimento. Além disso, quando a indução acontece, durante o período de expressão o crescimento celular em alguns casos decai devido ao fato de que quase todos os recursos celulares

estão sendo usados para a produção da proteína (TOKSOY *et al.*, 2002). Por isso, esta variável foi avaliada logo no início da fase exponencial, correspondente ao valor de absorvância de 0,8, e na metade da fase exponencial, correspondente ao valor de absorvância de 2,0, de acordo com o observado nas curvas de crescimentos da cepa deste trabalho nos meios TB e LB a 37 °C e 25 °C (e 31 °C no ponto central).

- **Concentração do indutor IPTG:** a expressão de proteínas solúveis em *E. coli*, corretamente enoveladas, é amplamente influenciada por uma variedade de fatores que inclui a concentração do indutor isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (CHOI *et al.*, 2010). Na maioria dos casos onde os genes heterólogos estão sob o controle do operon *lac*, a indução é feita usando o IPTG, molécula análoga à lactose. A indução com alta concentração de IPTG pode conduzir a uma severa redução da taxa específica de crescimento celular como também da produtividade da proteína recombinante, principalmente devido ao seu caráter tóxico para o metabolismo celular de *E. coli* (KILIKIA *et al.*, 2000, CHOI *et al.*, 2006). Portanto, o estudo deste fator para determinar sua condição ótima é essencial. Para isso, os níveis de avaliação do IPTG foram de 0,1mM e 1,0mM (0,55mM no ponto central). Esta última concentração (1mM) é a concentração padrão empregada na maioria dos processos, embora em muitos deles não tenham uma razão de por que o uso dessa concentração (EINSFELDT, 2010), e a outra concentração foi para determinar se pode-se reduzir este componente, de alto valor econômico para um processo em grande escala (KHAN *et al.*, 2010), em 10 vezes em relação com a sua concentração normal empregada.

- **Temperatura de indução da expressão da proteína recombinante:** fator que apresenta influência no nível e na qualidade da proteína recombinante expressa. O porquê uma temperatura menor favorece o correto enovelamento da estrutura tridimensional da proteína está relacionado com um número de fatores, incluindo uma diminuição na força motriz da associação de proteínas entre si, uma taxa menor na síntese protéica, mudanças na cinética de enovelamento da cadeia polipeptídica, entre outros (GEORGIU e VALAX, 1996). No entanto, uma redução excessiva na temperatura de expressão pode levar a um crescimento menor e, indiretamente, a um menor rendimento no nível de expressão de proteínas

recombinantes (WANG *et al.*, 2005, PAN *et al.*, 2008). Estudos prévios sobre o crescimento celular e a expressão da pneumolisina a 20°C, 25°C e 37°C, para 4 horas de indução, demonstraram que a 25°C foi condição testada mais adequada, com obtenção concomitante de altos valores de massa celular e de proteína solúvel, resultando em maiores concentrações e produtividade de pneumolisina. Um aumento da temperatura foi prejudicial à produtividade da pneumolisina solúvel (LUCHESE *et al.*, 2009). No entanto, temperaturas intermédias dentro da faixa 25°C e 37°C, não foram testadas. Pelo previamente discutido, neste trabalho definiu-se 37°C como nível superior deste fator, temperatura padrão de crescimento e expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* em diversos trabalhos, 25°C como nível inferior do fator, pois a temperaturas inferiores a 20°C o acúmulo de células se encontra sensivelmente reduzido, além de que processos a baixa temperatura requerem refrigeração e, portanto resultam em um aumento significativo dos custos de produção em escala industrial (VOLONTÈ *et al.*, 2008). O nível intermedio foi de 31°C.

Definidas todas as variáveis a estudar e as faixas nas quais vão ser avaliadas, procedeu-se a delinear o plano fatorial fracionado empregado na dissertação. A construção deste plano experimental foi feita da seguinte forma: as primeiras quatro colunas foram preenchidas como se de um fatorial completo 2⁴ tratara-se. A primeira coluna foi preenchida com os valores -1 e +1 intercalados sucessivamente. A segunda coluna completou-se com esses valores, mas intercalados de dois em dois, primeiramente duas vezes o valor -1 e depois duas vezes o valor +1 e assim para frente. No caso do preenchimento da terceira coluna o padrão de intercalamento foi feito de quatro em quatro, e na quarta coluna usou-se um padrão de intercalamento de oito em oito.

Tendo prontas as quatro primeiras colunas, para completar as outras quatro restantes é necessário determinar que combinação de três colunas diferentes, das quatro já preenchidas, define a cada uma delas. Para o delineamento usado, essas combinações são as seguintes: a quinta coluna é combinação da segunda, terceira e quarta coluna preenchida; a sexta coluna é combinação das filas da primeira, terceira e quarta coluna; a sétima coluna é combinação da primeira, segunda e terceira coluna; a oitava coluna é combinação da primeira, segunda e quarta

coluna. Conhecendo a combinação corresponde a cada coluna, o preenchimento dela é simplesmente mediante a multiplicação dos valores +1 e -1 de cada fila das três colunas correspondentes à combinação. Como se tem quatro colunas preenchidas, e as combinações foram feitas somente com três delas, então temos 12 combinações diferentes possíveis, sendo que todas elas permitem manter a propriedade de ortogonalidade do plano fracionado. Dessa forma o plano fatorial fracionado 2^{8-4} , apresentado na Tabela 3.1, fica conformado.

Tabela 3.1 Plano fatorial fracionado empregado. V1=Absorbância na indução, V2=Concentração do indutor, V3=Temperatura de indução, V4=Concentração de extrato de levedura, V5=Concentração de triptona, V6=Concentração de glicose, V7=concentração de glicerol, V8=concentração de canamicina. Para a geração deste plano foram feitas as combinações: $V5=V2 \times V3 \times V4$, $V6=V1 \times V3 \times V4$, $V7=V1 \times V2 \times V3$, e $V8=V1 \times V2 \times V4$. O plano fatorial inclui 16 condições experimentais diferentes, e oito réplicas do ponto central (PC). Entre parênteses os valores normalizados das variáveis.

	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8
Condição experimental	Absorbância na Indução (Abs)	Conc. Indutor (mM)	Tem. de Indução (°C)	Conc. Ext levedura (g/L)	Conc. Triptona (g/L)	Conc. Glicose (g/L)	Conc. Glicerol (% v/v)	Conc. Canamicina (µg/mL)
1	0,8 (-1)	0,10 (-1)	25 (-1)	5,0 (-1)	0 (-1)	1,0 (-1)	0,0 (-1)	10 (-1)
2	2,0 (+1)	0,10 (-1)	25 (-1)	5,0 (-1)	0 (-1)	10,0 (+1)	0,4 (+1)	50 (+1)
3	0,8 (-1)	1,00 (+1)	25 (-1)	5,0 (-1)	10 (+1)	1,0 (-1)	0,4 (+1)	50 (+1)
4	2,0 (+1)	1,00 (+1)	25 (-1)	5,0 (-1)	10 (+1)	10,0 (+1)	0,0 (-1)	10 (-1)
5	0,8 (-1)	0,10 (-1)	37 (+1)	5,0 (-1)	10 (+1)	10,0 (+1)	0,4 (+1)	10 (-1)
6	2,0 (+1)	0,10 (-1)	37 (+1)	5,0 (-1)	10 (+1)	1,0 (-1)	0,0 (-1)	50 (+1)
7	0,8 (-1)	1,00 (+1)	37 (+1)	5,0 (-1)	0 (-1)	10,0 (+1)	0,0 (-1)	50 (+1)
8	2,0 (+1)	1,00 (+1)	37 (+1)	5,0 (-1)	0 (-1)	1,0 (-1)	0,4 (+1)	10 (-1)
9	0,8 (-1)	0,10 (-1)	25 (-1)	23,6 (+1)	10 (+1)	10,0 (+1)	0,0 (-1)	50 (+1)
10	2,0 (+1)	0,10 (-1)	25 (-1)	23,6 (+1)	10 (+1)	1,0 (-1)	0,4 (+1)	10 (-1)
11	0,8 (-1)	1,00 (+1)	25 (-1)	23,6 (+1)	0 (-1)	10,0 (+1)	0,4 (+1)	10 (-1)
12	2,0 (+1)	1,00 (+1)	25 (-1)	23,6 (+1)	0 (-1)	1,0 (-1)	0,0 (-1)	50 (+1)
13	0,8 (-1)	0,10 (-1)	37 (+1)	23,6 (+1)	0 (-1)	1,0 (-1)	0,4 (+1)	50 (+1)
14	2,0 (+1)	0,10 (-1)	37 (+1)	23,6 (+1)	0 (-1)	10,0 (+1)	0,0 (-1)	10 (-1)
15	0,8 (-1)	1,00 (+1)	37 (+1)	23,6 (+1)	10 (+1)	1,0 (-1)	0,0 (-1)	10 (-1)
16	2,0 (+1)	1,00 (+1)	37 (+1)	23,6 (+1)	10 (+1)	10,0 (+1)	0,4 (+1)	50 (+1)
PC	1,4 (0)	0,55 (0)	31 (0)	14,3 (0)	5 (0)	5,5 (0)	0,2 (0)	30 (0)

3.3 - Ordem de realização dos experimentos.

Ao se realizar um planejamento fatorial, seja completo ou fracionado, é recomendável que os experimentos sejam realizados de forma aleatória. Essa

aleatoriedade tem a finalidade de proteger os resultados de possíveis influências de fatores desconhecidos não controlados. É de esperar que essas influências de fatores desconhecidos fiquem neutralizadas ao estar disseminada entre todos os efeitos de forma que nenhum deles seja especialmente afetado e não aconteçam erros ao avaliar sua significância estatística (ESPINAL, 2007). Contudo, a realidade experimental muitas vezes faz que isso seja difícil de realizar. Neste trabalho, uma das variáveis estudadas foi a temperatura de expressão após a indução. Para isso, empregaram-se agitadores orbitais com controle de temperatura, onde vários experimentos com diferentes condições estudadas, mas com a mesma temperatura de indução, foram feitos ao mesmo tempo em diferentes conjuntos de experimentos. Assim teve-se sete conjuntos de experimentos de acordo como apresentado na Tabela 3.2.

Para cada conjunto de experimentos, além dos experimentos indicados, realizou-se um controle de reprodutibilidade que garanta que as diferentes condições experimentais possam ser comparáveis estatisticamente. Os controles consistiram no cultivo celular da cepa em meio TB, com glicose: 10g/L, glicerol: 0,4% v/v, e canamicina: 50µg/ml. A indução desses controles foi feita com adição de IPTG 1mM, quando o crescimento celular atingiu absorvância de 0,8. A temperatura de indução foi a mesma que a empregada em cada conjunto de experimentos. A comparação entre os controles permitiu ver a reprodutibilidade deles e, portanto, saber se as variações obtidas nas respostas dos diferentes experimentos dos diversos conjuntos de experimentos deveram-se às condições experimentais ou a alguma possível variação não avaliada que possa haver existido nesse dia. No caso de existir diferença de um controle sobre os demais controles de diferentes dias, as respostas observadas nesse grupo de experimentos foram descartadas, pois elas incluem as variações por causas externas ao sistema avaliado. Neste caso, o grupo de experimentos foi repetido. Não existindo diferenças entre os controles dos diferentes conjuntos de experimentos, foi considerado que as respostas observadas em todos eles foram exclusivamente devido às influências das variáveis avaliadas. Sendo todos os experimentos comparáveis entre si, foi realizada a etapa da análise estatística dessas variáveis estudadas neste trabalho.

Tabela 3.2 Ordem de realização dos diferentes conjuntos de experimentos com seus respectivos controles.

Conjuntos	Temperatura	Experimentos	Controle
1	-1 (25 °C)	9 - 10 - 12	TB (25 °C)
2	-1 (25 °C)	1 - 2 - 4	TB (25 °C)
3	-1 (25 °C)	3 - 11	TB (25 °C)
4	+1 (37 °C)	5 - 6 - 8	TB (37 °C)
5	+1 (37 °C)	7 - 13 - 14 - 15 - 16	TB (37 °C)
6	0 (31 °C)	17- 18 - 19 - 20	TB (31 °C)
7	0 (31 °C)	21 - 22 - 23 - 24	TB (31 °C)

3.4 - Expressão da pneumolisina recombinante.

Para a realização da expressão da proteína recombinante pneumolisina foi utilizado um único lote de trabalho do clone de *E. coli* BL21 Star (DE3) / pET28a / *ply*. Um esquema geral do procedimento realizado para fazer a expressão e a análise de solubilidade da proteína heteróloga se mostra na Figura 3.1.

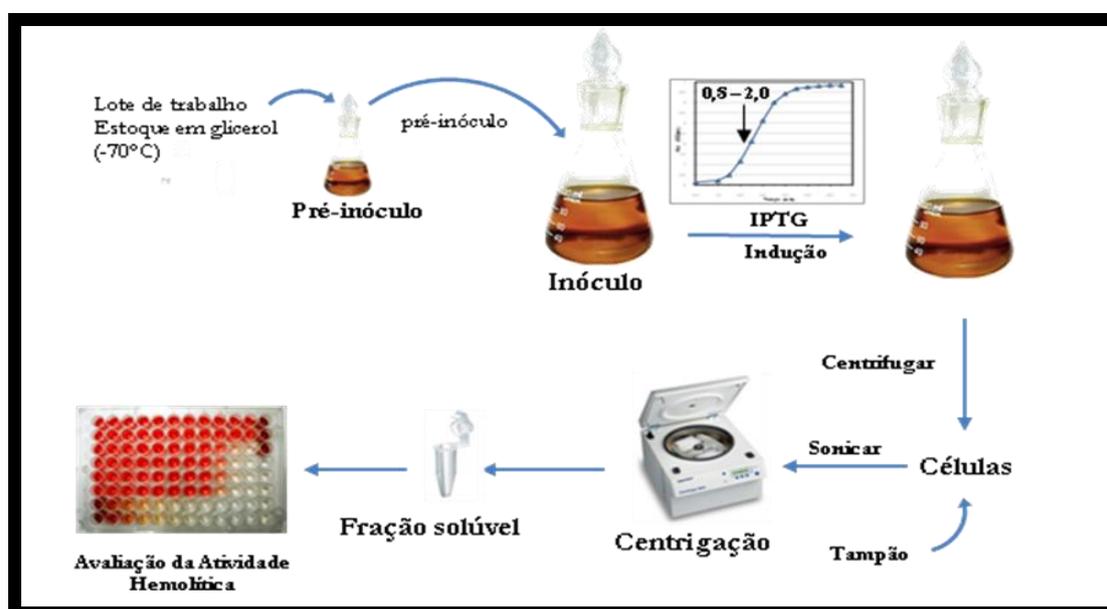


Figura 3.1 Esquema dos procedimentos realizados nos experimentos de expressão e análise de solubilidade da proteína.

Inicialmente preparou-se o pré-inóculo colocando 10µL do lote de trabalho da bactéria recombinante *E. coli* BL21 Star (DE3)/pET28a/*ply* em 10mL de meio TB enriquecido com 1% de glicose, 0,4% de glicerol e 50µg/mL de canamicina. O pré-

inóculo foi incubado por 16 horas a 37°C e agitação de 200rpm, em frascos agitados de 50mL. De forma simultânea à preparação do pré-inóculo, a viabilidade celular do lote de trabalho empregado foi avaliada a partir da contagem de UFC (Unidades Formadoras de Colônia). Foram feitas diluições seriadas em PBS (pH 7,4), e alíquotas delas foram distribuídas em placas de Petri contendo LB Ágar e canamicina 50µg/mL. Na Figura 3.2 é mostrado um esquema das etapas realizadas na análise de viabilidade celular.

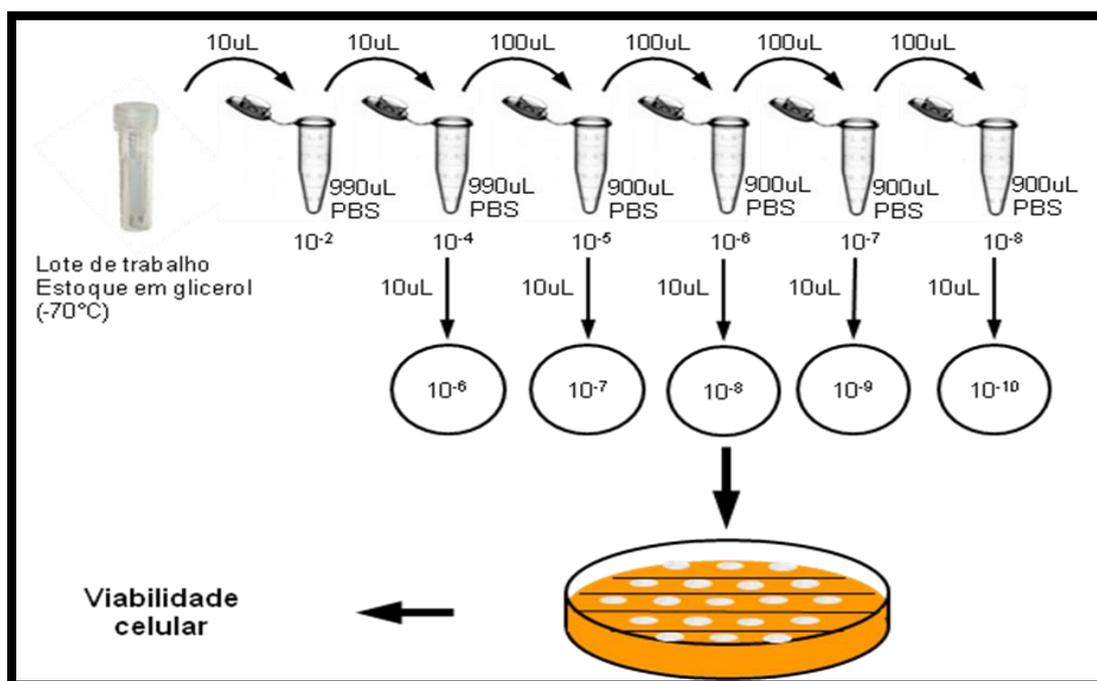


Figura 3.2 Esquema dos procedimentos realizados para a análise de viabilidade celular.

Após as 16 horas, a preparação do meio avaliado realizou-se em frascos de 500mL, com 2mL do pré-inóculo em 100mL do meio de cultivo, enriquecido com glicose, glicerol e canamicina. As concentrações de extrato de levedura, triptona, glicose, glicerol e canamicina empregadas em todos os meios de cultivos foram ajustadas de acordo com o delineamento fatorial fracionado apresentado na Tabela 3.1. Além dos componentes previamente descritos, colocou-se em todos os meios de cultivos 10g/L de NaCl. O crescimento celular foi feito a 37°C e 200rpm até atingir o início da fase exponencial de crescimento (0,8) ou a metade da mesma (2,0), dependendo do indicado no plano fatorial fracionado para cada experimento (o acompanhamento foi feito a 600nm). Atingida esse crescimento celular, a expressão de rPly foi induzida mediante a adição ao meio de cultivo de IPTG em

quantidades correspondentes à condição a avaliar (0,1mM, ou 1,0mM). A expressão foi feita por 4 horas a 25°C ou 37°C de temperatura, de acordo com a condição indicada no desenho experimental. Além das dezesseis diferentes condições de expressão indicadas no delineamento fatorial fracionado, realizou-se a condição de ponto central, onde os valores de todas as variáveis estudadas correspondem à média dos valores limites das faixas avaliadas (Abs: 1,40 – IPTG: 0,55mM – Temperatura de expressão: 31°C – extrato de levedura: 14,3g/L – triptona: 5g/L – glicose: 5,5g/L – glicerol: 0,2% v/v – canamicina: 30µg/mL)

Amostras de 1mL dos diferentes cultivos, antes da indução e depois das 4 horas de indução, foram retiradas e centrifugadas a 14000rpm, 10 minutos a 4°C em centrífuga Eppendorf 5417R (rotor F45-30-11) para separar o sobrenadante do precipitado celular. O sobrenadante foi empregado para a determinação da concentração final de glicose e glicerol. O precipitado celular foi empregado para a determinação da atividade biológica.

Os mesmos procedimentos de crescimento e indução/expressão foram realizados empregando a cepa com o plamídeo sem o gene de interesse como controle negativo, para verificar se o clone *E. coli* BL21 Star (DE3) / pET28a possui atividade hemolítica, permitindo confirmar se a atividade biológica verificada está relacionada somente com a proteína recombinante pneumolisina ou com algum outro componente celular. Para tanto, as células *E. coli* BL21 Star (DE3) / pET28a / *ply* expressando a proteína recombinante pneumolisina, assim como a célula *E. coli* BL21 Star (DE3) / pET28a empregada como controle negativo, foram plaqueadas em meio ágar casoy sangue a fim de verificar a produção dos halos de hemólise. A produção destes halos foi verificada somente na placa com células expressando pneumolisina, e não no controle negativo, confirmando a atividade hemolítica se deve à proteína de interesse expressa.

3.5 - Determinação da solubilidade da pneumolisina.

3.5.1 - Preparação das amostras.

A análise da pneumolisina expressa de forma solúvel foi feita mediante determinação da atividade hemolítica. O correto enovelamento das proteínas permite que fiquem solúveis no citoplasma da célula, ao passo que enovelamentos incorretos ou agregados formam precipitados conhecidos como corpos de inclusão (SØRENSEN e MORTENSEN, 2005). Por outro lado, diversos trabalhos na literatura mostram a importância do correto enovelamento das proteínas para que elas sejam biologicamente ativas; os corpos de inclusão são estruturas em que as proteínas não estão corretamente enoveladas, geralmente reduzindo significativamente a atividade biológica (PARRILLI *et al.*, 2010). Por isso, o nível de expressão solúvel da pneumolisina foi avaliado através da determinação da atividade biológica da proteína.

Para a realização dessa análise, precisa-se da fração solúvel de pneumolisina presente no sobrenadante. Para a obtenção dessa fração solúvel, foram retiradas amostras de 1mL de todos os experimentos realizados, antes da adição do indutor e no final das 4 horas de expressão. Por centrifugação a 14000rpm por 10 minutos a 4°C em centrífuga Eppendorf 5417R (rotor F45-30-11) foram separados os sobrenadantes dos precipitados celulares. Esses precipitados celulares foram ressuspensos em tampão de lise (Tris 20mM; EDTA 1mM; NaCl 200mM, pH 8,0), restituindo o volume original de 1 mL. A suspensão foi submetida à lise celular por ultra-som fazendo oito ciclos de sonicação de 10 segundos, de intensidade de 60%, seguido de 60 segundos de resfriamento, em sonicador Sonics&Material Inc. Posteriormente, por centrifugação por 10 minutos a 14000rpm a 4°C, foram separadas as frações de proteínas solúveis das insolúveis. As frações solúveis obtidas foram empregadas nos testes de atividade hemolítica.

3.5.2 - Teste de Atividade Hemolítica.

3.5.2.1 - Desenvolvimento da Metodologia.

De acordo com a literatura, existem basicamente dois métodos para a determinação da atividade hemolítica, o método do ponto final e o método cinético. O método do ponto final consiste em misturar uma suspensão de hemácias junto

com a amostra contendo a proteína a dosar, deixá-la reagir e depois disso decantar as hemácias que não foram lisadas. Retirar uma alíquota do sobrenadante da mistura e fazer a dosagem da hemoglobina livre nesse sobrenadante em espectrofotômetro. A resposta considerada como unidade hemolítica (UH) é a maior diluição, ou inversa da diluição, na qual acontece 50% ou mais de hemólise. Exemplos do uso desta metodologia, com certas modificações são os trabalhos de PATON *et al.* (1983), NOLLMAN *et al.* (2004), YU *et al.* (2007), PRICE e CAMILLI (2009), e YAMAGUCHI *et al.* (2009). O método cinético consiste no acompanhamento da cinética de diminuição de turbidez do meio por causa da lise celular, da mistura entre a amostra de pneumolisina e uma suspensão de hemácias. Este método é empregado em trabalhos como o de LANIO *et al.* (2003), e GÓRNICKI (2008).

Baseados nas metodologias descritas na literatura foram realizados testes de atividade hemolítica para determinar qual desses métodos é o mais adequado para ser utilizado nesta dissertação. Os parâmetros avaliados foram a reprodutibilidade que apresenta o método, e a capacidade que ele apresenta para comparar amostras com níveis de atividades hemolíticas diferentes.

3.5.2.1.1 - Método do ponto final.

Para a validação das amostras por esta metodologia, foram empregadas microplacas de 96 poços de fundo redondo com a finalidade de facilitar a formação do precipitado de hemácias numa das etapas do processo. As curvas do padrão e das amostras foram realizadas em duplicata. Para a diluição das amostras empregou-se o tampão Tris 20mM; EDTA 1mM; NaCl 200mM (tampão TEN). O uso desse tampão é devido a estudos prévios demonstraram que o Tris é o diluente que melhor desempenho demonstrou dentre todos os diluentes avaliados; o EDTA atua como quelante de metais que são cofatores das proteases; o NaCl é empregado para evitar a lise celular por osmose. O seguinte protocolo foi feito em cada placa testada.

Preparação da suspensão de hemácias 2%: a suspensão de hemácias 2% se obteve mediante a centrifugação de sangue de carneiro fresco desfibrinado a 1500rpm por 20min a 4°C em centrífuga Eppendorf 5810R (rotor A-4-62). Posteriormente, retirou-se o soro separado do precipitado celular e colocou-se um volume de tampão TEN igual ao do soro retirado. Agitar por imersão para lavar o precipitado celular decantado no fundo do tubo e centrifugar novamente nas mesmas condições. Finalizada a centrifugação, retirar o sobrenadante do frasco e colocar o mesmo volume de tampão TEN. Realizar este processo de lavagem e centrifugação três vezes no total. Finalmente, retirar o sobrenadante, deixando somente o precipitado celular lavado. Com ele, preparar uma suspensão de hemácias 2% v/v em tampão TEN.

Preparação da curva padrão: como amostra padrão de hemólise total foi empregada uma suspensão de hemácias 2% em tampão TEN, a qual foi completamente lisada por ultra-som mediante 8 ciclos de sonicação de 1 minuto, de intensidade de 60%, e intervalos de resfriamento de 1 minuto entre cada ciclo de sonicação. Em microplaca de 96 poços, de fundo redondo, no primeiro poço das duas primeiras filas (A e B) colocou-se 100µL da amostra de hemácias 2% completamente lisada, e diluições seriadas ao 1/2 foram feitas ao longo da fila com tampão TEN, deixando o último poço da placa (A12 e B12) só com tampão TEN como controle negativo. Logo depois, adicionaram-se outros 100µL de tampão TEN para completar o volume de 200µL por poço. O controle negativo foi feito para determinar o nível de hemoglobina liberada por hemólise espontânea das hemácias 2% que possa acontecer ao longo do experimento.

Testes de atividade hemolítica apresentados na literatura definem como unidade hemolítica (UH) a maior diluição, ou inversa da diluição, na qual se observa um 50% ou mais de hemólise. Essa forma de dosar a atividade hemolítica não permite reconhecer pequenas diferenças existentes entre amostras. Por isso, neste trabalho designou-se como 1 unidade hemolítica a quantidade de pneumolisina presente numa amostra, que permite obter hemólise completa de uma suspensão de hemácias 2%, depois de 1h de incubação a 37°C. Assim, o primeiro poço da curva padrão contém 1 unidade hemolítica. Esse valor de atividade hemolítica é em referência a 1mL de amostra do meio de cultivo procedente dos erlenmeyers.

Preparação das curvas das amostras: no primeiro poço de cada uma das filas C, D, E, F, e G foram adicionadas 100µL de amostras inicialmente diluídas 1/50. Ao longo das filas foram feitas diluições seriadas ao 1/2 das amostras em tampão TEN, deixando o último poço somente com tampão TEN como controle negativo. Esquema das diluições feitas numa placa é apresentado na Figura 3.3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,000	0,500	0,250	0,125	0,063	0,031	0,016	0,008	0,004	0,002	0,001	Ctrl -
B	1,000	0,500	0,250	0,125	0,063	0,031	0,016	0,008	0,004	0,002	0,001	Ctrl -
C	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	Ctrl -
D	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	Ctrl -
E	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	Ctrl -
F	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	Ctrl -
G	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	Ctrl -
H	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	Ctrl -

Figura 3.3 Esquema das diluições feitas numa microplaca de 96 poços. Nas filas A e B da placa são feitas as curvas do padrão de hemólise, mediante diluições seriadas ao 1/2 com tampão TEN. As curvas começam com 1UH/mL. Nas filas C, D, E, F, e G são feitas as curvas das amostras com pneumolisina, mediante diluições seriadas ao 1/2 com tampão TEN. As curvas começam com uma diluição de 1/50. Na coluna 12 estão os controles negativos de cada fila.

Adição da suspensão de hemácias 2%: em todos os poços com as amostras de pneumolisina adicionou-se 100µL da suspensão de hemácia 2% para completar os 200µL por poço. Agitou-se a placa por 15 segundos no agitador de placas.

Incubação das placas: as placas foram incubadas em câmara úmida em estufa a 37°C por 1 hora para deixar acontecer o processo de lise celular. Posteriormente, retirou-se da estufa e colocou-se em geladeira a 4°C durante a noite para deixar decantar as hemácias não lisadas, formando um precipitado de hemácias nos fundos dos poços redondos. Na Figura 3.4 pode-se observar como exemplo, uma imagem da microplaca após o período de incubação.

Retirada dos sobrenadantes: passado o período de decantação, retirar, com cuidado para não carregar hemácias sedimentadas, 100µL do sobrenadante de

cada um dos poços e passar a microplacas de 96 poços de fundo chato. Na Figura 3.5 pode-se observar como exemplo, uma imagem da microplaca com os sobrenadantes.

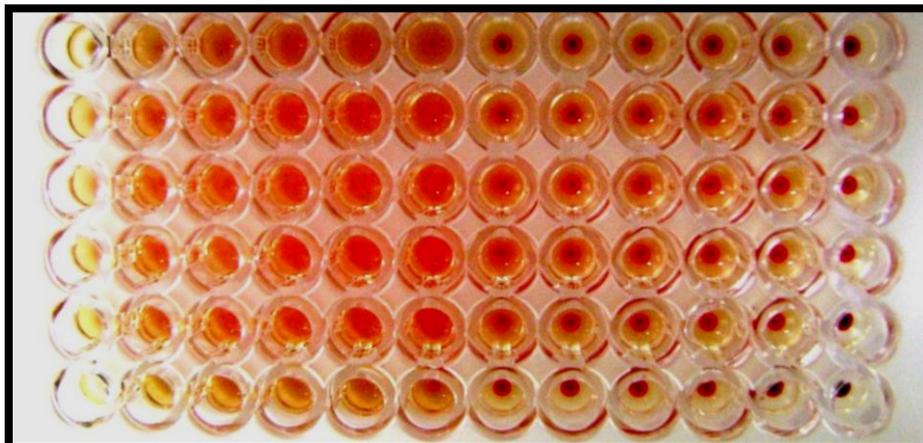


Figura 3.4 Exemplo de microplaca após o período de incubação. Nos primeiros poços das filas pode se perceber hemólise completa e, portanto, sem formação de precipitados de hemácias. Já nos poços da metade até o final da fila apresentam formação de precipitados de hemácias. Os precipitados são maiores quanto mais diluídas são as amostras de pneumolisina. Nos poços últimos das filas estão os controles negativos.

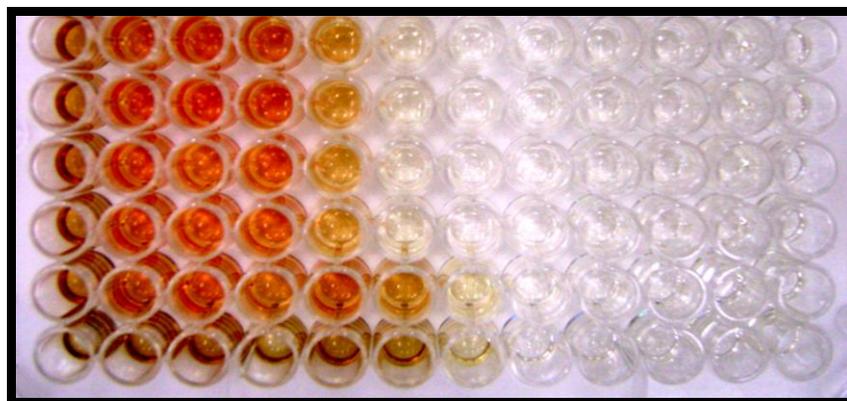


Figura 3.5 Exemplo de microplaca com os sobrenadantes. Nos primeiros poços onde as amostras estão mais concentradas, a hemólise é maior e, portanto o sobrenadante apresenta maior quantidade de hemoglobina livre o que determina que a cor vermelha seja mais intensa. Nas sucessivas diluições das amostras de pneumolisina, a lise celular vai sendo gradativamente menor e, portanto, a quantidade de hemoglobina livre também é menor, o que determina que a cor vermelha seja cada vez menos intensa.

Dosagem dos sobrenadantes: a medição da hemoglobina liberada no sobrenadante foi feita a 540nm. Trabalhos da literatura empregam diferentes comprimentos de

onda para fazer a dosagem dos sobrenadantes com hemoglobina (PATON *et al.*, 1983, NOLLMAN *et al.*, 2004, YU *et al.*, 2007, PRICE e CAMILLI 2009, YAMAGUCHI *et al.*, 2009). Para determinar qual valor de comprimento de onda é o mais adequado, foi feita uma varredura do comprimento de onda, empregando como amostra uma alíquota da suspensão de hemácias 2% completamente hemolisada. De acordo com os resultados obtidos na Figura 3.6, 540nm foi o comprimento de onda mais adequado para fazer a medição, pois é um pico máximo de absorbância e apresenta uma variabilidade muito baixa na medição por duplicata de uma mesma amostra. No entanto, os comprimentos de onda de 405nm, 415nm ou 450nm, empregados por diversos trabalhos na literatura para fazer a dosagem de amostras com hemoglobina, apresentaram maior variabilidade que a 540nm ao fazer a medição em duplicata de uma mesma amostra. O leitor de microplacas empregado foi Sunrise (Tecan).

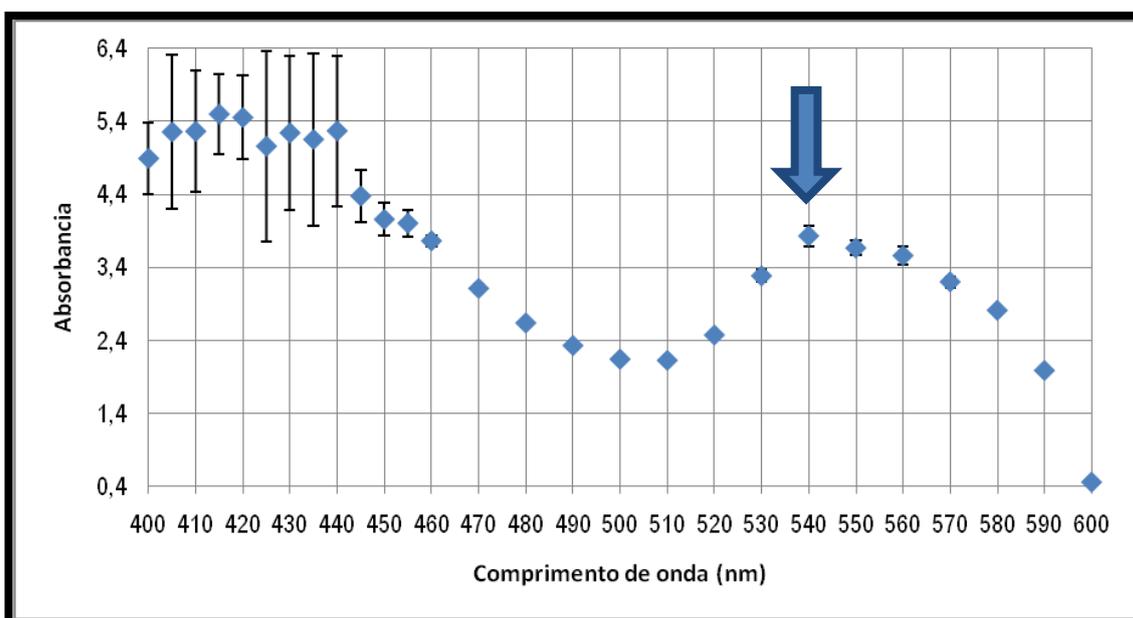


Figura 3.6 Varredura do comprimento de onda para avaliar os picos máximos de absorbância e a variabilidade que apresenta na medição por duplicata de uma mesma amostra. A seta mostra o comprimento de onda escolhido.

Cálculo da atividade hemolítica das amostras: para a realização dos gráficos das curvas, primeiramente subtraíram-se os valores de absorbância dos controles negativos de cada fila, de todas as medições de absorbâncias da mesma fila da microplaca de 96 poços. Posteriormente representou-se o gráfico Abs_{540nm} em função da atividade hemolítica (escala semi-logarítmica) para o caso da curva

padrão. No caso das amostras, representou-se o gráfico Abs_{540nm} em função da diluição (escala semi-logarítmica). A escala semi-logarítmica permite determinar a faixa linear das curvas onde a relação entre atividade, ou diluição, e absorbância é proporcional.

Nessa faixa linear, para um determinado valor de absorbância, da curva padrão determinou-se o correspondente valor da atividade hemolítica, e da curva da amostra foi determinada a diluição da amostra que tem esse valor de atividade. Com esses dois valores, a atividade hemolítica da amostra de pneumolisina sem diluir, foi obtida por divisão entre a atividade hemolítica do padrão e a diluição da amostra. Na Figura 3.7 é apresentado, como exemplo, as curvas obtidas por esta metodologia e como foi feito o cálculo da atividade.

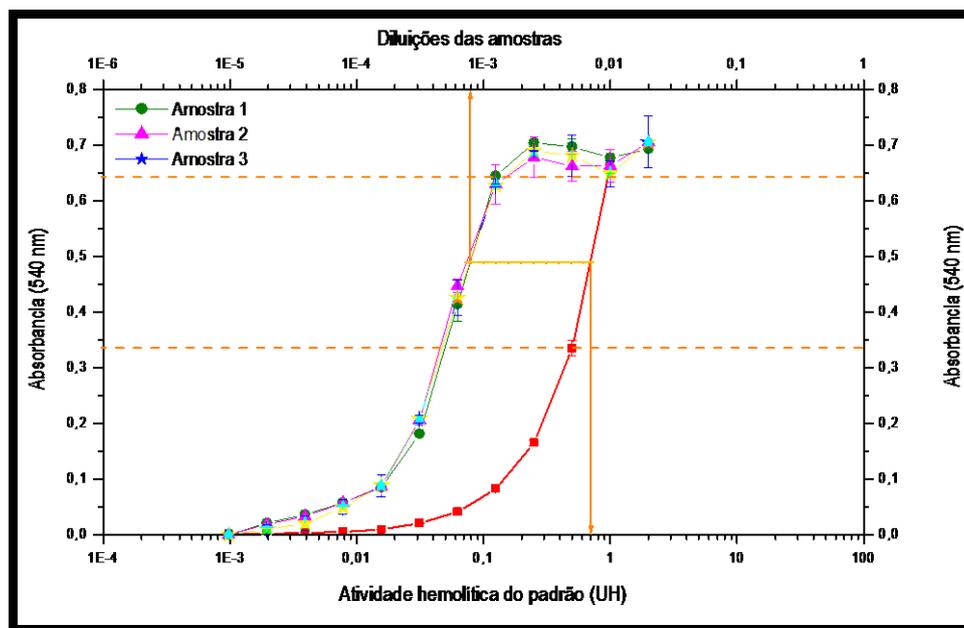


Figura 3.7 Gráfico da curva padrão (—■—) e das curvas de 3 amostras (—●—; —▲—; —★—). O eixo inferior é atividade hemolítica do padrão em escala logarítmica; o eixo superior é diluições das amostras em escala logarítmica; os eixos direito e esquerdo são absorbância. As linhas pontilhadas de cor laranja indicam a região de linearidade escolhida para a determinação da atividade hemolítica das amostras. Para um determinado valor de absorbância (Abs), da curva padrão pode se conhecer a atividade hemolítica do padrão (A_{Abs}) (seta laranja que desce até o eixo da atividade hemolítica); para esse mesmo valor de absorbância Abs, das curvas de amostras 1, 2, e 3 podem se conhecer as diluições (D) correspondentes a essa Abs (D_{Abs^1} ; D_{Abs^2} ; D_{Abs^3}). Os valores das atividades hemolítica das amostras 1, 2, e 3, são obtidos dividindo A_{Abs} por D_{Abs^1} , D_{Abs^2} , e D_{Abs^3} respectivamente.

3.5.2.1.2 - Método Cinético.

Para a determinação da atividade hemolítica das amostras de pneumolisina pelo método cinético, foram utilizados os sobrenadantes dos experimentos e da suspensão de hemácias 2%. Volumes iguais (100µL) de suspensão de hemácias e de amostra foram misturados num poço de microplaca de 96 poços de fundo chato. Logo depois, foi colocado na leitora de placas a 25 °C para fazer a medição da turbidez da mistura a 600nm. O processo de medição da queda de turbidez consistiu em 80 ciclos de medições, cada 15 segundos, com agitação prévia à medição de 5 segundos para homogeneizar a mistura. Cada amostra de pneumolisina foi avaliada em duplicata. Um controle negativo foi feito colocando 100µL de tampão TEN no lugar de uma amostra com pneumolisina, para avaliar a queda espontânea da turbidez devido ao tampão.

O perfil da curva obtida por esta metodologia é uma sigmoideal decrescente. Ela começa com um valor máximo de absorbância, continuando com uma queda desse valor até atingir um valor mínimo de absorbância. Uma possível associação entre esse perfil da curva e o fenômeno de lise celular que está acontecendo pode ser realizada. Inicialmente, a suspensão de hemáceas sem sofrer lise celular nenhuma apresenta um máximo de absorbância (turbidez). Enquanto os monômeros de pneumolisina interagem na membrana das hemácias para formar o pre-poro, essa leitura de absorbância continua nesse máximo. Quando os pré-poros mudam de conformação para a estrutura de poro transmembranar, começa a lise celular das hemácias e conseqüentemente começa a diminuir a leitura de absorbância (turbidez). Esse processo continua até atingir hemólise completa, e a partir desse momento, a turbidez da suspensão de hemácias atinge um mínimo e não muda mais. Esse nível inferior de turbidez corresponde ao mínimo de absorbância lida. No entanto, se a concentração de pneumolisina presente na mistura com a suspensão de hemácia é baixa, o nível mínimo de turbidez não vai ser atingido dentro do tempo de leitura total. Neste caso a curva vai só apresentar o nível máximo de absorbância, e parte da queda da turbidez sem poder ver o mínimo de turbidez. A curva obtida por este método apresentou um valor de turbidez inicial superior correspondente à etapa na qual os monômeros de pneumolisina estão se ancorando nas membranas das hemácias para formar o

complexo multimérico que acaba gerando o poro transmembranar, e por tanto as células não foram ainda hemolisadas. A seguir, a curva apresentou uma queda da turbidez que corresponde à etapa na qual as hemácias vão sendo lisadas por causa da formação dos canais transmembranares. Finalmente o gráfico atingiu um valor de turbidez inferior e constante, correspondente à etapa na qual todas as hemácias foram completamente hemolisadas (platô inferior). Dependendo da concentração de pneumolisina presente na amostra, pode ou não se observar o platô inferior. Um exemplo deste tipo de gráfico é apresentado na Figura 3.8.

Na Figura 3.8 estão mostrandos o perfil de 3 amostras diferentes. Uma das curvas (amostra 1) é a amostra de pneumolisina obtida do processo na condição do ponto central. As outras duas curvas correspondem à amostra 1 diluída 10 vezes. Um dos objetivos da realização da cinética para estas 3 amostras é ver que parte da curva permite determinar essa relação de 1:10 existente entre a amostra 1 e as amostras diluídas, pois pode ser a parte que indica o tempo de formação dos poros transmembranais ou pode ser a parte que indica a taxa de diminuição da turbidez por causa da lise celular. No caso do tempo de formação dos poros, comparou-se o tempo no qual começa a se perceber a queda da turbidez. No caso da taxa de diminuição da turbidez, comparou-se a inclinação da região linear das curvas. Outro dos objetivos a avaliar com essas 3 amostras, é ver se as amostras diluídas, realizadas em duplicata, são reproduzíveis. É importante resaltar, que nos trabalhos da literatura onde esta metodologia foi empregada, a comparação foi feita de forma qualitativa e não quantitativa, e por isso, tentou-se determinar qual metodologia seria a mais adequada para realizar a comparação, se pelo tempo de formação de poro ou pela taxa de diminuição da turbidez.

Quando a comparação das amostras foi feita mediante a avaliação dos tempos de formação dos poros, no caso da curva da amostra 1, pode-se perceber que apresentou um tempo de formação de poros curto, de só 2 ciclos de medição. No caso das amostras diluídas 1/10, o tempo de formação de poros foi de 20 ciclos. Assim, avaliando o tempo de formação de poros, a relação entre a amostra 1 e as amostras diluídas, coincide o com valor de diluição (1/10). No entanto, quando a comparação das amostras foi feita mediante a avaliação das taxas de queda da turbidez, a conclusão foi outra. A relação obtida entre a amostra 1 e as

amostras diluídas não coincidiu com o valor da diluição, tendo um erro de 70% em relação a esse valor.

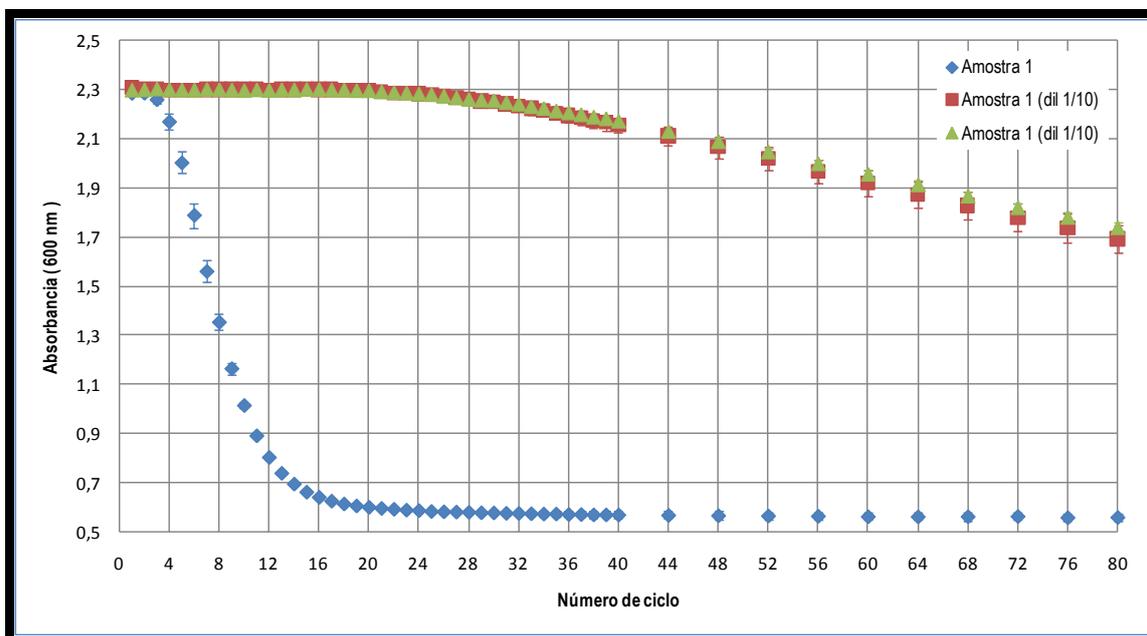


Figura 3.8 O gráfico mostra a queda da turbidez por causa da hemólise das hemácias. A medição de absorvância foi a 600nm. A curva da cinética de hemólise apresenta três partes, um platô superior, seguida de uma queda da turbidez, e finalmente um valor de absorvância inferior (platô inferior). Dependendo da concentração de pneumolisina presente na amostra, pode ou não se observar o platô inferior.

Uma vez que não foi possível padronizar totalmente este último método de medição da atividade hemolítica, sendo pouco adequado para comparar amostras de pneumolisina dos diferentes experimentos do plano fatorial fracionado, foi decidido empregar a metodologia do ponto final.

3.6 - Determinação da glicose nos sobrenadantes dos cultivos.

A determinação da glicose residual no meio de cultivo após as quatro horas de indução da proteína recombinante foi realizada mediante o método enzimático do kit comercial (LaborLab). A técnica consiste em submeter a glicose presente nas amostras à ação da enzima glicose oxidase (GOD), e o peróxido de hidrogênio produzido reage com os reativos de cor, gerando um complexo colorido que absorve a 505nm. Esta última reação é catalisada por uma peroxidase. O esquema

das reações que acontecem no processo oxidativo da glicose é apresentado na Figura 3.9.

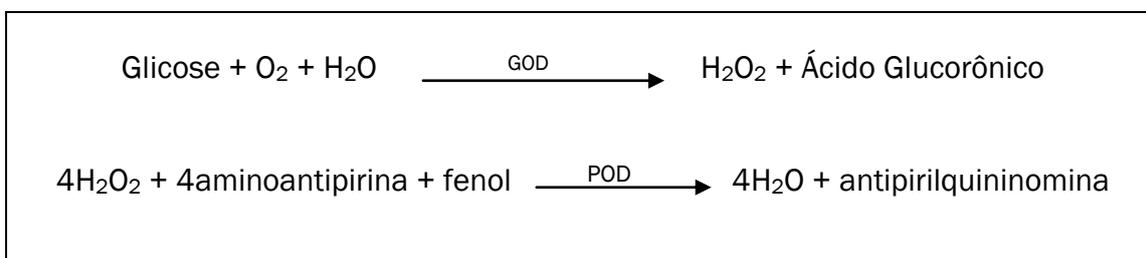


Figura 3.9 Esquema das reações que acontecem no processo oxidativo da glicose.

Primeiramente foi preparado o reativo de trabalho adicionando 12,5mL do reativo de cor 1, 225mL de água para injeção, 12,5mL do reativo de cor 2, e 0,75mL do reativo enzimático em 250mL. Em seguida foram preparadas três misturas diferentes: a mistura do padrão de glicose de concentração 100mg/dL, colocando 10µL do reativo padrão em 1mL de reativo de trabalho, a mistura do branco, colocando 10µL do reativo de trabalho em 1mL de reativo de trabalho, e a mistura das amostras de glicose, colocando 10µL dos sobrenadantes dos cultivos diluídos 1/10, para poder estar numa concentração similar à do reativo padrão, em 1mL de reativo de trabalho. As determinações foram feitas em triplicata e incubadas a 37°C por 10 minutos, e lidas em espectrofotômetro a 505nm, contra o branco de reativo. A mistura do reativo de trabalho foi feita para confirmar a validade do kit. Se a medição de absorbância do reativo de trabalho é menor que 0,120, ele pode ser utilizado, caso contrário o kit deverá ser descartado.

A determinação da concentração de glicose presente nos meios de cultivos foi feita mediante o produto da absorbância de cada amostra por 10, devido à diluição feita, por o fator f , o qual é definido mediante a equação (1).

$$f = \frac{100\text{mg} / \text{dL}}{\text{Abs}^{\text{padrão}}} \quad (1)$$

3.7 - Determinação do glicerol nos sobrenadantes dos cultivos.

A determinação do glicerol residual no meio de cultivo após as quatro horas de indução da proteína recombinante foi realizada mediante o método enzimático do kit comercial (LaborLab). A técnica consiste em várias etapas onde inicialmente o glicerol é fosforilado pela enzima Glicerolquinase a partir da Adenina Tri Fosfato (ATP), obtendo como produto dessa reação L-glicerolfosfato e Adenina Di-Fosfato (ADP). A oxidação enzimática da L-glicerolfosfato pela enzima L-glicerolfosfatooxidase em presença de oxigênio gera como produto peróxido de hidrogeno (H_2O_2) e deidroxiacetonafosfato. Mediante a enzima peroxidase, H_2O_2 forma H_2O na presença de clorofenol e 4-Aminoantipirina (4-AF), enquanto os outros reagentes formam o composto cromóforo *p*-benzoquinona monoimino fenazona. Esse produto colorimétrico é determinado a 505nm. As reações enzimáticas estão indicadas na Figura 3.10.

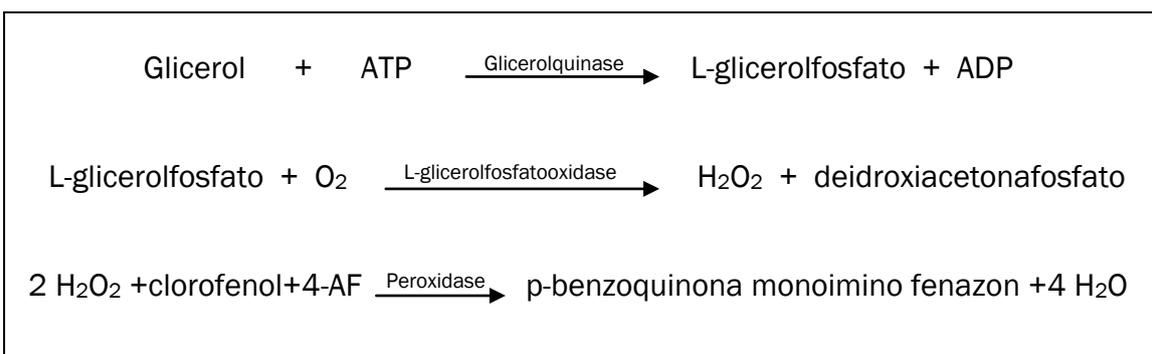


Figura 3.10 Reações enzimáticas do processo de dosagem de Glicerol.

Primeiramente foi preparado o reativo de trabalho dissolvendo lentamente o conteúdo de um frasco de reativo enzimático com 30mL de reativo tampão. Misturou-se por inversão suave até a dissolução completa, evitando a formação de espuma. A seguir, foram preparadas três misturas diferentes: a mistura do padrão de glicerol de concentração 20,8mg/dL, colocando 10 μ L do reativo padrão em 1mL de reativo de trabalho, a mistura do branco, colocando 10 μ L do reativo de trabalho em 1mL de reativo de trabalho, e a mistura das amostras de glicerol, colocando 10 μ L dos sobrenadantes dos cultivos diluídos 1/10, para poder estar numa concentração similar à do reativo padrão, em 1mL de reativo de trabalho. As determinações foram feitas em duplicata e incubadas a 37°C por 15 minutos, e lidas em espectrofotômetro a 505nm, contra o branco de reativo. A mistura do

reativo de trabalho é para confirmar a validade do kit. Se a medição de absorvância do reativo de trabalho é menor que 0,200, ele pode ser utilizado, caso contrário o kit deverá ser descartado.

A determinação da concentração de glicerol presente nos meios de cultivos foi feita mediante o produto da absorvância de cada amostra por 10, devido à diluição feita, por o fator f , o qual é definido mediante a equação (2).

$$f = \frac{20,8mg / dL}{Abs^{padrão}} \quad (2)$$

3.8 - Avaliação qualitativa da expressão por géis SDS-PAGE.

A avaliação da expressão da proteína solúvel foi feita utilizando os precipitados celulares obtidos das amostras de 1mL retiradas dos cultivos após as 4 horas de indução. No caso dos experimentos de validação, as amostras foram retiradas antes da indução e cada 1 hora após a indução pela adição de IPTG. Aos precipitados foi adicionado tampão Tris-HCl 60mM pH6,8, 10% de glicerol, 5% β -mercaptoetanol, 2% de SDS e 0,5% de azul de bromofenol, seguindo a razão de 25 μ L de tampão para cada 0,1 de Abs_{600nm} (normalizando pela Abs_{600nm}). As amostras foram incubadas em banho de água fervente por 5 minutos e aplicadas em Gel de Eletroforese Desnaturante de Poliacrilamida com SDS 12,5% (SDS-PAGE). Foram realizadas corridas a 120V por 90 minutos e então os géis foram corados com Coomassie Blue R-250.

Neste mesmo gel também foi aplicado o marcador de massa molecular LMW (Amersham Bioscience), com bandas de 97kDa, 66kDa, 45kDa, 30kDa, 20,1kDa e 14,4kDa, para comparação com as bandas correspondentes à proteína rPly. A quantidade de proteína expressa em cada condição foi analisada por densitometria em equipamento Bio-Rad (GS-800 Calibrated Densitometer) e programa QuantityOne 4.4.1 no INCQS/Fiocruz.

3.9 - Determinação da velocidade específica de crescimento.

A velocidade específica de crescimento (μ) da condição validada foi calculada a partir da equação de conservação de biomassa (X) para processos em batelada (3).

$$\frac{dX}{dt} = X \cdot \mu \quad (3)$$

Integrando a equação (3) de X_i a X e de 0 a t, sendo X_i o crescimento celular no tempo de indução da expressão ($t=0$), e logo após, aplicando logaritmo natural nos dois lados da igualdade da equação resultante, obteve-se a equação linear (4).

$$\ln(X / X_i) = \mu \cdot t \quad (4)$$

A partir do gráfico de $\ln(X/X_i)$ em função do tempo t, pode-se conhecer o valor da taxa de crescimento celular específica μ , a qual está associada ao valor da inclinação da reta obtida.

4.- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Experimentos de expressão da proteína pneumolisina.

Com a necessidade de avaliar o efeito de diferentes variáveis envolvidas no processo de expressão da proteína recombinante pneumolisina na sua forma solúvel, e minimizar os custos e tempo do processo, analisou-se a influência de determinadas variáveis referentes à composição do meio de cultivo e às condições de indução da proteína sobre as respostas relevantes para nosso estudo (crescimento, atividade e produtividade). Para este fim utilizou-se a ferramenta de planejamento de experimentos, através da realização de um plano fatorial fracionado a dois níveis com oito variáveis (2^{8-4}) e réplicas no ponto central. As oito variáveis independentes avaliadas foram: o crescimento celular no momento da indução da expressão da pneumolisina, a concentração do indutor IPTG empregada para a indução da expressão, a temperatura na qual a indução da pneumolisina é realizada, a concentração do extrato de levedura no meio de cultivo da *Escherichia coli*, a concentração de triptona nesse mesmo meio de cultivo, a concentração de glicose empregada como repressor da expressão da pneumolisina, a concentração de glicerol como uma fonte alternativa de carbono (para contornar o problema da formação de produtos metabólicos ácidos e assim evitar a redução da taxa de crescimento por acidificação do meio), e a concentração do marcador de seleção, o antibiótico canamicina, no meio de cultivo do hospedeiro recombinante. O planejamento permitiu avaliar a influência destas variáveis independentes sobre três respostas específicas do sistema: o crescimento celular final após as 4h de indução da pneumolisina recombinante, a produção de proteína expressa de forma solúvel e a produtividade do sistema, para normalizar o tempo de produção, pois nem todas as condições experimentais do delineamento experimental apresentaram o mesmo tempo de processo, uma vez que o tempo de crescimento a 37°C antes da indução variou dependendo da absorbância testada para adição de IPTG.

Os experimentos foram realizados como descrito no capítulo anterior. O tempo de indução da proteína foi de 4h. Estudos preliminares sobre este mesmo

sistema mostraram que para tempos de indução entre 4h e 6h a produtividade foi similar, mas tempos superiores a 6h não são adequados para a expressão da pneumolisina recombinante com a concomitante redução da produtividade do sistema (LUCHESE *et al.*, 2009). Ao final das 4h de indução, amostras dos cultivos foram retiradas para medições de Abs_{600nm}, com a finalidade de avaliar o crescimento celular. Foram também retiradas amostras para a avaliação da proteína expressa na forma solúvel (mediante teste de atividade hemolítica), como também para a dosagem da concentração residual de glicose e glicerol e pH final. As condições nas quais foram feitos cada um dos experimentos do planejamento fatorial 2⁸⁻⁴ são apresentadas na Tabela 4.1, juntamente com as respostas relevantes analisadas, como a atividade biológica da proteína (UH/mL), crescimento celular (Abs), e atividade/tempo, ou seja, produtividade (UH/mL/min).

TABELA 4.1 Respostas obtidas mediante o planejamento fatorial fracionado 2⁸⁻⁴ com oito réplicas do ponto central. As respostas avaliadas foram Atividade Hemolítica da rPly (UH/mL), Crescimento Celular ao final do processo (Abs), e Atividade Hemolítica em relação ao tempo total do processo de expressão da rPly (UH/mL/min).

Condições do Plano Fatorial	Atividade Hemolítica (UH/mL)	Crescimento celular (Abs)	Produtividade (UH/mL/min)
1	612	2,08	1,77
2	1171	2,86	2,60
3	1307	2,62	3,79
4	1305	3,46	3,07
5	678	3,18	1,99
6	1188	6,42	3,09
7	658	2,78	1,88
8	656	3,76	1,40
9	1446	3,45	4,19
10	1344	4,73	3,34
11	915	2,65	2,65
12	1146	4,21	2,73
13	639	4,09	1,91
14	1013	5,47	2,41
15	335	4,02	1,00
16	1353	5,40	3,22
17	1469	3,60	3,97
18	1557	3,79	4,21
19	1610	3,73	4,47
20	1615	3,82	4,61
21	1506	3,82	4,07
22	1507	3,68	4,07
23	1158	3,24	3,13
24	1263	3,32	3,41

Por meio dos dados apresentados na Tabela 4.1, é possível perceber que a quantidade de pneumolisina solúvel expressa nas diferentes condições experimentais do planejamento fatorial fracionado foi muito diferente entre elas, indicando que existem variáveis do sistema influentes nessa resposta. O mesmo ocorre com crescimento celular e a produtividade do sistema.

Através dos experimentos dos pontos centrais em réplicas obteve-se média de 1461 UH/mL de Ply com desvio padrão de 165 e desvio padrão relativo de 11,3%. Obteve-se também média de 3,63 de crescimento celular no final da expressão com desvio padrão de 0,23 e desvio padrão relativo de 6,3%. A produtividade apresentou média de 3,99 UH/mL/min com desvio padrão de 0,50 e desvio padrão relativo de 12,5%. Estes dados confirmam a reprodutibilidade do processo através da repetição dos pontos centrais em diferentes conjuntos de experimentos.

4.2 - Avaliação do crescimento celular.

Para realizar a análise estatística dos efeitos das variáveis sobre as respostas obtidas nos experimentos foi utilizado o programa STATISTICA 9.1. Foram considerados significativos os efeitos que apresentaram o p -valor $< 0,1$.

Primeiramente foram determinados os efeitos principais das oito variáveis sobre o crescimento celular. A realização do experimento na condição central das variáveis (no ponto central) permitiu avaliar a curvatura do sistema para verificar possíveis desvios da linearidade da resposta do sistema (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 Efeitos das variáveis sobre o crescimento celular. Os fatores em negrito apresentaram significância estatística com um nível de confiança de 90% ($p < 0,1$).

	Efeito	Erro Padrão	t(14)	p-valor
Média	3,82	0,09	41,3	<0,0001
Abs Ind	1,43	0,19	7,72	<0,0001
IPTG	-0,42	0,19	-2,28	0,0387
Temp Ind	1,13	0,19	6,12	<0,0001
Ext Lev	0,86	0,19	4,63	0,0004
Triptona	0,67	0,19	3,63	0,0027
Glicose	-0,33	0,19	-1,81	0,0920
Glicerol	-0,32	0,19	-1,75	0,1011
Canamicina	0,31	0,19	1,67	0,1163
Curvatura	-0,40	0,32	-1,24	0,2356

De acordo com a análise estatística apresentada na Tabela 4.2, pode-se perceber que a absorvância na indução, concentração do indutor IPTG, temperatura de indução, concentrações de extrato de levedura, triptona e glicose, apresentaram p -valores menores que 0,1, indicando que os efeitos dessas variáveis sobre o crescimento celular são estatisticamente significativos. No caso da absorvância na indução, a temperatura de indução, as concentrações de extrato de levedura e de triptona no meio de cultivo, os valores dos efeitos são positivos, o que significa que esses fatores influenciam de forma positiva o crescimento celular quando eles passaram do nível inferior -1 ao nível superior +1 dentro da faixa escolhida de seus respectivos valores. Assim, para obter-se o máximo de crescimento celular no final do processo, precisa-se fixar essas variáveis do sistema no seu nível máximo, dentro da faixa avaliada, o que se traduz num processo que emprega um meio rico em extrato de levedura e triptona, e onde a indução deve ser realizada no momento no qual o crescimento celular atinge uma Abs de 2,0 e indução por 4h a 37 °C.

A concentração celular no momento da indução é um fator relevante e deve ser avaliado, pois o crescimento celular pode ser inibido pela carga metabólica devido à expressão heteróloga da proteína recombinante (MANDERSON *et al.*, 2006, LEE *et al.*, 2006). A indução feita no momento de inoculação do meio de

cultivo limita o crescimento celular assim como a produção da proteína recombinante, pois a expressão heteróloga de genes impõe uma pressão considerável nos sistemas metabólicos da célula e restringe assim a energia disponível para o crescimento celular (MANDERSON *et al.*, 2006). No entanto, a indução feita na fase estacionária do cultivo reduz a sua viabilidade e a taxa de crescimento, e pode conduzir à degradação da proteína de interesse. Também se sabe que a taxa de expressão de proteína recombinante é proporcional à taxa de crescimento celular no momento da indução, quando a atividade metabólica celular está completamente ativa (MANDERSON *et al.*, 2006, DONOVAN *et al.*, 1996). Em vista destas observações, a indução da expressão geralmente é feita quando o cultivo celular encontra-se na fase exponencial de crescimento, mas dependendo do produto e do sistema indutor, a expressão varia se é induzida numa concentração celular baixa ou elevada. Na maioria dos casos, o melhor é maximizar o número de células viáveis antes da adição do indutor. Neste trabalho, a indução mais adequada é quando o crescimento celular atinge a metade da fase exponencial e não no começo dela. É importante ressaltar, que como no delineamento experimental estão sendo comparados diferentes meios de cultivos, alguns mais ricos em componentes que outros, os valores de 0,8 e 2 de absorbância foram escolhidos de forma tal que em todos pode ser avaliada a indução na fase inicial e na metade da fase exponencial do crescimento celular. Para isso, foram feitas curvas de crescimento celular sem indução de meios que apresentaram maior nível de extrato de levedura e triptona, assim como também nível mínimo desses dois componentes (APÊNDICE A).

Embora os sistemas biológicos de expressão de proteína recombinante sejam muito complexos e tão diferentes entre si, eles podem ser comparados. Desta forma, as observações obtidas neste estudo foram comparadas com as obtidas em diferentes trabalhos de otimização do crescimento celular, sendo observado que elas coincidem no fato de que, para favorecer o crescimento celular num processo de expressão de proteínas recombinantes, na maioria dos casos é necessário o emprego de meios de cultivos ricos em fontes de carbono e energia, (principalmente aqueles que contêm extrato de levedura) e de nitrogênio. Desta forma, ao avaliar a composição do meio, a conclusão dos outros trabalhos induz ao emprego desses fatores em seus níveis superiores, dentro das faixas estudadas

(NIKEREL *et. al*, 2006, VOLONTÈ *et. al*, 2008). Entretanto, nem sempre o crescimento está relacionado diretamente com a obtenção do produto desejado como será discutido a seguir.

No caso da concentração do indutor e da concentração de glicose no meio de cultivo, os valores obtidos da análise são negativos, o que se pode inferir, com 90% de confiança, que as concentrações de IPTG e de glicose reduzem o crescimento celular quando esses fatores passam do nível inferior ao superior de concentração. Na literatura pode se encontrar que alguns autores já relataram o efeito tóxico do IPTG (WOOD *et al.*, 1991, OLAOFE *et al.*, 2010) mostrando que a indução da expressão de proteínas recombinantes com altas concentrações de IPTG pode diminuir drasticamente o crescimento celular (CHEN *et al.*, 1997, LÉON *et al.*, 2004). Quanto ao efeito negativo da glicose sobre o crescimento celular, pode-se explicar por causa da acidificação do meio de cultivo devido à metabolização desse componente. Hansen *et al.* (2007) avaliaram o emprego de glicerol como substituto da glicose no meio de cultivo sobre a produção, solubilização e atividade da proteína recombinante glutathione-S-transferase (GST), expressa em *Escherichia coli* BL21. Para o caso do emprego de meio com glicose, observou que o consumo deste componente apresentava uma correlação com o acúmulo de ácido acético no meio de cultivo, antes de ele ser re-metabolizado depois da depleção de glicose. No entanto, no caso de uso de meio de cultivo com glicerol, o acúmulo de ácido acético não foi detectado no sobrenadante. Uma vez que neste trabalho foi observado um comportamento similar ao de Hansen *et al.* (2007), onde o incremento de glicose no meio de cultivo é prejudicial para o crescimento celular, a análise de pH ao final de 4h de indução também foi abordado e discutido na próxima sessão.

É importante ressaltar que, quando são utilizados delineamentos incompletos, é necessária a avaliação da curvatura do sistema. Nos casos em que os pontos centrais apresentam valores superiores ou inferiores aos das outras condições dos ensaios estudados, a curvatura pode ter significância estatística e sem sua análise, o efeito de algumas variáveis pode ficar mascarado. Se a curvatura for estatisticamente significativa, o erro padrão diminui e conseqüentemente o t_{cal} aumenta com a concomitante diminuição do p -valor,

fazendo com que as variáveis estatisticamente significativas deixem de ficar “mascaradas” pelo erro padrão que estava alto devido aos dos pontos centrais (RODRIGUES e IEMMA, 2009). No caso do crescimento celular, a curvatura não mostrou ter significância estatística, o que sugere que todos os efeitos significativos observados são lineares. Isso indica que a variação da resposta é linear quando os fatores mudam de um nível para outro. Ter conhecimento desse comportamento do sistema é muito importante, pois pode se inferir que em todos os fatores com influência positiva o nível +1 deles é a melhor escolha, no entanto para os fatores que deram influência negativa, deve se escolher o nível -1.

Finalmente, no caso dos fatores concentração de glicerol e concentração de canamicina, os *p*-valores observados são maiores que 0,1, o que significa que a mudança das concentrações destes compostos, dentro da faixa estudada, não apresenta influência significativa sobre o crescimento celular. Isso permite ter a vantagem de escolher qualquer concentração delas que favoreça alguma outra resposta do sistema sem prejudicar, por isso, o crescimento celular. A escolha do uso das menores concentrações desses fatores para reduzir os custos operacionais seria um exemplo de otimizar outra resposta do sistema, custo operacional, sem afetar o crescimento celular.

Um fato importante a ser ressaltado é que em um estudo prévio desenvolvido neste laboratório para avaliar, por planejamento experimental, as condições de indução (IPTG, temperatura e tempo) da proteína PsaA expressa em *E. coli*, empregando o mesmo sistema hospedeiro que foi utilizado nesta dissertação, *E. coli* BL21 Star (DE3), o mesmo efeito negativo do IPTG sobre o crescimento celular foi verificado (LARENTIS *et al.*, 2010). Outro estudo realizado no laboratório (EINSFELDT, 2010) avaliou, por planejamento experimental, os efeitos das concentrações de IPTG e canamicina sobre a expressão heteróloga da proteína ClpP de *S. pneumoniae*, empregando *E. coli* BL21 Star (DE3). Na análise estatística deste estudo, as observações experimentais evidenciaram que as influências desses fatores sobre o crescimento celular coincidiram com as observações obtidas no presente trabalho, sendo que para a concentração de IPTG o efeito foi significativo e negativo e para a concentração de canamicina o efeito não apresentou significância estatística sobre a resposta.

4.3 - Avaliação do pH final do meio de cultivo.

Como se pode observar na análise de crescimento celular, a glicose apresentou um efeito estatisticamente significativo e negativo sobre o crescimento celular (Tabela 4.2). A possível explicação do efeito negativo que apresenta sobre o crescimento celular pode se encontrar no processo catabólico deste componente. Sabe-se que nas células de *Escherichia coli*, o excesso de metabolização da glicose pela via glicolítica gera cofatores reduzidos $\text{NADH} + \text{H}^+$. Uma vez reduzidos, não poderão permanecer neste estado, devendo ser objeto de uma "reciclagem" para poderem intervir novamente em outros processos bioquímicos que exijam a sua presença. Isto é, deverão ser oxidados. No caso da *E. coli*, ele é oxidado no processo de redução de certos compostos que geram subprodutos metabólicos ácidos, como ácidos acéticos ou ácidos lácticos, não essenciais para o organismo e, conseqüentemente, excretados para o exterior da célula. O acúmulo desses compostos no meio de cultivo provoca uma redução do pH do mesmo, inibindo assim o crescimento celular (ALBERTS *et al.*, 2002).

Existem diversas alternativas para contornar este problema de aumento da acidez do meio, sendo a mais simples o tamponamento do meio de cultivo, mediante a adição de sais em sua composição, como por exemplo, fosfatos mono e bi básicos. Uma segunda alternativa empregada freqüentemente é a substituição da glicose por outras fontes de carbono que não causem acidificação do meio de cultivo, como o glicerol discutido por Hansen *et al.* (2007), ou mesmo a redução da concentração de glicose.

Como os meios de cultivos avaliados neste planejamento experimental não tinham sais para tamponamento do meio, o pH não se manteve constante ao longo do processo. Por isso, avaliamos o pH final das dezesseis condições experimentais diferentes e da condição do ponto central estudadas para verificar se houve aumento considerável da acidez do meio (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 Respostas avaliadas mediante o planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} com oito replicas do ponto central apresentado na seção 2. As respostas avaliadas foram pH final dos meios de cultivos e concentração final de glicose no meio de cultivo (g/L).

Experimentos	Concentração inicial de Glicose (g/L)	Concentração final de Glicose (g/L)	Consumo de Glicose (%)	pH final
1	1,10	0,91	17,4	5,15
2	10,81	7,31	32,4	4,74
3	1,12	0,96	14,3	5,72
4	10,40	9,04	13,1	5,04
5	10,55	6,66	36,9	5,27
6	1,16	1,05	9,6	7,47
7	10,85	7,05	35,0	4,85
8	1,16	1,00	13,7	6,60
9	10,94	6,72	38,6	5,85
10	1,15	0,96	16,7	5,91
11	10,27	6,96	32,2	5,53
12	1,25	0,99	20,5	5,71
13	1,31	1,07	18,3	5,63
14	10,06	4,98	50,5	5,06
15	1,37	1,08	20,9	6,15
16	10,28	5,84	43,2	5,16
17	5,36	3,06	42,9	5,25
18	5,07	2,90	42,8	5,24
19	5,17	3,77	27,1	5,20
20	5,03	3,47	31,0	5,19
21	5,35	3,35	37,4	5,12
22	5,06	3,19	37,0	5,10
23	5,18	3,06	40,9	5,12
24	5,03	3,15	37,4	5,14

Com esses dados foi possível fazer a análise estatística para avaliar se os fatores têm influência nessa resposta. Dentro das faixas estudadas pôde-se perceber que o pH final no meio de cultivo é afetado pela concentração de glicose, pois apresentou um *p*-valor menor a 0,1 (Tabela 4.4). A influência da concentração de glicose sobre o pH final do processo é negativa. Como o efeito de curvatura foi significativo, a resposta não é linear. Que a resposta pH final não seja linear significa que não existe uma correlação direta entre as mudanças na concentração de glicose. Além disso, a não linearidade indica que a resposta alcança um mínimo para valores no ponto central. Uma avaliação conjunta com o crescimento celular permite determinar que a concentração de glicose mais adequada para obter uma resposta ótima de crescimento sem a queda considerável de pH é aquele valor

correspondente ao nível inferior. Esse valor de glicose favorece o crescimento celular e, em relação ao pH, evita a acidificação excessiva do meio de cultivo.

Um fato importante a ressaltar é que neste estudo tentou-se avaliar se a presença de glicerol no meio de cultivo poderia ser uma fonte alternativa de carbono das já presentes. O ingresso desse substrato à via glicolítica da célula é feito de forma diferente a da glicose, o que não gera esses co-fatores reduzidos e assim a célula não precisa da etapa de re-oxidação deles, evitando por isso a formação desses produtos metabólicos de natureza ácida. No entanto, a análise do efeito do glicerol sobre o pH do meio, como também sobre o crescimento celular (Tabela 4.2) está demonstrando que o glicerol não é utilizado pela célula de forma preferencial frente às outras fontes de carbono, pois nas duas avaliações estatísticas o fator não apresentou efeito significativo (p -valor $< 0,1$).

Tabela 4.4 Efeitos das variáveis sobre o pH final dos meios. Os fatores em negrito apresentaram significância estatística com um nível de confiança de 90% ($p < 0,1$).

	Efeito	Erro Padrão	t(14)	p-valor
Média	5,62	0,12	46,87	<0,0001
Abs Ind	0,19	0,24	0,80	0,4352
IPTG	-0,04	0,24	-0,17	0,8698
Temp Ind	0,32	0,24	1,33	0,2063
Ext Lev	0,02	0,24	0,08	0,9347
Triptona	0,41	0,24	1,72	0,1071
Glicose	-0,86	0,24	-3,57	0,0031
Glicerol	-0,09	0,24	-0,38	0,7128
Canamicina	0,05	0,24	0,22	0,8297
Curvatura	-0,89	0,41	-2,14	0,0500

Mediante os resultados obtidos, pode se concluir que para evitar uma redução do pH do meio de cultivo é necessário usar uma concentração mínima de glicose. No entanto, como a glicose é necessária para evitar a expressão da proteína antes da indução, é importante avaliar se a concentração mínima empregada é suficiente ou não para cumprir esta função. Por isso, a dosagem de glicose residual no meio de cultivo no final do processo foi feita como explicada na seção 2, e os resultados dessa análise foram apresentados na Tabela 4.3.

Observou-se que a concentração de glicose residual nunca foi nula, sugerindo que a concentração mínima empregada neste plano fatorial foi suficiente para a repressão da expressão sem ser utilizada exclusivamente como fonte de carbono pela célula. Para corroborar as observações previamente obtidas, foi feita uma análise da expressão de rPly em SDS-PAGE de duas amostras de experimentos com baixa concentração de glicose (experimentos 10 e 12), e mais duas amostras de experimentos com alta concentração de glicose (experimentos 9 e 11), nas condições não induzida e após de 4h de indução (Figura 4.1). Em todos eles, a expressão de rPly na condição de não indução foi nula, confirmada pela ausência de atividade hemolítica. Diferenças de expressão não são observadas entre os experimentos com nível inferior e superior de glicose nas amostras induzidas. No caso das amostras após 4h de indução, os níveis de expressão de rPly são diferentes entre elas, por causa das diferentes condições de expressão, e consideravelmente superiores se comparados com as condições não induzidas.

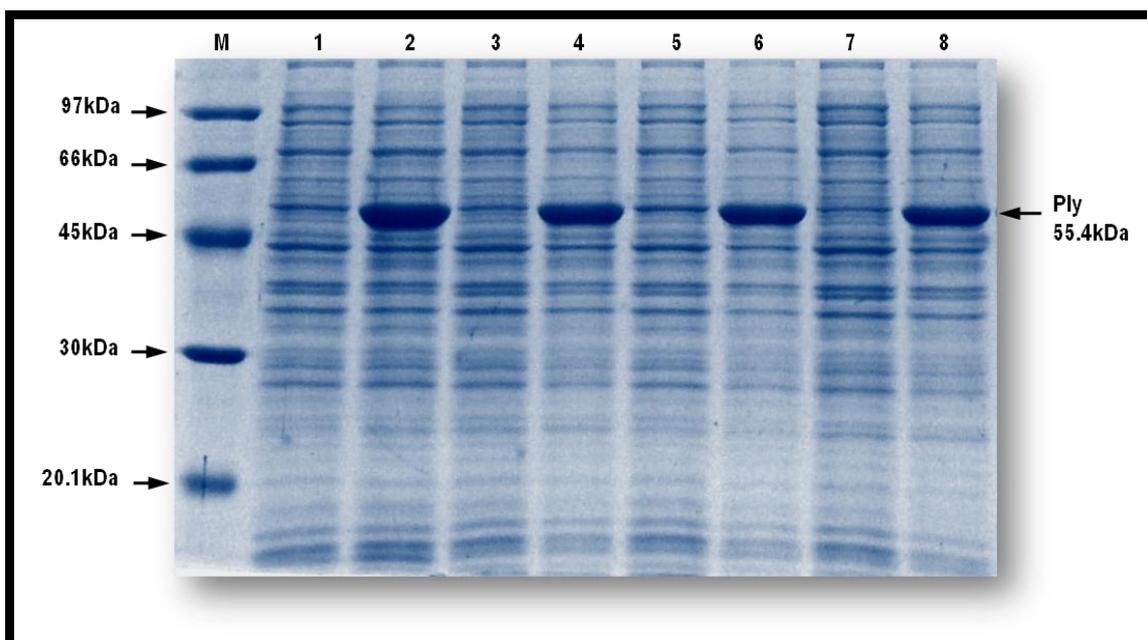


Figura 4.1 Gel de SDS-PAGE 12,5% dos extratos protéicos totais obtidos do processo total da expressão da proteína Ply por *E. coli* BL21 Star (DE3). **M**, padrão de massa molecular; **1, 3, 5, e 7**, amostras do extrato total não induzido, dos experimentos 9, 10, 11, e 12 respectivamente; **2, 4, 6, e 8**, amostras do extrato total no final do processo dos experimentos 9, 10, 11, e 12, respectivamente. Os experimentos 9 e 11 são com nível +1 de concentração de glicose; os experimentos 10 e 12 são com nível -1 de concentração de glicose. As amostras foram normalizadas por Abs_{600nm}.

4.4 - Avaliação da atividade biológica.

Dado que a expressão de proteínas heterólogas em *Escherichia coli* ocorre majoritariamente no citoplasma, e em poucos casos no espaço periplasmático, e com a finalidade de expressá-las em altos níveis, sabe-se que quanto maior for a produção de biomassa final, maior será a expressão da proteína heteróloga e assim maior será a produtividade (KHAN *et al.*, 2010). No entanto, em processos de expressão em alta densidade celular, a proteína recombinante pode ser sintetizada na forma insolúvel e inativa, formando corpos de inclusão. Para expressar proteínas recombinantes com atividade biológica, como as enzimas, quando é necessário que sejam expressas de forma biologicamente ativa, é preciso evitar a formação desses corpos de inclusão. Exemplo de estudos sobre processos onde se expressa a proteína de forma solúvel, corretamente enovelada e biologicamente ativa, são os trabalhos de NIKEREL *et al.* (2006), e VOLONTÈ *et al.* (2008). Nesses trabalhos, planejamento experimental é empregado para otimizar as condições de produção de proteínas recombinantes que sejam biologicamente ativas.

Como foi comentado previamente, nem toda a fração de uma proteína expressa no citoplasma é feita de forma corretamente enovelada e solúvel e, portanto biologicamente ativa, pois parte dessa fração correspondente à proteína enovelada de forma incorreta é insolúvel e inativa (WINKELMANN *et al.*, 2010). Isso se traduz em um maior custo operacional para sua recuperação quando é necessário que a proteína esteja na forma solúvel (KHAN *et al.*, 2010). Assim, o que poderia ser uma estratégia aparentemente simples na etapa de expressão da proteína recombinante em corpos de inclusão, pode complicar a etapa de purificação, aumentando o custo do processo (CHUAN *et al.*, 2008). Do ponto de vista operacional, a importância de uma correta expressão da proteína heteróloga evita as etapas de solubilização, oxidação, e enovelamento, pois a produção da proteína corretamente enovelada permite passar diretamente à etapa de purificação (SHIN *et al.*, 1997).

No caso desta dissertação, o objetivo foi desenvolver um processo onde a proteína seja expressa de forma solúvel e biologicamente ativa. Pelo previamente discutido, avaliaram-se através das análises estatísticas os efeitos de oito fatores

sobre a atividade biológica da proteína obtida. A análise da atividade hemolítica foi feita para avaliar unicamente a fração protéica corretamente enovelada e, portanto expressa de forma solúvel, pois a atividade protéica demanda o enovelamento exato da proteína na sua estrutura tridimensional (SØRENSEN e MORTENSEN, 2005). Os resultados, observados na Tabela 4.5, indicam que nas faixas testadas, a absorvância na indução, a temperatura de indução, e as concentrações de triptona e glicose no meio, além da concentração de canamicina, apresentam influências significativas na expressão solúvel da proteína, já que os *p*-valores em todos os casos foram menores que 0,1.

Tabela 4.5 Efeitos das variáveis sobre a atividade hemolítica. Os fatores em negrito apresentaram significância estatística com um nível de confiança de 90% (*p* < 0,1).

	Efeito	Erro Padrão	t(14)	p-valor
Média	985,4	41,6	23,7	<0,0001
Abs Ind	323,5	83,2	3,9	0,0017
IPTG	- 52,0	83,2	- 0,6	0,5422
Temp Ind	-340,8	83,2	- 4,1	0,0011
Ext Lev	77,0	83,2	0,9	0,3706
Triptona	268,2	83,2	3,2	0,0061
Glicose	164,3	83,2	2,0	0,0685
Glicerol	44,8	83,2	0,5	0,5993
Canamicina	256,0	83,2	3,1	0,0082
Curvatura	950,7	144,2	6,6	<0,0001

No caso da absorvância na indução, o efeito observado é positivo, indicando que é mais adequado fazer a indução da expressão numa alta concentração celular para obter maior expressão da proteína solúvel. No caso da temperatura de indução, o efeito observado é negativo, coincidindo com o observado em outros trabalhos da literatura, devido à formação de corpos de inclusão na temperatura de 37 °C (CHEN *et al.*, 2001; VOLONTÈ *et al.*, 2008). Em relação à concentração de triptona e de glicose, ambos os efeitos foram positivos, o que indica que a presença da triptona é importante para a síntese protéica solúvel, da mesma maneira que acontece com a presença da glicose no meio de cultivo. Em relação à canamicina, o efeito possivelmente está relacionado à segregação plasmidial. Mediante esta análise é possível indicar que nas condições estudadas, os outros três fatores

avaliados, concentração de IPTG, extrato de levedura, e glicerol, não apresentaram influência estatística significativa, pois os *p*-valores observados em todos esses casos foram sempre maiores que 0,1. Isso é muito vantajoso, pois permite a escolha dos níveis dessas variáveis para obter uma condição operacional mais proveitosa do ponto de vista econômico e operacional, sem afetar o nível de expressão solúvel da proteína. Assim, a concentração do indutor pode ser diminuída em até 10 vezes (vantajoso também pelo efeito negativo sobre o crescimento celular), a concentração do extrato de levedura pode ser reduzida em aproximadamente 5 vezes, e no caso do glicerol pode-se retirar completamente do sistema sem prejudicar significativamente a expressão de proteína solúvel. Também foi verificada a não influência do IPTG (na faixa de 0,1mM a 1mM) sobre a expressão de outros alvos de *S. pneumoniae* estudados no laboratório (PsaA e ClpP protease) no mesmo hospedeiro recombinante, permitindo sua redução em 10 vezes, como no trabalho desta dissertação (EINSFELDT, 2010, LARENTIS *et al.*, 2010).

No caso do trabalho de Hansen *et al.* (2007), o efeito de glicerol foi diferente do observado para Ply. Os autores avaliaram o emprego de glicerol como substituto da glicose no meio de cultivo sobre a produção, solubilização e atividade da proteína recombinante glutathione-S-transferase (GST), expressa em *Escherichia coli* BL21. Embora as frações solúveis de GST tenham sido similares para ambas as fontes de carbono, no caso do meio com glicose, só 32±9% da GST foi ativa, enquanto no caso do meio com glicerol, 76±13% da GST foi ativa. Assim, os autores discutem que o glicerol tem um efeito estabilizante nas proteínas *in vitro* (SAWANO *et al.*, 1992) e foi descrito como chaperonas químicas (YANG *et al.*, 1999). O efeito pode ser explicado pela reconversão da fração não ativa de GST em fração ativa. Assim, os autores demonstraram que os efeitos positivos de osmólitos usados, como o glicerol, em meios de crescimento para *E. coli*, podem ser especialmente benéficos quando as proteínas recombinantes são expressas em altos níveis, atingem altas concentrações intracelulares e causam acúmulo no citoplasma. Novamente, pode-se intuir que fatores que são importantes em determinados sistemas de expressão, não o são em outros.

Comparando-se os efeitos significativos obtidos para o crescimento celular (Tabela 4.2) e para a atividade biológica (Tabela 4.3), nesta última análise o IPTG e o extrato de levedura não foram significativos, mas foram na avaliação do crescimento celular. No caso do glicerol, este componente também não foi significativo nem no crescimento celular nem na atividade. No caso da canamicina, foi significativa na análise da atividade biológica, enquanto na análise do crescimento celular não foi. Também pode-se observar por esta análise que existe pelo menos um fator que apresenta efeito não linear, pois a curvatura foi estatisticamente significativa. Como todas as variáveis significativas observadas na avaliação da atividade hemolítica, exceto a canamicina, tinham demonstrado ter efeito linear na análise do crescimento celular, poderia se concluir, de forma precipitada, que esta nova variável significativa seja a que apresenta o efeito não linear. Isso é incorreto, pois os efeitos que as variáveis apresentam sobre uma resposta não são os mesmos efeitos que podem apresentar sobre outra resposta diferente. Por outro lado, como o efeito de curvatura foi significativo, temos que dentro da faixa testada, entre os níveis -1 e +1, existe um nível intermédio de algum/alguns fator(es) que produz(em) um máximo ou um mínimo da resposta avaliada, dependendo do valor positivo ou negativo do efeito da curvatura. Como o efeito observado da curvatura foi positivo, o efeito produz um máximo na resposta do sistema, o que é desejado no caso da produção da proteína ativa, indicando que a melhor escolha do nível desse fator será um dos níveis da faixa onde a resposta do sistema é máxima. Nos casos em que a redução de um componente, por exemplo, levar à redução de custos do sistema, mantendo a resposta em nível máximo, pode ser empregado o nível correspondente ao ponto central.

Para finalizar a análise da influência dos fatores sobre a atividade hemolítica, o fator que maior influência demonstrou, por ter apresentado o menor *p*-valor é a temperatura de indução. O efeito negativo que apresenta essa variável sobre a expressão da proteína recombinante biologicamente ativa já foi mencionado em alguns trabalhos da literatura.

O estudo de VOLONTÈ *et al.* (2008) demonstrou que a redução na taxa de crescimento e na temperatura de indução durante a síntese protéica favorece a produção da proteína ácido glutaril-7-aminocefalosporânico acilase na forma ativa.

Assim é que a redução da temperatura, depois da indução com IPTG, de 37 °C a 25 °C, resultou em um incremento da quantidade de proteína solúvel ativa, uma vez que essas condições favorecem um processo mais eficiente de enovelamento da proteína recombinante. Os autores também advertem que não seria muito adequada uma maior redução da temperatura, porque pode prejudicar a produção de biomassa, além de evitar a adição de uma etapa de resfriamento, pois acaba sendo um aumento considerável dos custos de produção numa escala industrial.

Em outro trabalho realizado por URBAN *et al.* (2003), estudaram-se os parâmetros relativos à composição do meio de cultivo (meio rico e meio mínimo), e às condições de expressão da proteína Yol066 de *Saccharomyces cerevisiae* em *E. coli* (concentração do indutor IPTG, a temperatura após indução, e tempo de expressão). Neste trabalho os autores mostraram a importância que tem a composição do meio e a temperatura após a indução, pois eles estão relacionados com a modulação da atividade das chaperonas ou de algumas outras proteínas acessórias envolvidas no enovelamento protéico. Em relação à condição ótima de expressão da proteína solúvel, a temperatura de indução mais adequada foi a 18 °C, enquanto que um aumento desta para 37 °C reduziu consideravelmente a produtividade da proteína solúvel. Além disso, os autores mostraram que a concentração de IPTG, dentro da faixa avaliada (50 µM – 1000 µM) foi significativa sobre a expressão solúvel da proteína, sendo esse efeito negativo. Pode se perceber que, tanto a composição do meio de cultivo como a temperatura de indução da proteína recombinante e a concentração do indutor, foram fatores chaves para uma expressão da proteína de forma solúvel e biologicamente ativa.

SWALLEY *et al.* (2006), no seu trabalho de pesquisa sobre a influência das variáveis temperatura após a indução, tempo de indução e concentração do indutor sobre a expressão solúvel da proteína NS3 de três diferentes vírus de hepatite C em *E. coli*, demonstrou que os fatores identificados como significativos para a expressão solúvel da proteína foram: temperatura de indução (sendo seu efeito negativo) e tempo de indução, enquanto que a concentração do indutor IPTG não foi significativa na faixa examinada (0,1 e 1 mM), diferenciando-se do trabalho de URBAN (2003). Pode-se perceber que obter um processo biológico otimizado para a expressão correta de uma proteína heteróloga, seja de vírus, de bactéria ou de

levedura, não é uma tarefa simples, pois depende de múltiplos fatores, e por causa disso que não existe um único processo de expressão. Nestes casos, onde cada sistema é diferente e muitas são as variáveis envolvidas, a ferramenta de planejamento experimental é a forma ideal de avaliar os diversos fatores e otimizar os processos de expressão.

Com a finalidade de avaliar qualitativamente como o aumento da temperatura de indução teve influência significativa no nível da proteína expressa na fração solúvel, realizou-se uma análise da expressão da proteína mediante SDS-PAGE (Figura 4.2). Nele comparou-se a expressão da pneumolisina no extrato total, na fração solúvel e na fração insolúvel, de três condições experimentais feitas em três temperaturas de expressão diferentes, 25 °C, 31 °C, e 37 °C.

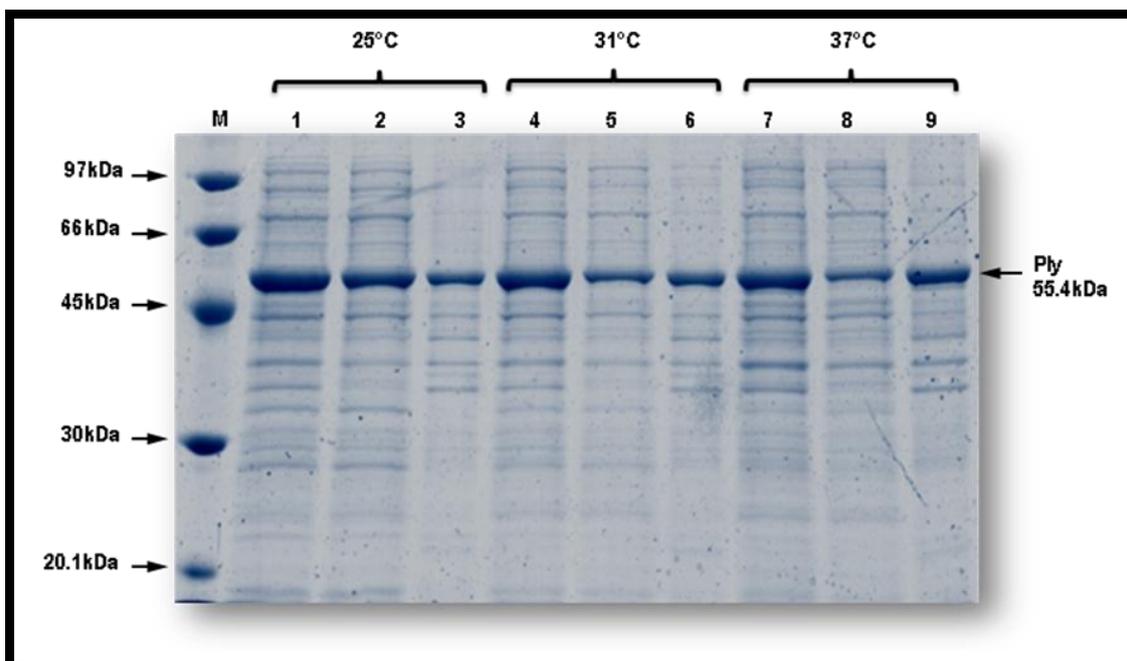


Figura 4.2 Gel de SDS-PAGE 12,5% dos extratos protéicos totais e de suas frações, solúvel e insolúvel, obtidos através da expressão da proteína Ply por *E. coli* BL21 Star (DE3) a 25 °C, 31 °C, e 37 °C. **M**, padrão de massa molecular; **1, 2 e 3**, amostras do extrato total, fração solúvel, e fração insolúvel da expressão da Ply a 25 °C, respectivamente; **4, 5 e 6**, amostras do extrato total, fração solúvel, e fração insolúvel da expressão da Ply a 31 °C, respectivamente; **7, 8 e 9**, amostras do extrato total, fração solúvel, e fração insolúvel da expressão da Ply a 37 °C, respectivamente. As amostras a 25 °C, 31 °C, e 37 °C, correspondem respectivamente aos experimentos 9, 17, e 8 do planejamento fatorial fracionado usado. As amostras aplicadas no gel foram normalizadas por Abs_{600nm}.

O nível de expressão da Ply em cada fração do gel foi obtido através de densitometria de bandas. Observando o gel na Figura 4.2 e os dados de densitometria (Tabela 4.6), é possível verificar que a proteína Ply, embora seja expressa em níveis similares em todos os extratos totais (1, 4, e 7), não acontece o mesmo nas frações solúveis e insolúveis. Como já discutido previamente, o nível de expressão da Ply nas frações solúveis (2, 5, e 8) é favorecido a temperaturas menores (61%, 41%, e 35% respectivamente), enquanto que o nível de Ply expressa na fração insolúvel (3, 6, e 9) aumenta em temperaturas maiores (39%, 59%, e 65% respectivamente).

Tabela 4.6 Níveis de expressão da pneumolisina em três condições diferentes de temperatura pós-indução (25°C, 31°C, e 37°C) nos extratos solúveis e insolúveis com seus valores obtidos na densitometria de banda e os respectivos percentuais em relação ao extrato total.

Temperatura	Extrato Solúvel	Extrato Insolúvel
25°C	61%	39%
31°C	41%	59%
37°C	35%	65%

Em relação à influência positiva da canamicina, possivelmente a menor concentração não está sendo suficiente para evitar que ocorra segregação plasmidial. Foi verificado em outros trabalhos do grupo com o mesmo plasmídeo pET28a (EINSFELDT, 2010), que mesmo com 50µg/mL de canamicina no meio de cultura ocorre segregação plasmidial, mas sem afetar a expressão da proteína ClpP protease (não foi verificada diferença na expressão entre esta concentração e experimentos sem antibiótico, no caso desta proteína). No caso da Ply, possivelmente com 10µg/mL estaria ocorrendo um nível de segregação plasmidial que estaria afetando a expressão da proteína. Para comprovar a segregação plasmidial do sistema, testes de crescimento de *E.coli* BL21 (DE3) Star / pET28a / *ply* em LB com antibiótico comparando com placas LB sem antibiótico devem ser realizados, conforme metodologia estabelecida no LATER (EINSFELDT, 2010).

4.5 - Avaliação da produtividade.

Avaliando os fatores que apresentaram influência no crescimento celular e comparando estes com os fatores que apresentaram influência na expressão da proteína de forma solúvel, pode-se concluir que as variáveis estatisticamente significativas para as duas respostas não coincidiram, o que significa que não existe correlação entre o crescimento celular e a expressão solúvel da pneumolisina. Desta maneira, para definir a composição do meio e as condições de indução, a análise foi focada na expressão da proteína, mas não deixando de considerar a análise do crescimento celular. Contudo, a avaliação da atividade hemolítica foi feita sem considerar que os tempos dos diferentes experimentos do plano fatorial foram muito diferentes entre si, pois foram empregadas diferentes absorbâncias na indução da proteína recombinante (com tempos diferentes para atingir a fase de crescimento de interesse). Isto é um problema, já que poderíamos estar comparando um processo com alto nível de atividade biológica, mas que precisou de um tempo de processo maior, com outro processo com um nível de atividade um pouco menor que o anterior, mas que precisou de um tempo de processo menor. Por isso, para incluir o tempo de processo global dentro da análise, foi feito o estudo estatístico dos efeitos das variáveis independentes sobre a atividade hemolítica relativa ao tempo total do processo (produtividade). Da mesma forma que para o crescimento celular e para a atividade biológica da pneumolisina, a avaliação dos efeitos sobre esta resposta foi feita considerado significativo aos efeitos com $p < 0,1$, ou seja, com grau de confiança de 90%.

Na Tabela 4.7 são mostrados os resultados da avaliação estatística da produtividade do sistema. Através desta análise é possível concluir que a temperatura de indução continuou sendo um fator estatisticamente significativo, o mais importante, pois apresentou o menor p-valor dentre todas as variáveis do sistema avaliadas. O efeito desta variável é negativo, indicando que a maior produtividade foi obtida no nível inferior da faixa avaliada desse fator. As concentrações de triptona e canamicina no meio de cultivo também foram significativas estatisticamente, mas ao contrário do efeito da temperatura de indução, os efeitos observados foram positivos. No entanto, as demais variáveis avaliadas do sistema (absorbância na indução, concentração do indutor,

concentrações de extrato de levedura, glicose e glicerol no meio de cultivo) não apresentaram efeitos significativos sobre a resposta, dentro das faixas estudadas. Isso significa que é possível escolher os níveis dessas variáveis do sistema que permitam reduzir o custo operacional, sem prejudicar por isso a produtividade do sistema.

Tabela 4.7 Efeitos das variáveis sobre a produtividade. Em negrito estão indicados os fatores que apresentaram significância estatística com um nível de confiança de 90% ($p < 0,1$).

	Efeito	Erro Padrão	t(14)	p-valor
Média	2,57	0,13	19,45	<0,0001
Abs Ind	0,33	0,26	1,27	0,2248
IPTG	-0,20	0,26	-0,74	0,4720
Temp Ind	-0,91	0,26	-3,43	0,0041
Ext Lev	0,23	0,26	0,88	0,3930
Triptona	0,79	0,26	3,00	0,0095
Glicose	0,37	0,26	1,41	0,1797
Glicerol	0,10	0,26	0,36	0,7241
Canamicina	0,72	0,26	2,74	0,0160
Curvatura	2,86	0,46	6,25	<0,0001

Da mesma forma que aconteceu com a análise da atividade biológica da proteína, pode-se observar nesta análise que a canamicina teve efeito positivo significativo sobre a produtividade do sistema. Além disso, existe efeito não linear de pelo menos um fator significativo. Novamente, a curvatura do sistema é positiva, indicando que a resposta não linear observada apresenta um máximo dentro da faixa estudada.

Através das análises do planejamento fatorial foi possível inferir a condição mais adequada, dentro dos limites estudados, que permita maximizar a produtividade do sistema. A condição definida com base nos resultados do planejamento, e comparada com as condições normalmente encontradas na literatura, consiste em um processo que utiliza um meio de cultivo constituído com 5g/L de extrato de levedura (nível -1), 5g/L de triptona (nível 0), 10g/L de NaCl (variável não estudada), 1g/L de glicose (nível -1) e com adição de 30ug/mL de

canamicina (nível 0) e sem adição de glicerol (nível -1). O processo de expressão pode ser realizado mediante indução em absorbância 0,8 (nível -1) com 0,1mM de IPTG (nível -1) e deixando induzir por 4h a 25 °C (nível -1). Utilizando esta condição é possível reduzir 10 vezes a concentração de indutor, cerca de 5 vezes a concentração de extrato de levedura no meio. No caso da triptona e canamicina foi possível reduzi-las aproximadamente à metade, e no caso do glicerol conseguiu-se retirar completamente do sistema; considerando a comparação em relação aos valores superiores dessas variáveis que são empregados em vários trabalhos da literatura.

A escolha do valor das concentrações de triptona e de canamicina foi devido a seus efeitos serem estatisticamente significativos, e positivos, na análise da produtividade, indicando que uma concentração maior desses fatores favorece o aumento da produtividade. Além disso, os experimentos nos quais essas concentrações foram empregadas no seu valor intermediário (pontos centrais), os níveis de produtividade obtidos foram os maiores. E como a curvatura foi significativa e positiva na análise da produtividade, então as concentrações dos fatores estatisticamente significativos levam a uma maior resposta quando eles estão no nível intermediário, dentro da faixa avaliada. No caso da temperatura de indução, sua redução implica um menor dispêndio de energia, enquanto a indução em absorbância de 0,8 se traduz numa redução de tempo do processo. Um fato importante a ser ressaltado é que a produtividade da pneumolisina de forma solúvel continuou-se mantendo em altos níveis.

4.6 - Validação da condição definida pelo planejamento de experimentos - Estudo da cinética de produção da proteína.

Para validar a condição otimizada pelo planejamento fatorial fracionado foram realizadas 3 réplicas de cultivos nesta condição (K1, K2, e K3). Os cultivos foram realizados até atingirem a fase exponencial de crescimento (Abs_{600nm} aproximadamente 0,8) e então induzidos com 0,1mM de IPTG. A partir deste ponto foram retiradas amostras de hora em hora para as análises, até o término das 4 horas de indução. Os experimentos K1, K2, K3 foram analisados quanto ao

crescimento celular e quanto à produção de proteína recombinante ao longo do tempo. Os resultados dos crescimentos celulares das réplicas são mostrados na Tabela 4.8. O crescimento celular médio obtido nestas réplicas foi 2,93 ao final das 4 horas de indução, com desvio padrão relativo de 5,7%.

Tabela 4.8 Crescimento celular dos experimentos de validação do planejamento fatorial.

Tempo de cultivo (minutos)	Tempo de indução (horas)	Exp. K1 Crescimento celular (Abs)	Exp. K2 Crescimento celular (Abs)	Exp. K3 Crescimento celular (Abs)
0	-	0,202	0,215	0,202
70	0	0,832	0,827	0,807
130	1	1,568	1,598	1,628
190	2	2,350	2,415	2,480
250	3	2,660	2,645	2,630
310	4	2,750	3,080	2,970

As concentrações de proteína Ply produzidas ao longo dos cultivos, nas três réplicas do ponto de validação do planejamento, são mostradas na Tabela 4.9.

Tabela 4.9 Concentração de Ply recombinante produzida ao longo das 4 horas de expressão nos experimentos da validação.

Tempo de indução (horas)	Exp. K1 Atividade Ply (UH/mL)	Exp. K2 Atividade Ply (UH/mL)	Exp. K3 Atividade Ply (UH/mL)
0*	0	0	0
1	383	N/D	419
2	676	N/D	636
3	929	N/D	805
4	1406	1461	1316

* Instante em que ocorre a adição do indutor N/D: Não Determinado

A média de atividade da proteína expressa na condição de validação a 25°C foi de 1394 ± 73 UH/mL, com valores estatisticamente similares aos valores máximos obtidos nos experimentos 3, 4, 9, 10 (todos expressos em 25°C), 16 (expresso em 37°C) e pontos centrais (expressos em 31°C) do planejamento

experimental. A principal vantagem da condição de validação sobre as demais condições de processo testadas no planejamento experimental é que na validação foi obtido o mesmo nível de atividade da proteína Ply, mas em condições onde se têm redução de custos devido à composição do meio de cultivo mais simples e também redução de tempo total do processo.

Na Figura 4.3 é apresentado o gráfico de crescimento celular (Abs) e da atividade hemolítica (UH/mL) em função do tempo de cultivo dos experimentos do ponto validado a 25°C. É importante ressaltar que não foi verificada atividade hemolítica empregando a cepa *E. coli* BL21 Star (DE3) / pET28a como controle negativo na mesma condição de crescimento celular e submetida aos mesmos procedimentos de indução/expressão que *E. coli* BL21 Star (DE3) / pET28a / *ply*, confirmando a atividade hemolítica da proteína recombinante pneumolisina.

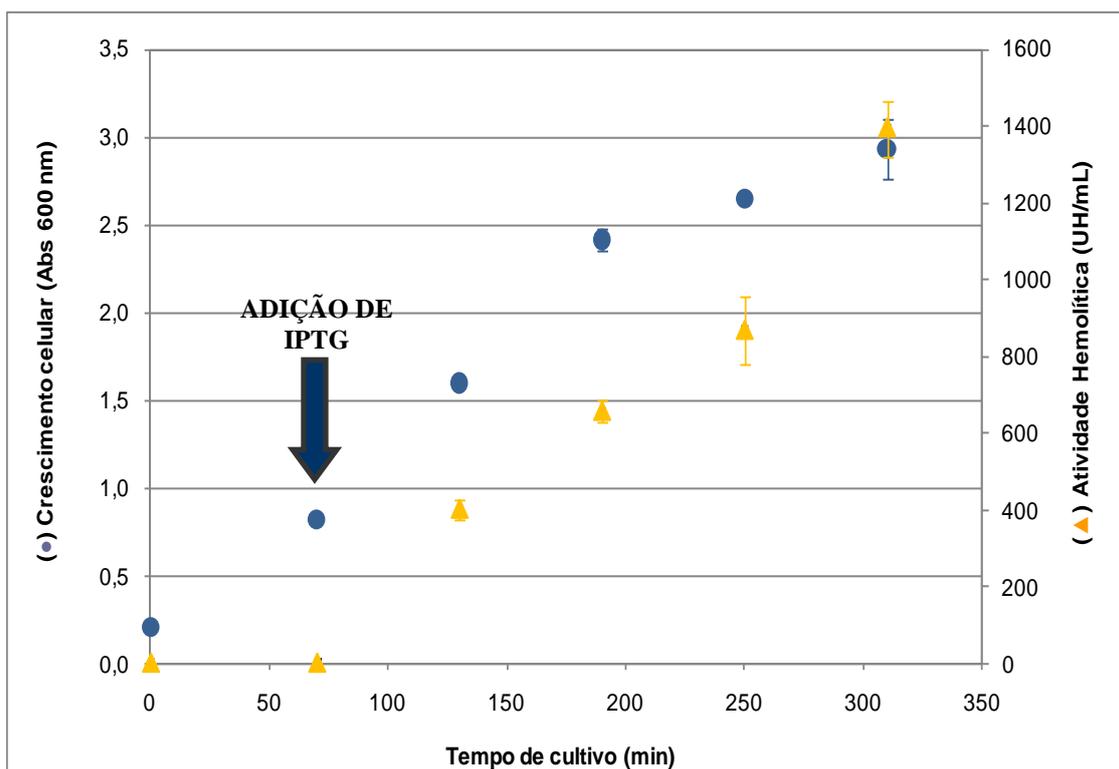


Figura 4.3 Cinética do crescimento celular e da expressão da pneumolisina biologicamente ativa na condição definida a 25°C.

Avaliando o crescimento celular, pode-se perceber que após 2 horas de indução (190 minutos de cultivo) as células começam a chegar à fase estacionária de crescimento, enquanto a atividade aumenta. Conforme discussão anterior, a

expressão de rPly não está diretamente associada ao crescimento, pois ocorre um aumento no rendimento ao atingir a fase estacionária do processo. Para uma melhor avaliação do processo, foi feita a razão entre a concentração de proteína e o crescimento celular para calcular o rendimento por célula (UH/mL/Abs) ao longo do tempo de indução. O resultado é apresentado na Tabela 4.10. Baseado na observação dessa tabela pode-se perceber que o rendimento por célula apresentou um aumento ao longo do tempo de indução da proteína. Conforme mostrado no gráfico da Figura 4.3, esse comportamento está relacionado com a maior taxa de expressão de proteína recombinante em relação à taxa de crescimento celular, o que faz com que, à medida que o tempo de indução avança, essa razão seja maior, no tempo de processo estudado.

Tabela 4.10 Rendimento por célula (UH/mL/Abs) ao longo do tempo de indução a 25 °C.

Tempo de indução (horas)	Média da atividade de Ply (UH/mL)	Média do crescimento celular (Abs)	Rendimento por célula (UH/mL/Abs)
0*	0	0,822	0
1	401	1,598	251
2	656	2,415	272
3	867	2,645	328
4	1394	2,933	476

* Instante em que ocorre a adição do indutor

A velocidade específica de crescimento obtida para o processo de expressão na condição da validação foi de $0,56h^{-1}$ e o correspondente tempo de geração de 1,23h (APÊNDICE B). EINSFELDT (2010), no seu trabalho de expressão da proteína heteróloga ClpP na mesma cepa de *E. coli* cultivada num meio de cultivo semelhante ao usado nesta dissertação, obteve uma velocidade específica de crescimento de $0,72h^{-1}$ e um tempo de geração de 0,96h. Possíveis diferenças nas taxas de crescimento devem estar relacionadas aos diferentes genes expressos, uma vez que é discutido na literatura que o comportamento da célula, ao responder à expressão, depende da interação hospedeiro/vetor e das propriedades da proteína expressa (SHIN *et al.*, 1997, CHUAN *et al.*, 2008).

Quando avaliado o crescimento celular da cepa de *E. coli* BL21 (DE3) Star recombinante sem indução da expressão da Ply, a 37°C (APÊNDICE A e C), as taxas

de crescimento específicas foram de $0,92h^{-1}$ no meio TB com triptona, e $0,99h^{-1}$ e $0,63h^{-1}$ nos meios LB com triptona e sem triptona respectivamente. Estas taxas de crescimento específicas são maiores em relação ao valor obtido quando é induzida a expressão da proteína rPly no meio validado (a taxa de crescimento cai para $0,56h^{-1}$). Esta redução deve-se ao emprego de menor temperatura após a indução ($25^{\circ}C$), de diferentes meios de cultura, mas além disso, o processo de expressão da proteína recombinante pode interferir no processo de crescimento celular, pois quando são utilizados sistemas com promotores fortes, como é o caso do promotor T7, ao induzir o sistema, a taxa de crescimento diminui devido à sobrecarga do metabolismo da célula hospedeira (TOKSOY *et al.*, 2002), como também à possível toxicidade da proteína.

A produtividade média obtida no processo definido e validado a $25^{\circ}C$ foi $4,50$ UH/mL/min, apresentando um desvio padrão de $0,24$ e desvio padrão relativo de $5,3\%$. Se comparar este valor com os valores de produtividade dos diferentes processos avaliados pelo planejamento experimental, vemos que estatisticamente foi equivalente à produtividade obtida no experimento 9 ($4,19$ UH/mL/min), assim como também nos experimentos do ponto central ($3,99 \pm 0,50$ UH/mL/min). Em ambos os casos, esse valores correspondem aos maiores valores de produtividade obtidos no planejamento experimental avaliado. Isso é muito importante, pois está demonstrando que embora tenha-se conseguido poupar na composição do meio como também no tempo e custo operacional do processo, ele consegue apresentar níveis de produtividade elevados.

4.7 - Comparação da condição definida a $25^{\circ}C$ e a $30^{\circ}C$.

Dado que na análise da atividade hemolítica e da produtividade, os experimentos dos pontos centrais apresentaram valores máximos, e como a temperatura de indução da pneumolisina foi o fator que apresentou maior influência na expressão da proteína de forma solúvel, optou-se por realizar a condição de validação do planejamento fatorial a $30^{\circ}C$ para comparação com a validação em $25^{\circ}C$. A temperatura de validação a $30^{\circ}C$ foi definida por ser próxima do ponto central ($31^{\circ}C$).

Os resultados dos crescimentos celulares das réplicas são apresentados na Tabela 4.11. O crescimento celular médio obtido nestas réplicas foi 3,45 ao final das 4h de indução, com desvio padrão relativo de 1,1%. Na condição a 30°C, o crescimento obtido foi maior que em 25°C, coincidindo com o observado na análise estatística, pois quanto maior é a temperatura de indução, maior é o crescimento celular.

Tabela 4.11 Crescimento celular dos experimentos do processo definido a 30°C.

Tempo de cultivo (minutos)	Tempo de indução (horas)	Exp. K1 Crescimento celular (Abs)	Exp. K2 Crescimento celular (Abs)	Exp. K3 Crescimento celular (Abs)
0	-	0,143	0,141	0,140
100	0	0,813	0,806	0,804
160	1	1,675	1,638	1,673
220	2	2,330	2,280	2,520
280	3	2,650	2,760	3,140
340	4	3,490	3,530	3,450

Em relação à velocidade específica de crescimento, para o processo de expressão a 30°C foi obtida taxa de $0,58h^{-1}$ (enquanto que a 25°C foi de $0,56h^{-1}$) e o correspondente tempo de geração de 1,20h (enquanto que a 25°C foi de 1,23h) (APÊNDICE B). Pode-se perceber que ambas as velocidades específicas de crescimento na indução são muito próximas.

As concentrações de proteína Ply produzida ao longo do cultivo, nas três réplicas do ponto validado a 30°C, são mostradas na Tabela 4.12. A média de atividade da proteína expressa no processo a 30°C foi aproximadamente 1266 ± 99 UH/mL, sendo este valor estatisticamente similar ao obtido no experimento do processo definido a 25°C (1394 ± 147 UH/mL). Ele também é estatisticamente equivalente ao valor das atividades das amostras dos pontos centrais do delineamento experimental realizado.

Tabela 4.12 Concentração de Ply recombinante produzida ao longo das 4 horas de expressão nos experimentos a 30°C.

Tempo de indução (horas)	Exp. K1 Atividade Ply (UH/mL)	Exp. K2 Atividade Ply (UH/mL)	Exp. K3 Atividade Ply (UH/mL)
0*	0	0	0
1	351	383	383
2	609	553	573
3	769	745	769
4	1289	1158	1352

* Instante em que ocorre a adição do indutor

Na Figura 4.4 é apresentado o gráfico de crescimento celular (Abs) e da atividade hemolítica (UH/mL) em função do tempo de cultivo dos experimentos do ponto validado a 30°C.

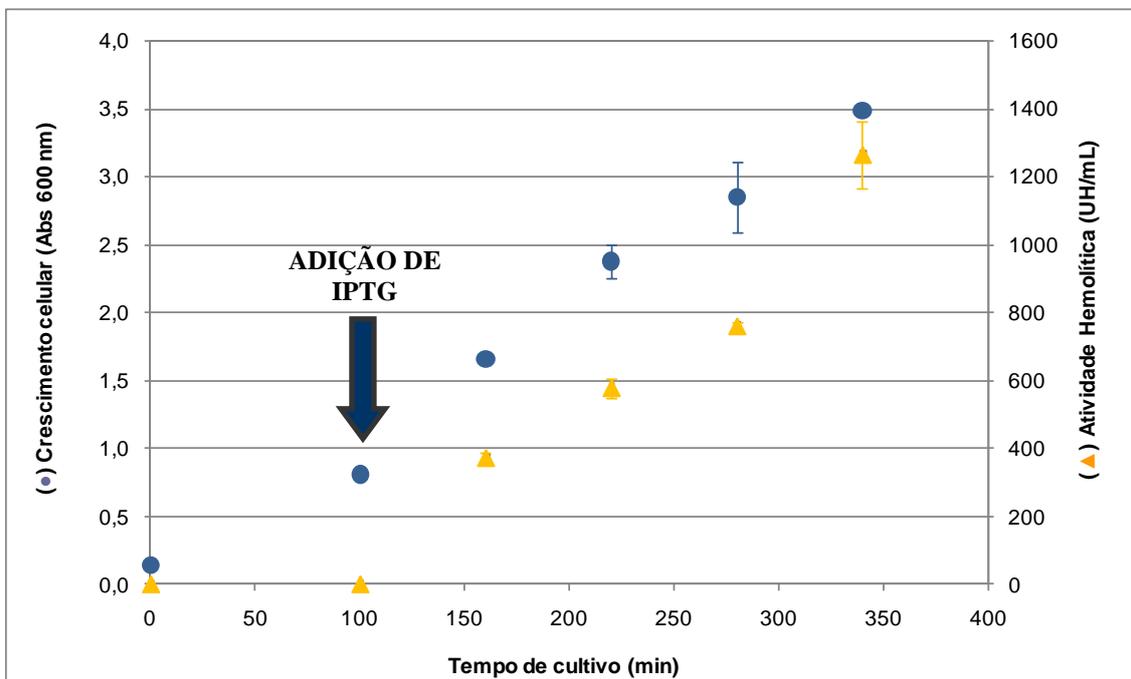


Figura 4.4 Cinética do crescimento celular e da expressão da pneumolisina biologicamente ativa na condição definida a 30°C.

Em relação à produtividade obtida por este processo a 30°C após das 4h de expressão foi de 3,72 UH/mL/min, apresentando um desvio padrão de 0,29 e desvio padrão relativo de 7,8%. Se comparar com a produtividade obtida pelo processo definido a 25°C, que foi 4,50 UH/mL/min (desvio padrão de 0,24), eles são estatisticamente diferentes. A diferença se deve a que, no processo a 30°C, foram necessários cerca de 100min para atingir o nível de crescimento celular para realizar a indução; entretanto, a 25°C, esse tempo foi menor (70min). Assim, embora os níveis de atividade hemolítica da fração solúvel tenham sido similares, os tempos dos processos foram diferentes.

Essa diferença entre os dois processos validados pode se perceber também ao avaliar o rendimento por célula (UH/mL/Abs) ao longo do tempo de indução (Tabela 4.13). Comparando-se ambos os processos, o rendimento por célula obtido a 25°C (476 ± 34 UH/mL/Abs) foi aproximadamente de 30% maior que o rendimento por célula obtido a 30°C (363 ± 32 UH/mL/Abs).

Tabela 4.13 Rendimento por célula (UH/Abs) ao longo do tempo de indução a 30°C.

Tempo de indução (horas)	Média da atividade de Ply (UH/mL)	Média do crescimento celular (Abs)	Rendimento por célula (UH/mL/Abs)
0*	0	0,808	0
1	372	1,662	224
2	578	2,377	243
3	761	2,850	267
4	1266	3,490	363

* Instante em que ocorre a adição do indutor

Para comparar a expressão da pneumolisina nas condições de validação a 25°C e 30°C, realizou-se uma análise da expressão da proteína através de um SDS-PAGE (Figura 4.5). O gel apresenta o perfil de pneumolisina expressa no final do processo, após de 4 horas de indução, avaliando o extrato total, a fração solúvel e a fração insolúvel de cada uma das duas condições de expressão.

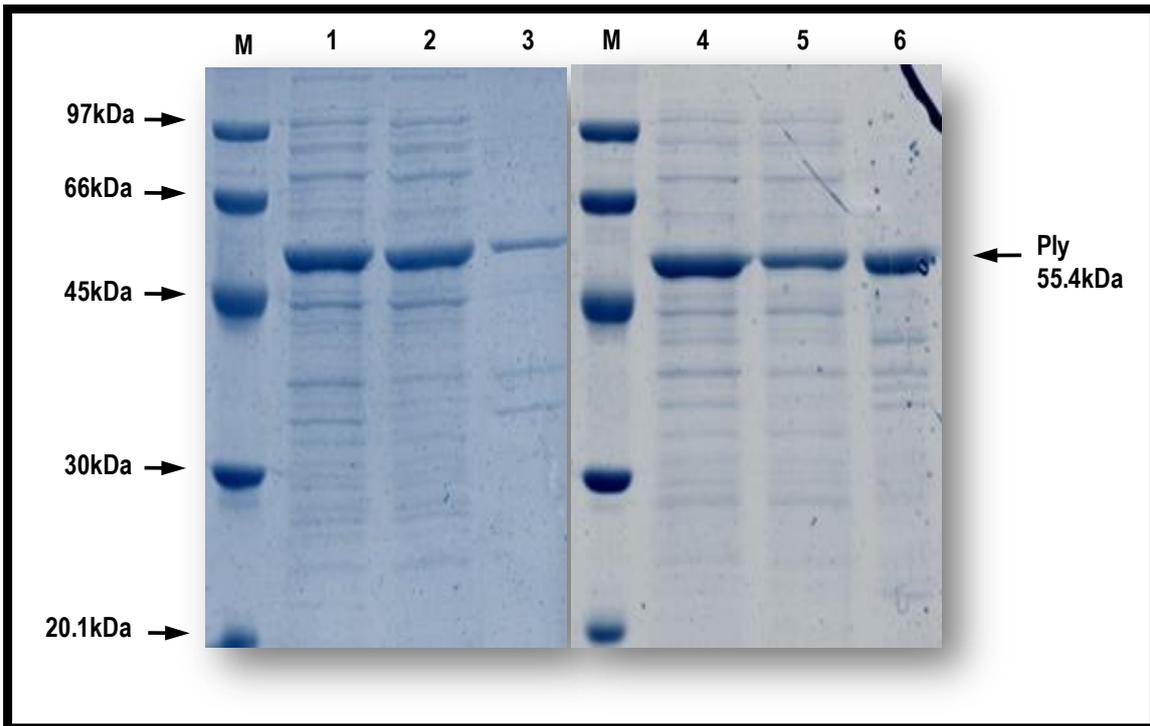


Figura 4.5 Gel em SDS-PAGE 12,5% dos extratos protéicos totais e de suas frações, solúvel e insolúvel, obtidos através da expressão da proteína Ply por *E. coli* BL21 Star (DE3) na validação a 25°C e a mesma condição de validação a 30°C. M, padrão de massa molecular; 1, 2, e 3, amostras do extrato total, fração solúvel, e fração insolúvel da expressão da Ply no final do processo a 25°C, respectivamente; 4, 5 e 6, amostras do extrato total, fração solúvel, e fração insolúvel da expressão da Ply, no final do processo a 30°C, respectivamente.

Observando o gel na Figura 4.5 é possível verificar que na condição de validação a 25°C (1, 2, e 3), a expressão da rPly foi praticamente toda solúvel (2), sendo mínimo o nível de expressão dela em corpos de inclusão (3). No entanto, para a mesma condição de expressão, mudando só a variável temperatura de indução de 25°C para 30°C, próximo da temperatura do ponto central, o perfil de expressão muda completamente, observando-se que a expressão da Ply foi na sua maior parte insolúvel (6), enquanto que foi reduzido o nível de expressão de forma solúvel (5).

Entretanto, é interessante ressaltar que, em ambas as condições, a determinação da dosagem de atividade hemolítica da proteína indicou que os valores são estatisticamente equivalentes (a 90% de confiança), pois o valor dessa atividade foi de 1394 ± 147 UH/mL para a condição de validação a 25°C e, no

caso da condição a 30 °C, o valor da atividade foi de 1266 ± 99 UH/mL. No caso da validação a 25 °C, a proteína é expressa ativa em níveis elevados, mas o crescimento celular final foi menor em comparação com 30 °C. No entanto, no caso da condição a 30 °C, o nível de expressão da Ply de forma ativa é baixo, mas como o crescimento celular foi maior que na condição da validação a 25 °C, compensa essa diferença de expressão. Isto indica que é possível ter uma flexibilidade na escolha da temperatura de acordo com as necessidades específicas de um processo de produção que venha a ser implementado em escala industrial, embora o rendimento por célula no processo a 25 °C tenha se mostrado maior. A expressão de pneumolisina na fração solúvel apresentou níveis similares aos obtidos em outros trabalhos, como por exemplo, de KELLY e JEDRZEJAS (2000).

Por tudo o que foi discutido previamente, a condição validada a 25 °C, escolhida através do plano fatorial fracionado, foi a condição mais adequada para expressar de forma solúvel e ativa a rPly em níveis elevados, mas reduzindo o custo e tempo operacional.

5.- CONCLUSÕES

Quando se trata de produzir uma proteína recombinante, dentre os vários sistemas de expressão, o mais simples é o microorganismo *Escherichia coli*. Deste sistema de expressão se tem amplo conhecimento de suas características como hospedeiro para a expressão de proteínas heterólogas. Conseqüentemente, encontram-se comercialmente vetores e cepas com as mais diversas especificações, para serem utilizados de acordo com a proteína a ser produzida e o processo utilizado. Mesmo assim, este sistema apresenta algumas limitações, como a produção da proteína heteróloga muitas vezes em forma de agregados insolúveis, o que em alguns casos considera-se como um problema nas etapas subseqüentes de purificação.

Sabe-se também que a expressão da proteína, de forma solúvel ou em corpos de inclusão, depende principalmente das características do sistema de expressão e das variáveis do processo. O estudo das variáveis que controlam a um processo de expressão pode conduzir à definição das condições mais adequadas tanto para a expressão da proteína em altos níveis como em forma solúvel.

Pelo previamente exposto, nesta dissertação de mestrado, o objetivo foi determinar os níveis de certos fatores do sistema que melhorem a expressão da proteína recombinante pneumolisina de forma solúvel em *E. coli*, e assim definir um processo de expressão altamente eficiente. Para isso, os efeitos de oito variáveis relacionadas com a composição de cultura e com as condições de indução da expressão da proteína foram avaliados, através de planejamento de experimentos, sobre as respostas crescimento celular, atividade hemolítica e produtividade.

Quando se avaliaram os efeitos das variáveis sobre o crescimento celular a absorvância no momento da indução, a concentração de indutor, a temperatura de indução, e as concentrações de extrato de levedura, triptona e glicose foram as variáveis que apresentaram significância estatística. No caso da concentração de

indutor e de glicose, a significância foi negativa, o que implica que o crescimento celular é inversamente proporcional às concentrações desses dois componentes. As outras quatro variáveis significativas apresentaram efeitos positivos. As duas variáveis restantes, concentração de glicerol e canamicina não apresentaram efeito significativo sobre o crescimento celular. Os efeitos avaliados para esta resposta não apresentaram comportamento não linear, pois a curvatura não foi estatisticamente significativa.

Quando os efeitos das oito variáveis sobre a atividade hemolítica da pneumolisina foram avaliados, para conhecer o nível de expressão solúvel desta proteína, as significâncias estatísticas foram diferentes da resposta anterior, indicando que a expressão da proteína recombinante de forma solúvel não está associada ao crescimento celular. Para este caso, a absorbância no momento da indução, a temperatura de indução, a concentração de triptona, glicose e canamicina foram as variáveis que apresentaram efeitos significativos estatísticos. A temperatura na indução foi a única variável que apresentou efeito negativo, indicando que para aumentar o nível de expressão de pneumolisina solúvel, a redução da temperatura é o mais adequado. Os outros efeitos significativos foram positivos. A concentração do indutor, do extrato de levedura e do glicerol foram as variáveis que não apresentaram significância estatística sobre a atividade hemolítica da pneumolisina. Para esta resposta, a análise da curvatura foi estatisticamente significativo, o que implica efeitos não lineares de alguma das variáveis influentes. O plano fatorial fracionado empregado nesta análise, não permite distinguir quais são essas variáveis, pois os efeitos diferentes dos efeitos principais estão confundidos com outros, não permitindo serem estimados. A realização de um gel SDS-PAGE permitiu ratificar as observações obtidas nesta análise sobre a relação inversa entre a temperatura de indução e o nível de expressão de proteína solúvel. Dado que os tempos dos diversos processos de expressão da proteína de forma solúvel foram diferentes por causa da indução em diferentes momentos do crescimento celular, também se avaliou a produtividade do sistema, resposta que normaliza esses tempos e permite assim considerar todos os processos por igual em relação ao tempo. Nesta resposta, as variáveis que apresentaram significância estatística foram: temperatura de indução, concentrações de triptona e canamicina. No caso da temperatura de indução, esse

efeito foi negativo, enquanto as concentrações apresentaram efeitos positivos. As cinco restantes variáveis não apresentaram efeitos estatisticamente significativos. Existem efeitos não lineares de alguma(s) destas variáveis significativas, uma vez que o efeito de curvatura foi significativo.

Através da avaliação estatística das três respostas do sistema, foi possível definir os níveis de cada um das oito variáveis para obter um processo de expressão da pneumolisina solúvel em níveis elevados e com uma redução de componentes, de tempo e gasto energético. Esse processo consiste no crescimento celular da célula hospedeiro em um meio de cultura constituído por 5g/L de extrato de levedura (nível -1), 5g/L de triptona (nível 0), 10g/L de NaCl (variável não estudada), 1g/L de glicose (nível -1), 30ug/mL de canamicina (nível 0) e sem adição de glicerol (nível -1). A indução da proteína é realizada quando o crescimento celular atinge o valor de absorvância 0,8 (nível -1) com 0,1mM de IPTG (nível -1) por 4h a 25 °C (nível -1).

A produção de pneumolisina nestas condições gerou os seguintes ganhos em relação com as variáveis referentes à composição do meio de cultura: redução em 5 vezes a concentração de extrato de levedura no meio, em 2 vezes a concentração de triptona, em quase 2 vezes a concentração de canamicina. No caso do glicerol foi possível retirá-lo completamente do sistema. Em referência às variáveis associadas com a condição de indução da expressão, o ganho foi: redução em 10 vezes a concentração de indutor, redução em 33% a temperatura de indução da expressão, o que significa um menor gasto energético, e finalmente redução no valor da absorvância no momento de indução até seu nível inferior de 0,8 e assim conseguindo um decréscimo no tempo de processo. Embora tenha se conseguido esse ganho no custo e tempo do processo, comparados com os níveis empregados nos trabalhos da literatura, a produtividade do processo foi elevada.

A produtividade média obtida neste processo foi 4,50 UH/mL/min com desvio padrão de 0,24 e desvio padrão relativo de 5,3%. Esta produtividade é estatisticamente equivalente às produtividades máximas obtidas no plano fatorial fracionado realizado, correspondentes ao experimento 9 (4,19 UH/mL/min) e ao experimento do ponto central (3,99 UH/mL/min e desvio padrão de 0,50). Desta

forma, pode-se concluir que embora se tenham reduzido consideravelmente muitos componentes do meio, assim como também das condições de indução, o meio validado a 25 °C manteve valores altos de produtividade em relação aos diversos experimentos do plano fatorial fracionado.

Uma última consideração sobre este processo é que ele foi obtido em escala de laboratório e, portanto, para aumentar os níveis de expressão em escala piloto ou maior, o cultivo precisa ser feito em bioreatores, pois as variáveis do processo precisam ser bem controladas e o regime de operação do cultivo precisa ser estudado, o que seria alvo para novos estudos.

Finalmente pode-se concluir que o uso de ferramentas estatísticas e de planejamento de experimentos demonstrou ser uma estratégia útil e eficiente para o processo de definição da composição de um meio de cultura e das condições de indução da pneumolisina recombinante em *E. coli*, realizando um número de experimentos consideravelmente menor do que implicaria a realização do mesmo tipo de análise, mas empregando o método tradicional de experimentação de variar por vez um fator e manter os demais constantes, que não permite avaliar as variáveis conjuntamente. Apesar de bastante difundido em muitas áreas, o emprego de planejamento experimental é ainda incipiente na área de expressão de proteínas recombinantes.

6.- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHTAR, M.S., BHAKUNI, V., 2004, “*Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase: An overview”, **Current Science**, v. 86, p. 285-295.

ALBA, M. J. G., CALVO, E. G., 2000, “Characterization of biorreactor process: Aerobic *Escherichia coli* cultures”, **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 107-118.

ALBERT, 2002, **Molecular biology of the cell**. 4ed, Nova York, Estados Unidos de America, Garland Science.

ALONSO DE VELASCO, E., VERHEUL, A. F. M., VERHOEF, J., *et al.*, 1995, “*Streptococcus pneumoniae*: Virulence factors, pathogenesis, vaccines”, **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 591-603.

ÁLVARES DE LUNA, F. F., CAUSSE DEL RÍO, M., IBARRA GONZÁLES, A., *et al.* 2005, “*Streptococcus pneumoniae*: resistencia antibiótica y serotipos en un período de dos años”, **Revista Española de Quimioterapia**, v. 18, p. 217-221.

BANEYX, F., 1999, "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*", **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 411-421.

BAROCCHI, M.A., CENSINI, S., RAPPUOLI, R., 2007, “Vaccines in the era of genomics: The pneumococcal challenge”, **Vaccine**, v. 25, p. 2963–2973.

BOGAERT, D., HERMANS, P.W.M., ADRIAN, P.V., *et al.*, 2004, “Pneumococcal vaccines: an update on current strategies”, **Vaccine**, v. 22, p. 2209–2220.

BRAIDO, F., BELLOTTI, M., MARIA, A.D., *et al.*, 2008, “The role of Pneumococcal vaccine”, **Pulmonary Pharmacology e Therapeutics**, v. 21, p. 608– 615.

BRILES, D. E., HOLLINGSHEAD, S., BROOKS-WALTER, A., *et al.*, 2000, "The potential to use PspA and other pneumococcal proteins to elicit protection against pneumococcal infection", **Vaccine**, v. 18, p. 1707-1711.

CAO, J., LI D., GONG, Y. *et al.*, 2009, "Caseinolytic protease: a protein vaccine which could elicit serotype-independent protection against invasive pneumococcal infection", **Clinical and Experimental Immunology**, v. 156, p. 52-60.

CHEN, S. J., CHANG, M. C., CHENG, C. Y., 1997, "Effect of Induction Conditions on Production and Excretion of *Aeromonas hydrophila* Chitinase by Recombinant *Escherichia coli*", **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, p. 610-613.

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

CHOI, M. S., SAXENA, A., CHILUKURI, N., 2010, "A strategy for the production of soluble human senescence marker protein-30 in *Escherichia coli*", **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, p. 509-513

CHUAN, Y. P., LUA, L.H.L., MIDDELBERG A.P.J., 2008, "High-level expression of soluble viral structural protein in *Escherichia coli*", **Journal of Biotechnology**, v. 134, p. 64–71.

COHEN, S. M., 2010, "Pneumococcal vaccination and specific polysaccharide antibody deficiency syndrome", **The Journal for Nurse Practitioners**, v. 6, p. 534-539.

DIDIER, D., ETCHEVERRIGARAY, M., KRATJE, R., *et al.*, 2007, "Crossed mixture design and multiple response analysis for developing complex culture media used in recombinant protein production", **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 86, p. 1–9.

DONOVAN, R. S., ROBINSON, C. W., GLICK, B. R., 1996, "Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the *lac* promoter", **Journal of Industrial Microbiology**, v. 16, p. 145–154.

EINSFELDT, K., 2010, **Seleção, clonagem e expressão de uma protein associada à virulência de *Streptococcus pneumoniae*** . Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

ESPINAL, A. A. C., 2007, **Órdenes de experimentación em diseños factoriales**. Tesis doctoral, Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona, Catalunya, España.

FELDMAN, C., ANDERSON, R., 2008, "New insights into pneumococcal disease", **Respirology**, v. 14, p. 167-179.

GARCÍA-SUÁREZ, M.M., VÁZQUEZ, F., MÉNDEZ, F. J., 2006, "*Streptococcus pneumoniae* virulence factors and their clinical impact: an update", **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, p. 512-517.

GEORGIU, G., VALAX, P., 1996, "Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*", **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, p. 190-197.

GILBERT, R. J. C., JIMÉNEZ, J. L., CHEN, S., *et al.*, 1999, "Two structural transitions in membrane formation by pneumolysin, the pore-forming toxin of *Streptococcus pneumoniae*", **Cell**, v. 97, p. 647-655,

GÓRNICKI, A., 2008, "The hemolysis kinetics of psoriatic red blood cells", **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 41, p. 154-157.

GRAY, B. M., CONVERSE III, G. M., DILLON, H. C. J. 1979. "Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* causing disease", **Journal of Infectious Diseases**, v. 140, p. 979–983.

GRIMPREL, E., 2009, "Segurança e imunogenicidade de uma vacina pneumocócica conjugada 13-valente administrada com a vacinação pediátrica de rotina em bebês

sadios na França”. In: **Foco em Vacina Pneumocócica Conjugada: atual e futura**, p. 8-10.

HANSEN, R., ERIKSEN, N. T., 2007, “Activity of recombinant GST in *Escherichia coli* grown on glucose and glycerol”, **Process Biotechnology**, v. 42, p. 1259-1263.

HIRST, R. A., KADIOGLU, A., O´CALLAGHAN, C., *et al.*, 2004, “The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis”, **Clinical Experimental Immunology**, v. 138, p. 195-201.

HOSKINS, J., ALBORN, W. E., ARNOLD, J., *et al.*, 2001, “Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6”, **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 5709-5717.

HOU, Z., SPENSER, O., MILES, J., *et al.*, 2004, “Antibody response to pneumolysin and to pneumococcal capsular polysaccharide in healthy individuals and *Streptococcus pneumoniae* infected patients”, **Vaccine**, v. 22, p. 1157-1161.

JANA, S., DEB, J. K., 2005, “Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*”, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 289-298.

JEDRZEJAS, M. J., 2001, “Pneumococcal Virulence Factors: Structure and Function”, **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, p. 187–207.

KADIOGLU, A., WEISER, J.N., PATON, J.C. *et al.*, 2008, “The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease”, **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 288-301.

KANCLERSKI, K., MÖLLBY, R., 1987. “Production and purification of *Streptococcus pneumoniae* hemolysin (pneumolysin). **Journal of Clinical Microbiology**. v. 25, p. 222-225.

KELLY, S. J., JEDRZEJAS, M. J., 2000, "Structure and Molecular Mechanism of a Functional Form of Pneumolysin: A Cholesterol-Dependent Cytolysin from *Streptococcus pneumoniae*", **Journal of Structural Biology**, v. 132, p. 72-81.

KHAN, M. A., SADAF, S., SAJJAD, S., *et al.*, 2010, "Production enhancement and refolding of caprine growth hormone expressed in *Escherichia coli*", **Protein Expression and Purification**, v. 68, p. 85-89.

KILIKIAN, B. V., SUÁREZ, I. D., LIRIA, C. W., *et al.*, 2000, "Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction", **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1019-1025.

KWON, H.Y., OGUNNIYI, A. D., CHOI, M. *et al.*, 2004, "The ClpP Protease of *Streptococcus pneumoniae* Modulates Virulence Gene Expression and Protects against Fatal Pneumococcal Challenge", **Infection and Immunity**, v. 72, p. 5646-5653.

LANIO, M. E., ALVAREZ, C., PAZOS, F., *et al.*, 2003, "Effects of sodium dodecyl sulfate on the conformation and hemolytic activity of St I and St II, two isotoxins purified from *Stichodactyla helianthus*", **Toxicon**, v. 41, p. 65-70.

LARENTIS, A. L., ALMEIDA, R. V., MARTINS, O. B., ALVES, T. L. M., 2006, **Engenharia de Bioprocessos Recombinantes**. Escola Piloto Virtual do Programa de Engenharia Química/COPPE.

LARENTIS, A. L., ARGONDISO, A. P. C., JESSOURON, E., *et al.*, 2011 "Cloning and optimization of induction conditions for mature PsaA (pneumococcal surface adhesin A) expression in *Escherichia coli* and recombinant protein stability during long-term storage" (submetido à **Protein Expression and Purification**).

LEÓN, A.D., ISLÁS, H.J., CUEVAS, M.G. *et al.*, 2004, "Analysis of the expression of the *Trichoderma harzianum ech42* gene in two isogenic clones of *Escherichia coli* by surface response methodology", **Process Biochemistry**, v.39, p.2173-2178.

LI-KOROTKY, H., LO, C., ZENG, F., *et al.*, 2009, "Interaction of phase variation, host, and pressure/gas composition: pneumococcal gene expression of PsaA, SpxB, Ply and LytA in simulated middle ear environments", **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 73, p. 1417-1422.

LUCHESE, M. D., ARGONDIZZO, A. P. C., JESSOUROUN, E., *et al.*, 2009, "Influência de diferentes condições na expressão da proteína recombinante pneumolisina (rPly)", **Resumo do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos**.

MARRIOTT, H. M., MITCHELL, T. J., DOCKRELL, D. H., 2008, "Pneumolysin: a double-edged sword during the host-pathogen interaction", **Current Molecular Medicine**, v. 8, p. 497-509.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010, "Informe Técnico da Vacina Pneumocócica 10-valente (conjugada)", p. 1-18.

MISTRY, D., STOCKLEY, R. A., 2006, "IgA1 protease", **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, p. 1248-1248.

MONTGOMERY, 1991, **Diseño y análisis de experimentos**. 1ed, Distrito Federal, México, Grupo Editorial Iberoamérica.

MORAES, Â. M., AUGUSTO, E. F. P., CASTILHO, L. R., 2007, **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica**. 1ed, São Paulo, Brasil, Roca.

MURBY, M., UHLÉN, M., STAHL, S., 1996, "Upstream strategies to minimize proteolytic degradation upon recombinant production in *Escherichia coli*", **Protein Expression and Purification**, v. 7, p. 129-136.

NIKEL, P. I., PETTINARI, M. J., MÉNDEZ, B. S., *et al.*, 2005, "Statistical optimization of cultura médium for biomass and poly(3-hydroxybutyrate) production by a recombinant agroindustrial byproducts", **International Microbiology**, v. 8, p. 243-250.

NIKEREL, I. E., TOKSOY, E., KIRDAR, B., *et al.*, 2005, "Optimizing medium composition for *TaqI* endonuclease production by recombinant *Escherichia coli* cells using response surface methodology", **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1633-1639.

NIKEREL, I. E., TOKSOY, E., KIRDAR, B., *et al.*, 2006, "Optimization of medium composition for biomass production of recombinant *Escherichia coli* cells using response surface methodology", **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, p. 1-6.

NOLLMANN, M., GILBERT, R., MITCHELL, T., *et al.*, 2004, "The role of cholesterol in the activity of pneumolysin, a bacterial protein toxin", **Biophysical Journal**, v. 86, p. 3141-3151.

OGUNNIYI, A.D., WOODROW, M. C., POOLMAN, J. T., *et al.*, 2001, "Protection against *Streptococcus pneumoniae* elicited by immunization with pneumolysin and CbpA", **Infection and Immunity**, v. 69, p. 5997-6003.

OGUNNIYI, A.D., GRABOWICS, M., BRILES, D.E. *et al.*, 2007, "Development of a vaccine against invasive pneumococcal disease based on combinations of virulence proteins of *Streptococcus pneumoniae*", **Infection and Immunity**, v. 75, p. 350-357.

OLAOFE, O. A., BURTON, S. G., COWAN, D. A., *et al.*, 2010, "Improving the production of a thermostable amidase through optimizing IPTG induction in a highly dense culture of recombinant *Escherichia coli*", **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, p. 19-24.

OMS (Organização Mundial da Saúde), 2005, "Recommendations for the production and control of pneumococcal conjugate vaccines". Geneva, World Health Organization. (WHO Technical Report Series, No. 927), p. 64-98.

OMS (Organização Mundial da Saúde), 2007, "Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization – WHO position paper", **Weekly epidemiological record**, v. 82, n.12, p. 93-104.

OMS (Organização Mundial da Saúde), 2010, "Treatment and prevention of pneumonia", **Sixty-Third World Health Assembly, Report A63/26**, p. 1-4.

PAN, H., XIE, Z., BAO, W., *et al.*, 2008, "Optimisation of culture conditions to enhance cis-epoxysuccinate hydrolase production in *Escherichia coli* by response surface methodology", **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, p. 133-138.

PARRILLI, E., GIULIANI, M., MARINO, G., *et al.*, 2010, "Influence of production process design on inclusion bodies protein: the case of an Antarctic flavohemoglobin", **Microbial Cell Factories**, v. 9, p. 1-10.

PATON, J. C., LOCK, R. A., HANSMAN, D. J., 1983, "Effect of Immunization with Pneumolysin on Survival Time of Mice Challenged with *Streptococcus pneumoniae*", **Infection and Immunity**, v. 40, p. 548-552.

PATON, J. C., BERRY, M. A., LOCK, R. A., *et al.*, 1986, "Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Streptococcus pneumoniae* gene encoding pneumolysin", **Infection and Immunity**, v. 54, p. 50-55.

PETI, W., PAGE, R., 2007, "Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost", **Protein Expression and Purification**, v. 51, p. 1-10.

PISTORINO, M., PFEIFER, B. A., 2009, "Efficient experimental design and micro-scale medium enhancement of 6-deoxyerythronolide B production through *Escherichia coli*", **Biotechnology progress** v. 25, p. 1364-1371.

PLETZ, M.W., MAUS, U., KRUG, N., Welte, T., Lode, H., 2008, "Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaption of the species", **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, p. 199-206.

PRADO, V. J. 2001, "Conceptos microbiológicos de *Streptococcus pneumoniae*", **Revista Chilena de Infectologia**, v. 18, p. 6-9.

PRICES, K. E., CAMILLI, A., 2009, "Pneumolysin localizes to the cell wall of *Streptococcus pneumoniae*", **Journal of Bacteriology**, v. 191, p. 2163-2168.

RODRIGUES E IEMMA, 2009, **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos – Uma estratégia seqüencial de planejamentos**, 2ed., São Paulo, Brasil, Editora Casa do Pão.

ROMANELLO, V., MARCACCI, M., DAL MOLIN, F. *et al.*, 2006, "Cloning, expression, purification, and characterization of *Streptococcus pneumoniae* IgA1 protease", **Protein Expression and Purification**, v. 45, p. 142–149.

RUBINS, J. B., JANOFF, E. N., 1998, "Pneumolysin: a multifunctional pneumococcal virulence factor", **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 131, p. 21-27.

SAMBROOK. J., RUSSELL, D. W., 2001, **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 3ed., Nova York, Estados Unidos de America, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SAWANO, H., KOUMOTO, Y., OHTA, K., *et al.*, 1992, "Efficient in vitro folding of the three-disulfide derivatives of hen lysozyme in the presence of glycerol. **FEBS Lett**, v. 303, p. 11–14.

SCHACHERN, P.A., TSUPRUN, V., CUREOGLU, S., *et al.*, 2009, "Virulence of Pneumococcal Proteins on the Inner Ear", **Archives of Otolaryngology – Head and Neck Surgery**, v. 7, p. 657-661.

SHIN, C. S., HONG, M. S., BAE, C. S., *et al.*, 1997, "Enhanced production of human mini-proinsulin in fed-batch cultures at high cell density of *Escherichia coli* BL21(DE3) [pET-3aT2M2]", **Biotechnology Progress**, v. 13, p. 249-257.

SONNEN, A. F. P., ROWE, A. J., ANDREW, P. W., *et al.*, 2008, "Oligomerisation of pneumolysin on cholesterol crystals: similarities to the behavior of polyene antibiotics", **Toxicon**, v. 51, p. 1554-1559.

SØRENSEN, H.P., MORTENSEN, K.K., 2005, "Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*", **Journal of Biotechnology**, v. 115, p. 113-128.

SWALLEY, S.E., FULGHUM J.R., CHAMBERS, S.P., 2006, "Screening factors effecting a response in soluble protein expression: Formalized approach using design of experiments", **Analytical Biochemistry**, v. 351, p. 122-127.

TAI, S. S., 2006, "*Streptococcus pneumoniae* protein vaccine candidates: properties, activities and animal studies", **Critical Reviews in Microbiology**, v. 32, p. 139-153.

TILLEY, S. J., ORLOVA, E. V., GILBERT, R. J. C., *et al.*, 2006, "Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin", **Cell**, v. 121, p. 247-256.

TOKSOY, E., ÖNSAN, Z.Í., KIRDAR, B., 2002, "High-level production of *TaqI* restriction endonuclease by three different expression systems in *Escherichia coli* cells using the T7 phage promoter", **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 239-245.

URBAN, A., ANSMANT, I., MOTORIN, Y., 2003, "Optimisation of expression and purification of the recombinant YOL066 (Rib2) protein from *Saccharomyces cerevisiae*", **Journal of Chromatography B**, v. 786, p. 187-195.

VIEIRA, A. C., GOMES, M. C., ROLO FILHO, M., EUDES FILHO, J., BELLO, E. J. M., FIGUEIREDO, R. B., 2007, "*Streptococcus pneumoniae*: a study of strains isolated from cerebrospinal fluid", **Jornal de Pediatria**, v. 83, p. 71-78.

VILA-CÓRCOLES, A., 2007, "Advances in pneumococcal vaccines", **Drugs Aging**, v. 24, p. 791-800.

VOLONTÈ, F., MARINELLI, F., GASTALDO, L., *et al.*, 2008, "Optimization of glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase expression in *E. coli*", **Protein Expression and Purification**, v. 61, p. 131-137.

WANG, Y.H., JING, C.F., YANG, B. *et al.*, 2005, "Production of a new sea anemone neurotoxin by recombinant *Escherichia coli*: Optimization of culture conditions using response surface methodology", **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2721–2728.

WARDLAW, T., JOHANSSON, E. W., HODGE, M., 2006, "Pneumonia: the forgotten killer of children", **The United Nations Children's Fund (UNICEF)/World Health Organization (WHO)**, p. 1-44.

WINKELMANN, J., CALLONI, G., CAMPIONI, S., *et al.*, 2010, "Low-level expression of a folding-incompetent protein in *Escherichia coli*: search for the molecular determinants of Protein Aggregation *in vivo*", **Journal of Molecular Biology**, v. 398, p. 600-613.

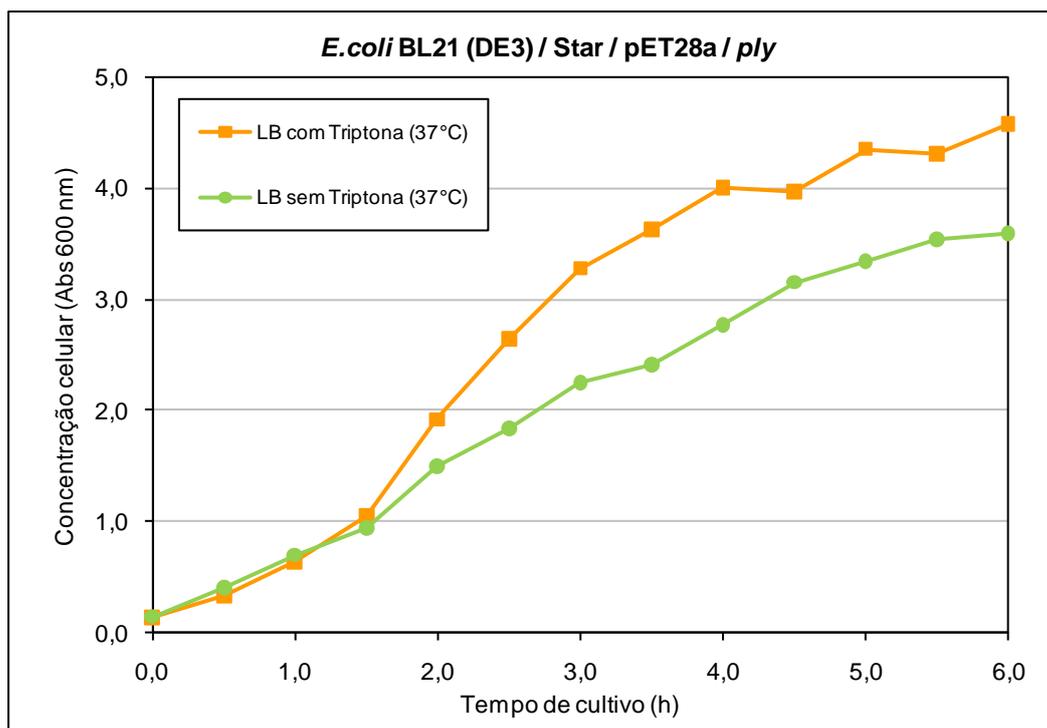
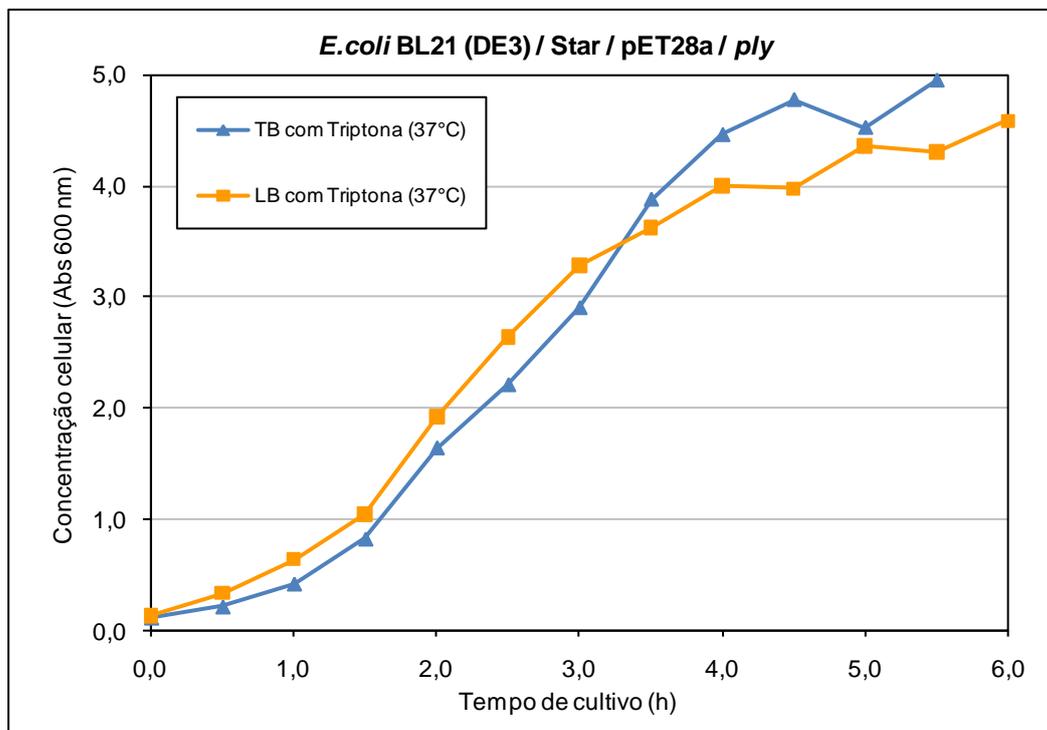
WOOD, T. K., PERETTI, S. W., 1991, "Effect of chemically-induced cloned gene expression on protein synthesis in *E. coli*", **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, p. 397–412.

YAMAGUCHI, M., MINAMIDE, Y., TERAOKA, Y., *et al.*, 2009, "Nrc of *Streptococcus pneumoniae* suppresses capsule expression and enhances anti-phagocytosis", **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 390, p. 155-160.

YU, H., LI, C., LI, R., *et al.*, 2007, "Factors influencing hemolytic activity of venom from the jellyfish *Rhopilema esculentum* Kishinouye", **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1173-1178.

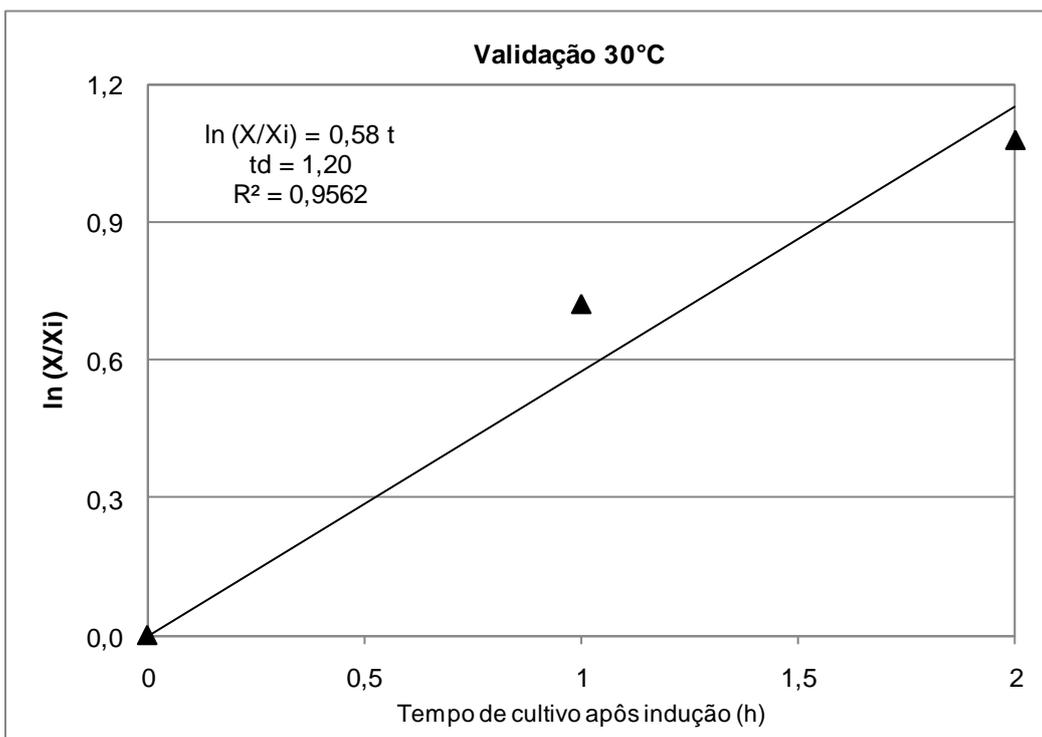
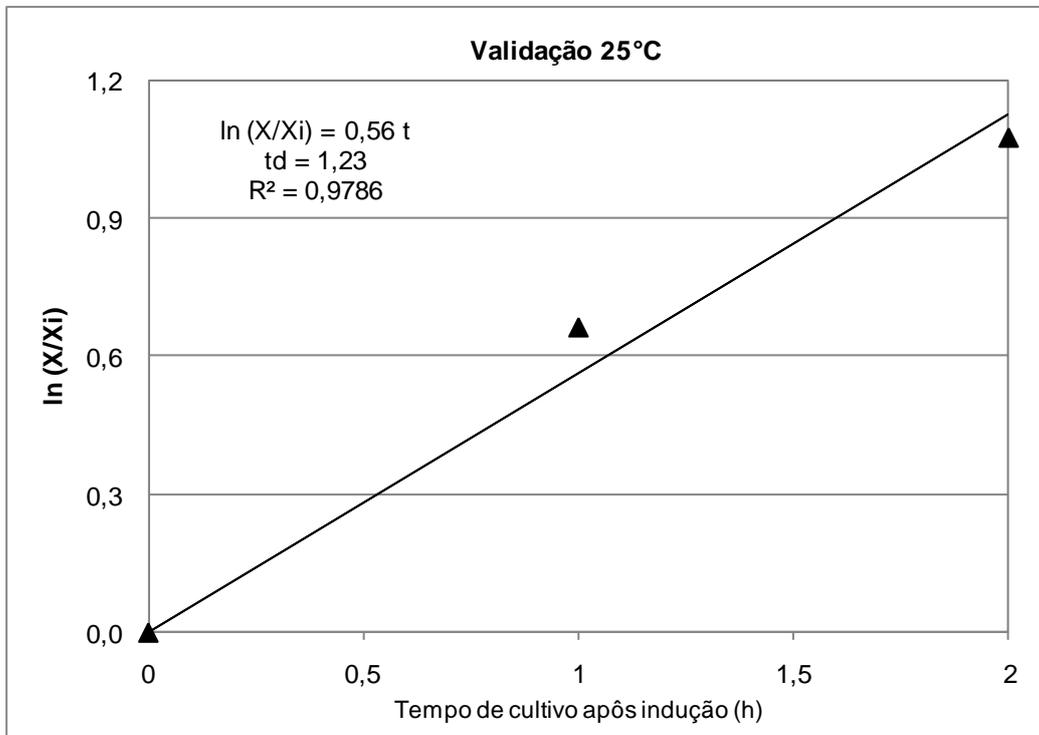
APÊNDICE A

Curvas de crescimento celular sem indução de meios que apresentaram maior nível de extrato de levedura e triptona, assim como também nível mínimo desses dois componentes.



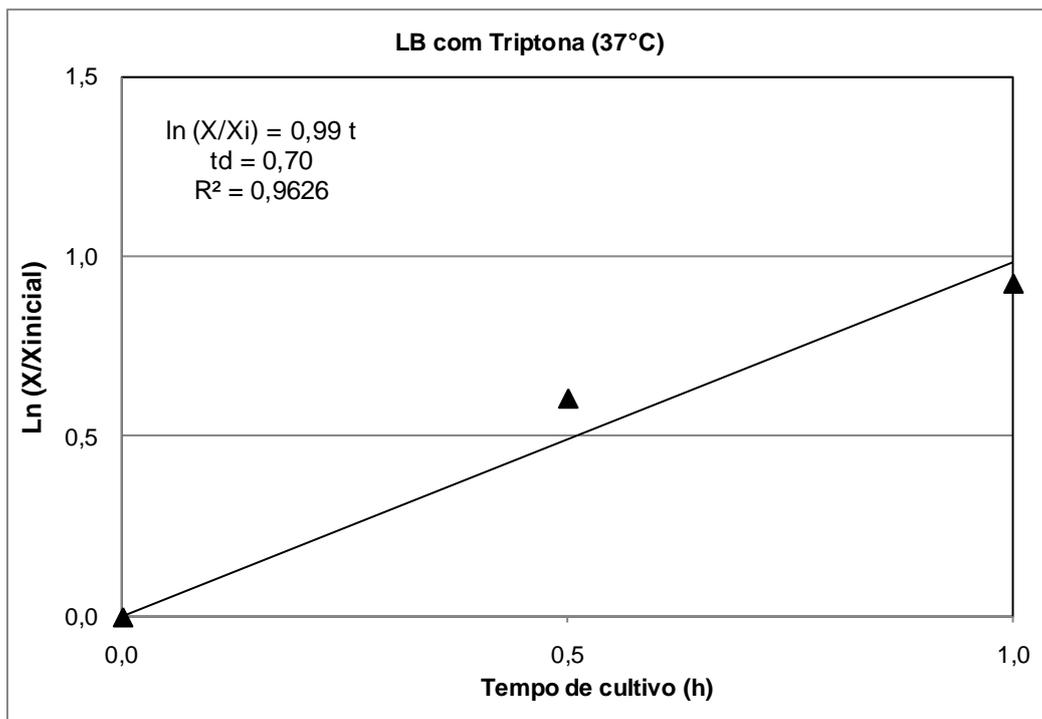
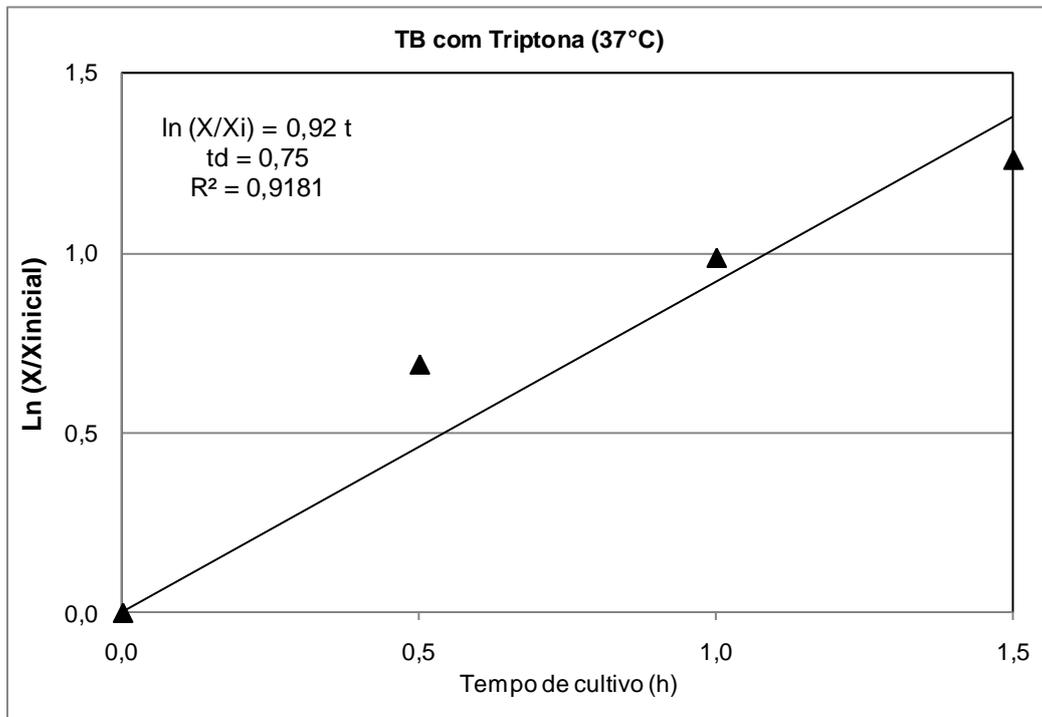
APÊNDICE B

Taxas específicas de crescimento celular e tempos de duplicação dos processos de expressão validados a 25°C e 30°C.



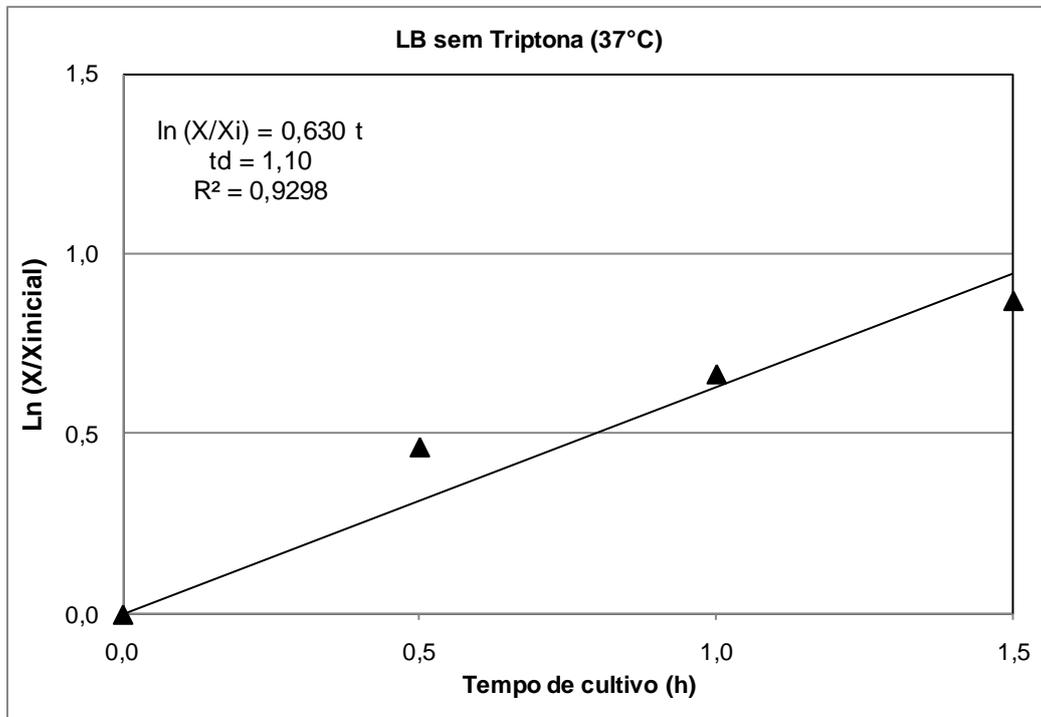
APÊNDICE C

Gráficos e tabela com as taxas específicas de crescimento celular e tempos de duplicação dos processos de expressão sem indução (APENDICE A)



APÊNDICE C

Gráficos e tabela com as taxas específicas de crescimento celular e tempos de duplicação dos processos de expressão sem indução (APENDICE A)



Processo de expressão	Taxa específica de crescimento celular (h ⁻¹)	Tempo de duplicação do crescimento celular (h)
TB com Triptona sem indução (37 °C)	0,92	0,75
LB com Triptona sem indução (37 °C)	0,99	0,70
LB sem Triptona sem indução (37 °C)	0,63	1,10
Validação com indução (25 °C)	0,56	1,23
Validação com indução (30 °C)	0,58	1,20

APÊNDICE D

Tabela com as diferentes condições avaliadas no plano fatorial fracionado 2⁸⁻⁴ e as respostas obtidas em cada uma dessas condições.

Condições do Plano Fatorial	Absorbância na Indução (Abs)	Conc. Indutor (mM)	Tem. de Indução (°C)	Conc. Ext levedura (g/L)	Conc. Triptona (g/L)	Conc. Glicose (g/L)	Conc. Glicerol (% v/v)	Conc. Canamicina (µg/mL)	Atividade Hemolítica (UH/mL)	Crescimento celular (Abs)	Produtividade (UH/mL/min)
1	0,8 (-1)	0,10 (-1)	25 (-1)	5,0 (-1)	0 (-1)	1,0 (-1)	0,0 (-1)	10 (-1)	612	2,08	1,77
2	2,0 (+1)	0,10 (-1)	25 (-1)	5,0 (-1)	0 (-1)	10,0 (+1)	0,4 (+1)	50 (+1)	1171	2,86	2,60
3	0,8 (-1)	1,00 (+1)	25 (-1)	5,0 (-1)	10 (+1)	1,0 (-1)	0,4 (+1)	50 (+1)	1307	2,62	3,79
4	2,0 (+1)	1,00 (+1)	25 (-1)	5,0 (-1)	10 (+1)	10,0 (+1)	0,0 (-1)	10 (-1)	1305	3,46	3,07
5	0,8 (-1)	0,10 (-1)	37 (+1)	5,0 (-1)	10 (+1)	10,0 (+1)	0,4 (+1)	10 (-1)	678	3,18	1,99
6	2,0 (+1)	0,10 (-1)	37 (+1)	5,0 (-1)	10 (+1)	1,0 (-1)	0,0 (-1)	50 (+1)	1188	6,42	3,09
7	0,8 (-1)	1,00 (+1)	37 (+1)	5,0 (-1)	0 (-1)	10,0 (+1)	0,0 (-1)	50 (+1)	658	2,78	1,88
8	2,0 (+1)	1,00 (+1)	37 (+1)	5,0 (-1)	0 (-1)	1,0 (-1)	0,4 (+1)	10 (-1)	656	3,76	1,40
9	0,8 (-1)	0,10 (-1)	25 (-1)	23,6 (+1)	10 (+1)	10,0 (+1)	0,0 (-1)	50 (+1)	1446	3,45	4,19
10	2,0 (+1)	0,10 (-1)	25 (-1)	23,6 (+1)	10 (+1)	1,0 (-1)	0,4 (+1)	10 (-1)	1344	4,73	3,34
11	0,8 (-1)	1,00 (+1)	25 (-1)	23,6 (+1)	0 (-1)	10,0 (+1)	0,4 (+1)	10 (-1)	915	2,65	2,65
12	2,0 (+1)	1,00 (+1)	25 (-1)	23,6 (+1)	0 (-1)	1,0 (-1)	0,0 (-1)	50 (+1)	1146	4,21	2,73
13	0,8 (-1)	0,10 (-1)	37 (+1)	23,6 (+1)	0 (-1)	1,0 (-1)	0,4 (+1)	50 (+1)	639	4,09	1,91
14	2,0 (+1)	0,10 (-1)	37 (+1)	23,6 (+1)	0 (-1)	10,0 (+1)	0,0 (-1)	10 (-1)	1013	5,47	2,41
15	0,8 (-1)	1,00 (+1)	37 (+1)	23,6 (+1)	10 (+1)	1,0 (-1)	0,0 (-1)	10 (-1)	335	4,02	1,00
16	2,0 (+1)	1,00 (+1)	37 (+1)	23,6 (+1)	10 (+1)	10,0 (+1)	0,4 (+1)	50 (+1)	1353	5,40	3,22
17	1,4 (0)	0,55 (0)	31 (0)	14,3 (0)	5 (0)	5,5 (0)	0,2 (0)	30 (0)	1469	3,60	3,97
18	1,4 (0)	0,55 (0)	31 (0)	14,3 (0)	5 (0)	5,5 (0)	0,2 (0)	30 (0)	1557	3,79	4,21
19	1,4 (0)	0,55 (0)	31 (0)	14,3 (0)	5 (0)	5,5 (0)	0,2 (0)	30 (0)	1610	3,73	4,47
20	1,4 (0)	0,55 (0)	31 (0)	14,3 (0)	5 (0)	5,5 (0)	0,2 (0)	30 (0)	1615	3,82	4,61
21	1,4 (0)	0,55 (0)	31 (0)	14,3 (0)	5 (0)	5,5 (0)	0,2 (0)	30 (0)	1506	3,82	4,07
22	1,4 (0)	0,55 (0)	31 (0)	14,3 (0)	5 (0)	5,5 (0)	0,2 (0)	30 (0)	1507	3,68	4,07
23	1,4 (0)	0,55 (0)	31 (0)	14,3 (0)	5 (0)	5,5 (0)	0,2 (0)	30 (0)	1158	3,24	3,13
24	1,4 (0)	0,55 (0)	31 (0)	14,3 (0)	5 (0)	5,5 (0)	0,2 (0)	30 (0)	1263	3,32	3,41