

ESTRATÉGIAS DE INDUÇÃO NA PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *Leishmania chagasi*

Anderson Steyner Rozendo ¹, Luana Camilla Cordeiro Braz ¹, Fagner José da Costa Oliveira ², Édipo da Silva Almeida ², Francisco Canindé de Sousa Júnior³, José Renato Guimarães ⁴, Franklin Ferreira de Farias Nóbrega ⁵, Michelle Rossana Ferreira Vaz ⁵

¹Bolsistas PIBIC/CNPq/UFMG, Discentes do curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

² Discente do curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

³Doutorando em Biotecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, RN

⁴Iniciação científica PIVIC/UFMG, Discente do curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

⁵Professores Doutores. Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, Universidade Federal de Campina Grande, Sumé, PB.

*Correspondência: Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande. (CDSA-UFCG), Rua Luiz Grande, CEP 58.540-000, Sumé, Paraíba.

E-mail: mrossanavaz@gmail.com

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a realização de uma revisão da literatura especializada abordando os principais aspectos das estratégias de indução da produção de antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi*. A importância no desenvolvimento de tais antígenos fundamenta-se na necessidade de produzir proteínas recombinantes de interesse para a farmacobiologia em grandes quantidades, apresentando considerável ação farmacológica sem aspectos toxicológicos. A biotecnologia permite através da tecnologia do DNA recombinante a geração dessas proteínas, utilizando *Escherichia coli* como hospedeiro heterólogo. Neste sistema de expressão se faz necessário a aplicação de estratégias de otimização, especialmente em grande escala, dessa forma, o conhecimento a cerca do tipo de indutor, tempo de indução e concentração, bem como a influência que esta última exerce na cultura, são parâmetros que poderão influenciar positivamente no processo em si, mas também economicamente.

Descritores: Leishmaniose, Lactose, IPTG.

STRATEGIES FOR INDUCTION IN THE *Leishmania chagasi* RECOMBINANT ANTIGENS PRODUCTION

ABSTRACT

This study aimed to conduct a review about the main aspects of the induction strategies in the production of *Leishmania chagasi* recombinant antigens. The importance in the development of such antigens is based on the need to produce in large scale of recombinant proteins. These proteins may be important for pharmacology, resulting in considerable pharmacological action without or with less toxicological aspects. Biotechnology allows through recombinant DNA technology to generate these proteins using *Escherichia coli* as heterologous host. In this expression system is needed to use optimization strategies, especially in large scale production. Thereby, knowledge about the type of inductor, its induction time and concentration and concentration influence on the growing culture are parameters that may positively affect the process itself as well its economic viability.

Keywords: Leishmaniosis, Lactose, IPTG.

INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas são um grande problema de saúde pública no mundo, por afetarem países mais pobres e populações de baixa renda. O Brasil contribui com a maior parte do encargo de doenças tropicais negligenciadas na América Latina e Caribe (1). Essas enfermidades apresentam investimentos reduzidos em pesquisas e produção de medicamentos, pois não há interesse por parte de empresas e laboratórios devido a menores retornos financeiros. Assim, as pesquisas para tratamento, prevenção e controle dessas doenças partem geralmente de investimentos governamentais e iniciativas de universidades.

As leishmanioses pertencem a esse grupo das doenças negligenciadas, representando atualmente um importante agravo na saúde pública do Brasil. Segundo dados do ano 2007 foram constatados 3505 casos, principalmente em crianças (2). A doença possui uma ampla distribuição geográfica, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, onde a nível nacional o Nordeste é particularmente afetado.

As leishmanioses são um complexo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* Ross, 1903 (3), onde no Brasil a leishmaniose visceral americana (LVA) é causada pelo agente etiológico *Leishmania chagasi*. A transmissão da leishmaniose para o hospedeiro vertebrado se dá pela picada do mosquito infetado (4), sendo as fêmeas hematófagas.

Em áreas endêmicas do Brasil, as espécies de flebotamíneas eram consideradas silvestres por sua dependência de fatores ambientais, já com a urbanização da doença o vetor tornou-se adaptado às áreas urbanas (5).

No cenário brasileiro, a importância da leishmaniose se deve ao fato de possibilidade de ocorrência de formas graves da doença quando associada ao quadro de má nutrição e infecções concomitantes (6).

A droga empregada atualmente para o tratamento da leishmaniose é o Glucantime, que apresenta elevada toxicidade. Dessa forma, tornou-se importante a busca de novas drogas que possam contribuir ao tratamento da doença, apresentando considerável eficácia e viabilidade econômica (7). Levando-se em consideração a necessidade da produção de tais drogas, a biologia molecular vem a contribuir para a produção de antígenos recombinantes expressos em microrganismos geneticamente engenheirados.

Essa estratégia, cada vez mais utilizada na pesquisa e desenvolvimento de vacinas e testes diagnósticos, consiste no isolamento e expressão heteróloga de antígenos do agente etiológico. Essas proteínas, uma vez purificadas, podem ser

utilizadas como ferramenta para obtenção de um diagnóstico específico, assegurando maior sensibilidade e especificidade aos testes (6). Podendo ser também utilizadas para a produção de vacinas de segunda geração.

A partir da inserção da sequência do antígeno, por meio de vetores de expressão, em células que serão responsáveis por produzir a proteína do antígeno em escala industrial, será necessária a utilização de indutores. Esses indutores interagem com promotores específicos e direcionam as células para produção do antígeno de interesse. O emprego desses indutores deve ser otimizado para obtenção de concentrações cada vez maiores do antígeno recombinante.

Os sistemas de expressão em bactérias mais comumente utilizados são baseados no promotor do *operon lac* de *Escherichia coli*. O indutor natural desse promotor é a lactose, que quando adicionada ao meio irá direcionar para a produção da proteína recombinante. Contudo, vem sendo utilizada uma variedade de outros indutores para esses sistemas de expressão, sendo os mais comuns o isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e o metil-1-tio- β -D-galactosídeo (TMG) (8).

Na perspectiva de uma reflexão a cerca dos aspectos gerais relacionados às estratégias de indução na produção dos antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi*, a proposta dessa pesquisa foi analisar as melhores maneiras de aplicação dos indutores nos processos de produção, possibilitando uma alternativa à otimização de tais processos.

Leishmania

A *Leishmania* é o agente etiológico de várias enfermidades conhecidas como leishmanioses que acometem humanos, animais silvestres e domésticos das regiões quentes e menos desenvolvidas do velho e novo mundo (5). A depender da espécie de *Leishmania*, o indivíduo infectado pode apresentar manifestações cutâneas, mucocutâneas, cutâneas difusas e viscerais (7). A doença em sua forma mais grave recebe a denominação de leishmaniose visceral americana (LVA) onde seu agente etiológico é a *Leishmania chagasi*. O agente foi descrito inicialmente em 1937 (9), como agente protozoário pertencente à família Trypanosomatidae e ao gênero *Leishmania* (10). Esses parasitos apresentam dois hospedeiros durante seu ciclo de vida, sendo um invertebrado, onde o parasita se desenvolve no tubo digestivo e o outro hospedeiro vertebrado, onde o desenvolvimento ocorre nos tecidos (5). No tocante, tais parasitas são dimórficos, apresentando-se na forma amastigota (intracelular em vertebrados) e promastigota (tubo digestivo dos vetores invertebrados) (11).

Transmissão e ciclo evolutivo da *Leishmania*

A leishmaniose é transmitida pela picada dos flebotomíneos fêmeas, dos quais cerca de 30 espécies são encontradas em grande parte do mundo tropical e ao redor do Mediterrâneo (12). São insetos pequenos que pertencem à família *Psychodidae* (13). São conhecidos popularmente no Brasil por diferentes nomes que variam de acordo com a ocorrência geográfica: tatuquilha, mosquito palha, asa dura, birigui (7).

Apenas as fêmeas deste inseto são hematófagas, picam os animais para se alimentarem de seu sangue. A picada do inseto resulta em escarificações da epiderme, seguida de rompimento de capilares (5). Durante o repasto sanguíneo sobre os vertebrados infectados o vetor adquire formas amastigotas do parasita, contidas em macrófagos e monócitos parasitados. No interior do intestino médio rapidamente ocorre a ruptura das células, resultando na liberação das formas amastigotas que, após divisão binária se transformam em promastigotas arredondadas e de flagelo curto, onde nesta formase dividem intensamente, enquanto que a forma alongada de flagelo longo apresenta um processo menos intenso de divisão (14). O sangue que é ingerido juntamente com as formas em divisão passará a se localizar no intestino médio do vetor, abrigados pela matriz peritrófica, permanecendo por até 72 horas (3). Após este tempo a matriz se rompe e as formas promastigotas livres migram ao intestino anterior, onde sofrem um processo de metaciclógênese, onde a forma não infectante adquire virulência. Durante os próximos dias os parasitas migram para a região do esôfago, faringe e válvula estomodeal (3) com isto, após cada repasto sanguíneo ao se fazer esforço, os músculos responsáveis pela sucção relaxam, resultando no refluxo dos parasitas e, conseqüente infecção dos hospedeiros.

Como alternativa de fuga ao sistema imunológico do hospedeiro vertebrado, os parasitas serão fagocitados pelos macrófagos. Internalizados no fagossomo, o parasita se diferencia em amastigota como forma de sua sobrevivência biológica, iniciando um processo de sucessivas divisões binárias (14). O rompimento das células parasitadas promove a saída das formas amastigotas para o espaço intracelular, que serão endocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), podendo cair na corrente sanguínea ou linfática, provocando as lesões características da doença (3,5).

Os cães (*Canis familiares*) são reservatórios naturais participando do ciclo de transmissão e, apresentando alta taxa de infecção (5), tendo sido considerado também como outro reservatório a raposa (*Dusicyonvetulus*) (15).

LEISHMANIOSE

De acordo com Ministério da Saúde (16) as leishmanioses são consideradas primariamente como uma zoonose podendo acometer o homem, quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito. Segundo (17) entre as formas clínicas das Leishmanioses, a Leishmaniose Visceral ou calazar é a forma mais grave, pois quando não tratada adequadamente resulta em elevados índices de letalidades. A doença é de alta letalidade se não tratada e, apresenta aspectos clínicos e epidemiológicos diversos e característicos a cada região de ocorrência (14).

A doença afeta as pessoas mais pobres, estando associados à desnutrição, deslocamento da população ou mesmo sistema imunológico fraco. Apresenta uma estimativa de ocorrência de 500 mil novos casos anualmente (18). Atualmente está presente em quase todo o território brasileiro, e seu controle mostra-se um desafio (19).

No relevante aos aspectos clínicos da doença, as manifestações expressam o desequilíbrio entre a multiplicação dos parasitas nas células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), a resposta imunitária do indivíduo e o processo inflamatório (11). A doença pode ser classificada em três formas de acordo com as manifestações clínicas que causam: 1) forma assintomática, caracterizada em pacientes com sorologia positiva para *Leishmania* ou encontro do parasita nos tecidos, sem manifestação clínica; 2) forma oligossintomática, caracterizada por sorologia positiva, com ocorrência de febre, hepatomegalia e esplenomegalia; 3) forma clássica, quadro de evolução mais prolongado, caracterizado por febre, hepatoesplenomegalia acentuada, micropoliadenopatia e anorexia (7,11,14).

Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico é baseado nos sinais e sintoma e, em parâmetros epidemiológicos. O diagnóstico apenas fundamentado nos sintomas não é confiável, uma vez que a doença poderá ser confundida com outras. A área endêmica também deverá ser considerada no quadro diagnóstico. Diante a semelhança da leishmaniose com outras doenças, deve-se utilizar os métodos clínicos associados aos métodos parasitológicos, sorológico e imunológico (20): *Método Clínico*: baseia-se nos sinais e sintomas e pode ser feito a partir da ocorrência de febre baixa recorrente, anemia e, história de residência em área idêntica (14,20). *Método parasitológico*: baseia-se na observação direta do parasito em culturas do material de punção ou biopsias de órgãos linfóides em meios próprios como Novy, Nicolle & McNeal (NNN), bem como em animais de laboratório como camundongos e hamsters (5,14,20). *Método sorológico e imunológico*: no Brasil o teste mais usado é a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), empregando

promastigotas de *Leishmania* fixos em lâminas. O ensaio imuno-enzimático *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), bem como a Reação de Fixação do Complemento (RFC), também são bastante usados (5,20).

Desde os anos 40 o antimônio pentavalente Glucantime vem sendo usado para o tratamento, mesmo sendo tóxico e não apresentando total certeza de cura para o paciente (21). No Brasil como tratamento alternativo, são usadas anfotericina B e suas formulações lipossomais (20).

ANTÍGENOS RECOMBINANTES

A partir de abordagens moleculares como no rastreamento de bibliotecas de expressão de genes de *Leishmania* com o soro de animais e humanos infectados, houve a identificação de diferentes moléculas antigênicas com potencial ao controle de leishmanioses (22). Algumas dessas moléculas descritas em trabalhos são antígenos protéicos, lipídicos e/ou glicídicos (23) a exemplo destas moléculas, a GP63, onde pesquisas apresentam significativos resultados em animais experimentais (24), a LACK (25) - do inglês *Leishmania* activated C kinase, a LeIF (26), homóloga a proteína ribossomal eucariótica e a proteína específica de amastigota A2 (27). Estas moléculas por apresentarem características particulares são capazes de estimular a resposta imune do hospedeiro (23). No uso dessas moléculas, as estratégias devem ser desenvolvidas para otimizar a seleção de antígenos voltados à prevenção e imunodiagnósticos (27).

A indução para a proteção de sítios múltiplos e distintos nos tecidos (baço, fígado e nódulos linfáticos) envolvidos nos mecanismos de patogenicidade da *Leishmania visceral* (LV) é uma das estratégias para a mudança no paradigma do tratamento de tal doença (28).

Uma vacina que produz proteção em modelos humanos e não humanos contra a LV possui mecanismo de ação que consiste no estímulo da produção de interferon gama (INF- γ). O LeIF é um gene da espécie de *Leishmania* com homologia ribossomal eucariótica eIFF4A, com potente capacidade para desempenhar a produção de INF- γ nos tecidos dos nódulos linfáticos (27).

Os antígenos recombinantes 503 e 648 foram clonados em vetor de expressão pQE-30 e analisadas em gel SDS-PAGE. Através dessa metodologia foram determinados o tamanho e a massa molecular das proteínas, onde ambas possuem 56 e 24 kDa, respectivamente (27).

ESTRATÉGIAS DE INDUÇÃO

A indução é conhecida como o fenômeno, pelo qual a transcrição de genes estruturais de um operon aumenta em resposta a presença de um substrato específico no meio. Isso se deve pelo fato de a síntese de uma proteína requerer grandes quantidades de energia e recursos, tornando inviável para célula a expressão de todos os genes presentes em seu DNA.

Com a aplicação da clonagem gênica à biotecnologia tornou-se possível a produção de proteínas engenheiradas, bem como a obtenção de antígenos de interesse para a farmacobiotecnologia. Quando da manipulação correta das técnicas de clonagem e do sistema de expressão e produção, se estas forem executadas com êxito o resultado será a produção de proteínas de interesse purificadas e em grandes quantidades.

De modo a obter elevadas concentrações dos antígenos recombinantes na forma solúvel e também reduzir custos de produção, as muitas variáveis que influenciam a expressão destas proteínas devem ser entendidas e controladas. Nos bioprocessos envolvendo essas proteínas recombinantes, uma variável importante, especialmente em grande escala, é o indutor utilizado no sistema de expressão. Esses indutores têm um alto impacto nos custos do processo e podem influenciar negativamente o crescimento celular, devido a efeitos tóxicos para as células hospedeiras (29).

A *Escherichia coli*, como hospedeiro heterólogo para produzir antígenos recombinantes, ainda é o sistema de expressão mais utilizado devido ao seu baixo custo e elevado nível de produção. Entre os muitos sistemas de produção disponíveis para expressão heteróloga, a *E. coli* continua a ser um dos mais atraentes devido à sua capacidade de crescer rapidamente e em altas densidades celulares em substratos de baixo custo, a sua genética bem caracterizada e à disponibilidade de um número cada vez maior de vetores de clonagem e novas estirpes (30).

Na regulação gênica em *E. coli* um gene indutível é aquele cuja transcrição é ativada pela adição de um indutor ao meio (31). Os indutores unem-se a sítios específicos que podem estar localizado nas proximidades ao promotor, resultando no favorecimento da transcrição pelo aumento da afinidade da RNA-polimerase (32) dessa forma, tal composto químico também apresenta a capacidade de regular a expressão do gene. Isso pode ser uma vantagem para a produção de proteínas recombinantes (31) uma vez que é possível o controle de sua síntese.

Com base no conhecimento detalhado sobre o *operon lac* de *E. coli* e seu fácil controle por indutores químicos, os sistemas de expressão em bactérias mais comumente utilizados são baseados nesse sistema. O indutor natural do *operon lac* é a

lactose, mas vem sendo utilizados uma variedade de outros indutores para esses sistemas de expressão, sendo o mais comum o isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (8). Essas estruturas são ilustradas na Figura 1. A seguir será feita uma abordagem da utilização dos indutores para produção de proteínas recombinantes.

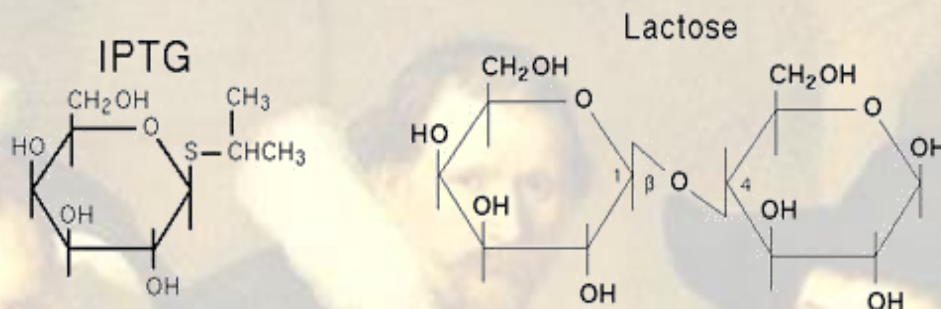


Figura1: Ilustração das estruturas de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e lactose, respectivamente. Adaptado de (33).

Indução por IPTG

O IPTG é um dos indutores dos sistemas de expressão baseados no *operon lac*. Esse indutor liga-se à proteína repressora, LacI, levando a diminuição de sua afinidade pela região promotora do *operon lac*, Figura 2 (8,34). Representa hoje um dos indutores mais utilizados em sistemas de alta expressão, no entanto uma das grandes dificuldades na indução por IPTG é sua alta citotoxicidade, apresentando efeitos negativos no crescimento celular (34).

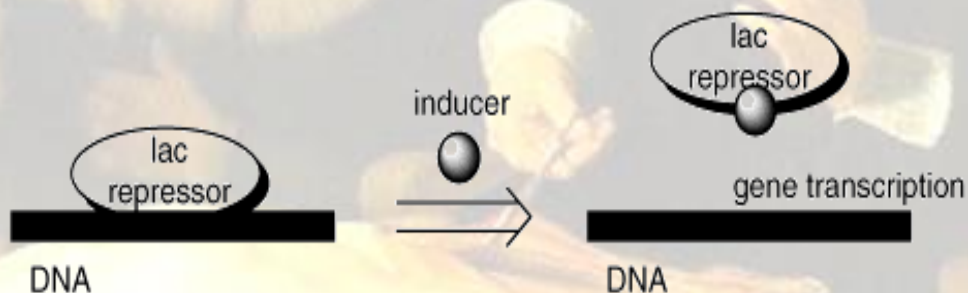


Figura 2: Esquema que ilustra o sistema de expressão baseado no operon lac, onde mostra o indutor ligando-se à proteína repressora, permitindo assim, a indução da transcrição do gene. Adaptado de (35).

A forma de indução por IPTG empregada varia tanto em concentrações do indutor, fase da indução, temperatura e tempo de indução. Sendo que essas condições devem ser testadas e otimizadas, pois dependerão da proteína a ser produzida, da estirpe de *E. coli*, do meio de cultivo, entre outros fatores que são específicos de cada processo.

As condições mais utilizadas para expressão de proteínas recombinantes são uma concentração de 1 mM de IPTG à uma temperatura de 37°C e 6 horas de indução

(30,34). No entanto, tem sido observado em vários trabalhos (29,30,36) que a utilização de menores concentrações de IPTG são capazes de induzir sem impacto negativo na quantidade de proteína produzida.

Conforme estudos realizados (37) existe uma tendência linear de aumento da atividade da enzima β -galactosidase variando a concentração de IPTG até 1,0 mM, para além do qual foi atingido um platô. Esse resultado foi atribuído provavelmente à titulação completa da proteína repressora LacI pelo IPTG, de tal modo que IPTG adicional não aumentaria a transcrição do gene lacZ de forma significativa (36).

Outros autores (29,30) demonstraram que a concentração do indutor pode ser reduzida em 10 vezes, utilizando uma concentração de 0,1 mM de IPTG sem impacto negativo na expressão. Em ensaios para produção de amidase variando-se a concentração de IPTG, foi observada que a máxima atividade da enzima, baseada na concentração da proteína e na biomassa, foi obtida numa concentração de 400 μ M de IPTG (36). A quantidade também pode ser calculada em função da massa seca, sendo a quantidade utilizada de 100 mg de IPTG por grama de massa seca (38).

Essas são observações importantes, considerando que se menores quantidades de indutor puderem ser usadas para obter alta expressão da proteína heteróloga o processo de produção torna-se mais barato. Adicionalmente, é conhecida a influência negativa do IPTG no crescimento celular, o que pode ser minimizado utilizando menores quantidades do indutor (8).

Outro fator a ser analisado é o instante ideal para indução. É consenso que o melhor instante é durante a fase exponencial, considerando que a adição de IPTG ainda na fase lag (3 h de cultivo) inibe o crescimento celular. A indução no início da fase exponencial (5h) é capaz de gerar maiores quantidades da proteína recombinante quando comparada a indução na metade da fase exponencial (8 h) (36). Mesmo tendo sido observado que o efeito negativo nas taxas de crescimento celular é maior quando a adição do IPTG ocorre no início da fase exponencial do que se adicionado apenas ao fim da fase exponencial (39), ainda é preferível a indução no início da fase exponencial pela geração de maior quantidade da proteína recombinante.

Alguns autores (29,30), baseiam-se na densidade ótica a 600 nm (DO_{600nm}) da cultura para determinar o instante da indução, utilizando DO_{600nm} entre 0,65 a 0,85 para indicar o início da fase exponencial e instante ideal para adição do indutor.

Outra variável a ser otimizada é o tempo de indução, sendo encontrados na literatura valores diferentes para esse parâmetro, como 6 horas de indução para as condições mais usuais, 4 horas (29) e 16 horas (30).

Em um trabalho (29) foi observado que temperaturas mais baixas e tempos de indução mais longos aumentaram a produção de PsaA em *E. coli* recombinante. Assim, foram estabelecidas as seguintes condições para indução: 25°C, 0,1 mM de IPTG e 16 horas de indução. Nessas condições, quando comparadas as condições usuais (1 mM de IPTG à 37°C e 6 h de indução), foi obtido um aumento de 5 a 6 vezes na produção da PsaA e uma produtividade de 45 mg.L⁻¹.h⁻¹.

Considerando todo o exposto, observa-se que todas essas condições devem ser otimizadas para cada processo em especial, tendo em vista que as condições ideais variam para cada proteína recombinante a ser produzida.

Embora seja frequentemente argumentado que o custo do IPTG limita a utilidade dos promotores baseados no sistema do *operon lac*, isto é raramente um problema para produtos de alto valor agregado. O problema mais grave que é toxicidade do IPTG pode ser contornado através da utilização de lactose como indutor ou fazendo utilização de variantes termossensíveis do repressor LacI proteínas que permitem a indução térmica da síntese de proteínas recombinantes (40). Assim, os promotores baseados no *operon lac* são ainda o sistema mais utilizado para expressão de proteínas recombinantes.

Indução por Lactose

Um indutor alternativo ao IPTG é a lactose, que inativa o repressor pela ligação de um metabólito da lactose, a alolactose. A indução por lactose apresenta algumas vantagens como o seu menor custo em relação ao IPTG, servir simultaneamente como fonte de carbono e não inibir o crescimento celular.

Entretanto, apesar do menor custo e menor toxicidade, a lactose apresenta uma maior dificuldade quando se pretende estabelecer condições ideais de indução. Isso ocorre justamente pelo fato de ela servir como indutor e como fonte de carbono e energia (34).

Em alguns trabalhos são observadas eficácias de indução semelhantes para lactose e para o IPTG. Porém, devem ser estabelecidas as condições ideais para indução pela lactose. (34).

No trabalho de (41) a partir de colônias isoladas em meio sólido, iniciou o cultivo em meio líquido incubando o durante uma noite a 37° C sob agitação a 200 rpm (em shaker) utilizando uma concentração de lactose no meio de cultura com DO_{600nm} de 0,6 onde foi utilizada a indução por lactose 28 mM, onde testou-se a indução por lactose, analisando o consumo e a expressão de rFPspA1 e observou que o consumo da lactose foi da aproximadamente 45%, podendo ser comparável ao obtido com IPTG.

Pesquisadores (38) utilizaram uma estratégia na qual o cultivo foi dividido em duas fases: uma fase de crescimento e uma fase de indução. Na fase de indução foi adicionada em pulsos no biorreator uma solução na concentração de 370 g/L de lactose. Nesse trabalho foram obtidos menores valores de μ_P , o que pode ser importante para o dobramento correto da proteína na sua estrutura terciária. Além disso, também tem sido demonstrado que o controle da disponibilidade da fonte de carbono é realizado de uma forma natural pelas células, que têm de decompor a lactose, depois de ter absorvido a partir do ambiente extracelular. Enquanto que a utilização de IPTG como indutor exige estratégias específicas de alimentação de glucose. Assim, para a proteína estudada a lactose se mostrou como o indutor mais apropriado.

Na substituição do IPTG pela lactose, que é muito mais barata e natural, é possível obter uma maior produção da proteína rhKGF-2, nesse caso há melhoria substancial na produtividade bacteriana e na solubilidade da proteína alvo (42).

Indução a partir do IBCG

Na tecnologia do DNA recombinante é necessário um sistema de regulação para controlar a expressão de genes exógenos introduzidos, e este requisito é geralmente alcançado por meio de um gene induzível. O Isobutil- β -C-galactosídeo (IBCG) é um dos compostos químicos utilizados nas estratégias de indução. Para comparar a capacidade do C-glicosídeo em relação ao IPTG na indução da expressão de proteínas, tem-se realizado ensaios (35) com proteínas fluorescentes, utilizando GFP (*green fluorescent protein*) como marcador para determinar a atividade de do gene, bem como para estudos em em culturas bacterianas, o EGFP (green fluorescent protein) é particularmente útil, uma vez que é não tóxica para a célula.

Em ensaios em cultura com EGFP os ensaios foram significativos em células induzidas tanto por IBCG quanto por IPTG, ambos a uma concentração final de 5,78 mM (35). Mostrando que após tempos de indução superiores a 4 horas a fluorescência de células com IBCG foi maior.

Indução por TMG

A estabilidade do *operonlac* em *Escherichia coli* tem sido amplamente estudada, onde com base em conhecimentos a cerca do sistema de expressão e de experimentos, é possível a percepção da estabilidade promovida por indutores (8,43). Nesta perspectiva, o metil-1-tio- β -D-galactosídeo (TMG) também é relatado nas estratégias de indução da expressão de proteínas recombinantes.

A resposta da expressão ao TMG tem sido avaliada em populações de *E. coli* marcadas com GFP, submetidas a uma análise de fluorescência. Em experimentos (44) células foram cultivadas em *overnight* em sacarose, com indução de 1 mM de TMG e sem indução, diluídas em meios definidos. Os resultados mostraram que após 20 horas de crescimento, as células induzidas mostraram uma fluorescência 100 vezes maior.

Em estudo realizado para comparar os efeitos do TMG e IPTG, foi demonstrado que ambos são semelhantes, no referente à expressão de proteínas, exceto pela possibilidade do IPTG poder ser utilizado em concentrações dez vezes menores (8). Neste mesmo estudo, os indutores foram adicionados em diferentes concentrações quando o crescimento celular atingiu a fase exponencial.

Analisou-se também o efeito quanto à velocidade de crescimento celular, onde a taxa de crescimento celular de uma estirpe de *E. coli* caiu com o aumento das concentrações de TMG, de 0,53 h⁻¹ com 50 mM de TMG para 0,31 h⁻¹ com 1000 mM de TMG (8), não sendo relatado esse efeito com o IPTG.

CONCLUSÃO

A partir do levantamento bibliográfico realizado, é possível concluir que no processo de produção de antígenos recombinantes muitas vezes o rendimento obtido não é satisfatório, sendo necessária a aplicação de estratégias para sanar este problema. Dessa forma, a utilização de indutores torna-se essencialmente viável, uma vez que este composto é capaz de regular a expressão do gene trabalhado. Foi verificado que vários indutores são utilizados para esta finalidade, dentre eles: o IPTG, Lactose, IBCG e o TMG. Entretanto, o IPTG apresenta-se como o mais utilizado, onde por meio da análise de alguns ensaios descritos na literatura as condições de seu uso nos processos são em uma concentração de 1 mM à uma temperatura de 37°C e 6 horas de indução.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq - Brasil (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de estudo concedida e ao CDSA (Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido) pelo apoio concedido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Villa TCS. Estratégias de pesquisa para o controle de doenças negligenciadas: projetos colaborativos de enfermagem em rede. Rev Latino-Am Enfermagem. 2009;17(4):437-438.

2. Souza V. Doenças negligenciadas. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências; 2010. p. 7.
3. Cabrera MAA. Ciclo enzoótico de transmissão da *Leishmania (Leishmania) chagasi*(Cunha & Chagas, 1937) no ecótopo peridoméstico em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro – RJ: estudo de possíveis variáveis preditoras. [Tese]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz; 1999.
4. Barone AA. Tratamento da leishmaniose visceral. *Rev Med.* 1982;64(1):15-16.
5. De Souza CM. Isolamento, purificação e caracterização de duas proteínas recombinantes de *Leishmania chagasi*, visando à padronização de um ensaio imunodiagnóstico para leishmaniose canina. [Dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Instituto Oswaldo Cruz; 2009.
6. Gontijo C, Melo M. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev bras epidemiol.* 2004;7(3):338-49.
7. Vaz MRF. Influência das condições de cultivo na produção de antígenos recombinantes de *Leishmania i. chagasi* utilizando *Escherichia coli* M15 cultivada em incubador rotativo e biorreator. [Tese]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2011.
8. Marbach A, Bettenbrock K. lac operon induction in *Escherichia coli*: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. *Journal of Biotechnology.* 2012; 57:82-8.
9. Cunha AM, Chagas E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *Leishmania chagasi* sp. nova. Nota prévia. *O Hospital.* 1937;11(2):148-152.
10. Silveira FT, Corbett CEP. *Leishmania chagasi*(Cunha e Chagas, 1937): nativa ou introduzida? Uma breve revisão. *Ver. Pan-Amaz Saúde.* 2010; 1(2):143-147.
11. Ministério da Saúde. Doenças infecciosas e parasitárias: aspectos clínicos, de vigilância epidemiológica e de controle. 2ª ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 1998. p.125-28.
12. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia.* 10ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2012. p. 665-66.
13. Monteiro E, França-Silva J, Costa R, Costa D, Barata R, Paula E et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005;38(2):147-52.
14. Michalick MSM, Gerano O. Leishmaniose visceral americana. In: Neves D, de Melo A, Linardi P, Vitor R. *Parasitologia Humana.* 11ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2005. p. 67-83.
15. Barata R, França-Silva J, Mayrink W, Silva J, Prata A, Lorosa E et al. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005;38(5):421-425.
16. Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle de leishmaniose visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2006.
17. Caldas AJM, Silva DRC, Pereira CCR, Nunes PMS, Silva BP, Silva AAM, et al. Infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em crianças de uma área endêmica de leishmaniose visceral americana na Ilha de São Luiz-MA, Brasil. *Ver. Soc Bras Med Trop.* 2001; 34:445-451.
18. Silva J, Werneck G, Macedo E, Carvalho H, Cruz M. Factors associated with *Leishmaniachagasi* infection in domestic dogs from Teresina, State of Piauí, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012;45(4):480-484.
19. Marcondes M, Rossi C. Leishmaniose visceral no Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.* 2013;50(5):341-52.

20. De Souza MA, de França Nunes RF, da Costa Viana T, de Medeiros Marinho MJ, de Queiroz Moreira PVS, Pereira WO. Leishmaniose visceral humana: do diagnóstico ao tratamento. *Rev. Cien. Saúde Nov. Esp.* 2012; 10(2):61-69.
21. Balanco JMF. Mimetismo apoptótico em *Leishmania* sp: papel na interação parasito/hospedeiro. [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2004.
22. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia molecular da célula*. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2006.
23. Campos RM. Caracterização molecular de antígenos de *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* potencialmente úteis no controle da leishmaniose visceral [Dissertação]. Recife: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ; 2007.
24. Afrin F, Rajesh R, Anam K, Gopinath M, Pal S, Ali N. Characterization of *Leishmaniadonovani* Antigens Encapsulated in Liposomes That Induce Protective Immunity in BALB/c Mice. *Infection and immunity.* 2002; 70(12):6697-6706.
25. Soussi N, Milon G, Colle JH, Mougneau E, Glaichenhaus N, Goossens PL. *Listeria monocytogenes* as a short-lived delivery system for the induction of type 1 cell-mediated immunity against the p36/LACK antigen in *Leishmania major*. *Infection and immunity.* 2000; 68(3):1498–1506.
26. Price VL, Kieny MP. Vaccines for Parasitic Diseases. *Current drug targets.* 2001; 1:315-324.
27. Martins D, Jeronimo S, Donelson J, Wilson M. *Leishmania chagasi* T-Cell Antigens Identified through a Double Library Screen. *Infection and Immunity.* 2006; 74(12):6940-48.
28. Costa M, Andrade H, Bartholomeu D, Freitas L, Pires S, Chapeaurouge A et al. Analysis of *Leishmania chagasi* by 2-D Difference Gel Electrophoresis (2-D DIGE) and Immunoproteomic: Identification of Novel Candidate Antigens for Diagnostic Tests and Vaccine. *J Proteome Res.* 2011;10(5):2172-84.
29. Einsfeldt K, Severo Júnior J, Corrêa Argondizzo A, Medeiros M, Alves T, Almeida R et al. Cloning and expression of protease ClpP from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli*: Study of the influence of kanamycin and IPTG concentration on cell growth, recombinant protein production and plasmid stability. *Vaccine.* 2011; 29(41):7136-43.
30. Larentis A, Argondizzo A, Esteves G, Jessouron E, Galler R, Medeiros M. 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. *Protein Expression and Purification.* 2011; 78:38-47.
31. Brown TA. *Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução*. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2003.
32. Da Silva SC, Schrank IS, de Castro LA. Controle da expressão gênica em procaríotos. In: Zaha A, Ferreira H, Passaglia L. *Biologia Básica molecular*. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2012. p. 277-86.
33. MIT Open Course Ware. Induce protein and evaluate DNA. Module 2 D, 2014.
34. Chaves RVA. Avaliação de dois clones de *Escherichia coli* recombinante quanto ao crescimento e expressão de antígenos de *Leishmania chagasi* (Kmp11 e P36). [Tese]. Natal: Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2009.
35. Ko K, Kruse J, Pohl N. Synthesis of Isobutyl- C -galactoside (IBCG) as an Isopropylthiogalactoside (IPTG): Substitute for Increased Induction of Protein Expression. *Organic Letters.* 2003; 5(10):1781-83.

36. Olaofe O, Burton S, Cowan D, Harrison S. Improving the production of a thermostableamidase through optimising IPTG induction in a highly dense culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering Journal*. 2010; 52(1):19-24.
37. Wood T, Peretti S. Effect of chemically-induced, cloned-gene expression on protein synthesis in *E. Coli*. *Biotechnology and bioengineering*. 1991;38(4):397-412.
38. Kilikian B, Suarez I, Liria C, Gombert A. Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction. *Process Biochemistry*. 2000;35(9):1019-25.
39. Malakar P, Venkatesh K. Effect of substrate and IPTG concentrations on the burden to growth of *Escherichia coli* on glycerol due to the expression of Lac proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011; 93(6):2543-49.
40. Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current opinion in biotechnology*. 1999;10(5):411-21.
41. Silva M. Clonagem, expressão e Purificação das Proteínas de Superfície, PsaA e Fragmentos de PspA de *Streptococcus pneumoniae* [Dissertação]. Universidade de São Paulo, Instituto Butantan; 2005.
42. Tian H, Tang L, Wang Y, Wang X, Guan L, Zhang J et al. Lactose induction increases production of recombinant keratinocyte growth Factor-2 in *Escherichia coli*. *Int J Pept Res Ther*. 2011; 17:123-29.
43. Van Hoek M, Hogeweg P. In silico evolved lac operons exhibit bistability for artificial inducers, but not for lactose. *Biophysical journal*. 2006;91(8): 2833-43.
44. Dreisigmeyer D, Stajic J, Wall M, Nemenman I, Hlavacek W. Determinants of bistability in induction of the *Escherichia coli* lac operon. *IET Systems Biology*. 2008; 2(5):293-303.