

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**Estudo da estabilidade do plasmídeo e da expressão de
jaburetox-2Ec em *Escherichia coli* BL 21 utilizando lactose como
indutor.**

Geizecler Tomazetto

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-graduação em Biologia Celular e
Molecular da UFRGS como requisito
parcial para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Orientador : Dr. Marco Antônio Záchia Ayub
Co-orientadora: Dra. Célia Regina R. S. Carlini

**Porto Alegre
Abril 2006**

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Biotecnologia, do Departamento de Tecnologia de Alimentos, Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos e Laboratório de Proteínas Tóxicas, do Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Centro de Biotecnologia, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, sob a orientação do Dr. Marco Antônio Záchia Ayub e co-orientação: Dra. Célia Regina R. S. Carlini.

Dedico esta dissertação
À minha mamãe, Genisse
À minha irmã, Gabriela.

AGRADECIMENTOS

À minha mamãe, pelo seu amor e dedicação.

À minha irmã pelo seu carinho.

Ao meu orientador, Dr. **Marco Antônio Záchia Ayub**, pela orientação, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha co-orientadora, Dra. **Célia Regina R. S. Carlini**, pela sua receptividade em seu laboratório e oportunidade de aprendizado.

Aos meus colegas do **ICTA** pela receptividade e ajuda.

Aos meus amigos **João, Juliano e Renata**, pela amizade.

À **Deise Caron**, estagiária, pela sua ajuda, dedicação e amizade.

Aos meus **colegas** do **laboratório de Proteínas Tóxicas**, pela amizade e receptividade.

Aos membros da banca examinadora, **Dr. Júlio Xandro Heck, Dra. Marilene Henning Vainstein e Dra. Rosane Rech**.

À **Sílvia** e ao **Luciano**, da Secretária do PPGBCM, pelo carinho e atenção.

Aos professores da comissão de acompanhamento, **Dr. Henrique B. Ferreira e Dr. Jeverson Frazon**.

Ao professor Dr. **Carlos Termignoni**, pela revisão desta dissertação.

Aos **professores** do PPGBCM, pela oportunidade de aprendizado.

Lista de abreviaturas

BCIP	5-bromo-4chloro-3-indolyl-phosphate p-toluidine salt
BT	<i>Bacillus thuringiensis</i>
DAP	Diaminopimelato
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNS	ácido 3,5- dinitrosalicílico
IgG	imunoglobulina G
IPTG	isopropiltiogalactosídeo
kDa	quilo daltons (1 000 daltons)
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
NBT	nitro-blue tetrazolium chloride
pH	potencial hidrogeniônico
PVDF	difluoreto de polivinileno
Rcd	pequenos RNAs reguladores de transcrição
SDS	sódio dodecilsulfato
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
tRNA	ácido ribonucléico transportador
vvm	volume de ar por volume de meio por minuto

ÍNDICE

Resumo	8
Abstract	9
INTRODUÇÃO	10
1 Revisão da Literatura.....	11
1.1 Expressão de proteína recombinante em <i>E. coli</i>	11
1.2 Estratégias para uma eficiente expressão de proteína recombinante em <i>E. coli</i>	13
1.2.1 Linhagens <i>E. coli</i>	14
1.2.2 Promotores.....	17
1.2.3 Número de cópias e estabilidade do plasmídeo.....	19
1.2.4 Condições de cultivo	22
1.2.5 Freqüência de códons.....	25
2 OBJETIVOS	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Plasmídeo e sistema de expressão.....	28
3.2 Análise da substituição do indutor IPTG por lactose.....	30
3.3 Ensaio imunoenzimático – ELISA.....	31
3.4 Western-blot.....	32
3.5 Bioprocessos	33
3.5.1 Inóculo do biorreator	33
3.5.2 Batelada em meio LB.....	33
3.5.3 Batelada em meio mínimo.....	34
3.6 Métodos Analíticos.....	35
3.6.1 Determinação da biomassa.....	35
3.6.2 Estabilidade do plasmídeo.....	36
3.6.3 Determinação de açúcares redutores.....	36

4	RESULTADOS.....	37
4.1	Ensaio imunoenzimático – ELISA.....	37
4.2	Indução da expressão de jaburetox-2Ec realizada por lactose.....	39
4.3	Western-blot.....	42
4.4	Bioprocessos.....	42
4.4.1	Influência do pH sobre a indução e estabilidade do pET101/ <i>jaburetox-2Ec</i>	42
4.4.2	Influência da aeração e agitação sobre a indução e estabilidade do pET101/ <i>jaburetox-2Ec</i>	44
4.4.3	Degradação do jaburetox-2Ec.....	46
4.4.4	Influência da expressão do jaburetox-2Ec sobre a estabilidade do pET101/ <i>jaburetox-2Ec</i>	46
4.4.5	Produção de biomassa.....	48
4.4.6	Açúcares redutores.....	51
4.4.7	Produção de jaburetox-2Ec.....	51
5	DISCUSSÃO.....	53
5.1	Expressão de jaburetox-2Ec sob indução de lactose e determinação a concentração do peptídeo recombinante por ELISA.....	53
5.2	Bioprocessos.....	54
5.3	Açúcares redutores.....	58
5.4	Degradação do jaburetox-2Ec.....	58
5.5	Produção de jaburetox-2Ec.....	59
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	60
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
8	ANEXO.....	69

RESUMO

A seqüência de nucleotídeos codificante do peptídeo derivado da hidrólise da canatoxina (jaburetox-2Ec), foi clonada e expressa nos sistema pET101/*E. coli* BL 21. Neste trabalho, estudamos a estabilidade dos plasmídeos da série pET contendo a seqüência codificante do jaburetox-2Ec no sistema de expressão *E. coli* BL 21 (Mulinari, 2004), e as condições para aumentar produção do peptídeo recombinante, avaliando a velocidade de transferência de oxigênio, o controle do pH, e a utilização da lactose como indutor em substituição ao IPTG. O cultivo da bactéria recombinante em incubadora orbital contendo 10 g/l de lactose como indutor produziu 1,26 µg de jaburetox-2Ec/mg de proteína total após oito horas de cultivo. A estabilidade do plasmídeo e a expressão do peptídeo recombinante foram estudadas em biorreatores. A expressão do jaburetox-2Ec foi fortemente afetada pelo pH da cultura, com a diminuição de mais de 50 % da concentração desse peptídeo quando ocorre acidificação do meio de cultura. Da mesma forma, o aumento da aeração e agitação tem efeito negativo sobre a produção do peptídeo, diminuindo em sete vezes a produção do jaburetox-2Ec. Apesar do aumento da biomassa devido ao cultivo da *E. coli* recombinante em meio mínimo, contendo como fonte de carbono a glicose, isto não representou aumento da concentração do peptídeo recombinante. Contudo, sob a melhor condição de cultivo em biorreator estudada (pH controlado e menor transferência de oxigênio), obteve-se uma produção de 7,14 µg de jaburetox-2Ec/mg de proteína total, representando em torno de 2 % da proteína total da célula. Em todas as bateladas, após atingir a máxima expressão do peptídeo, essa concentração diminui provavelmente devido à atividade das proteases da célula causando a degradação do peptídeo recombinante. A carga metabólica imposta à célula devido à expressão do jaburetox-2Ec, é uma das possíveis causas da instabilidade do plasmídeo observada em todas as bateladas.

Abstract

The sequence of nucleotides encoding the canatoxin-derived-peptide (jaburetox-2Ec), was cloned and expressed in pET101/*E. coli* BL 21 vector system. In this work, we studied the stability of pET101-based plasmids containing the sequence encoding the jaburetox-2Ec in pET101/*E. coli* BI 21 system (Mulinari, 2004), and the conditions for increasing the production of the recombinant peptide regarding oxygen mass transfer rates, pH control, and the use of lactose as inducer instead of IPTG. Bacterial cultivation in shaker with 10 g/l of lactose as inducer produced 1.26 µg of jaburetox-2Ec/mg total protein after eight hours of growth. Plasmid stability and the expression of recombinant peptide were studied in bioreactors. Expression of the jaburetox-2Ec was strongly affected by pH of cultures, with decreases of more than 50 % when acidification was freely allowed. Likewise, the increased aeration and agitation speed had a negative effect on peptide production, which was decreased by a factor of seven times. In spite of increased biomass formation, cultivation of the recombinant *E. coli* in minimum medium, containing glucose as carbon source, did not improve of the concentration this peptide. However, under the best study conditions in bioreactor (controlled pH and low oxygen mass transfer rates), we were able to achieve a total peptide production of 7.14 µg/mg total protein, representing almost 2 % of total cell protein. In all batches, after maximum expression of the peptide its concentration decreased, probably due to cell protease activities causing degradation of the recombinant peptide. The metabolic burden imposed on cells due to expression of the jaburetox-2Ec is probably one of the causes of the plasmid instability observed in this work.

INTRODUÇÃO

As ureases encontradas em bactérias, fungos e plantas são enzimas níquel-dependentes que catalisam a hidrólise da uréia à amônia e carbamato (WANG & TARR, 1955). Em plantas, essas ureases, além de atuarem no metabolismo do nitrogênio, estão envolvidas no mecanismo de defesa da planta (POLACCO & HOLLAND, 1993). Essa defesa em *Canavalia ensiformis* foi identificada e atribuída a uma das isoformas de urease, canatoxina (CNTX), que mesmo tendo a sua atividade ureásica inibida, apresenta toxicidade em algumas ordens de insetos (CARLINI & GUIMARÃES, 1981; FOLLMER *et al.*, 2001).

A canatoxina, quando ingerida por insetos que apresentam digestão baseada em enzimas proteolíticas ácidas do tipo catepsinas, é hidrolisada produzindo vários peptídeos (FERREIRA-DeSILVA *et al.*, 2000). Dentre estes, identificou-se um peptídeo de 10 KDa, denominado jaburetox-2Ec, o qual é responsável pela letalidade aos insetos. A seqüência de nucleotídeos codificante desse peptídeo foi clonada e expressa no sistema pET101/*Escherichia coli* BL 21 (MULINARI, 2004).

STANISÇUASKI *et al* (2005), demonstraram que tanto a ingestão da CNTX quanto do jaburetox-2Ec acarretam a letalidade ao *Dysdercus peruvianus*, praga da cultura do algodão. Nesse estudo os autores ainda observaram que o efeito tóxico gerado era maior e em menor tempo para os insetos alimentados com o peptídeo recombinante. Provavelmente, isso seja devido à eliminação da etapa da ação das enzimas tipo catepsinas sobre a CNTX. Esses resultados demonstram a possibilidade do uso desse peptídeo recombinante como um bioinseticida em alternativa aos insetos não susceptíveis a proteína BT (STANISÇUASKI *et al.*, 2005).

Entretanto, de acordo com os estudos realizados por MULINARI (2004), constatou-se um baixo rendimento da produção do jaburetox-2Ec obtido através do cultivo realizado em incubadoras orbitais. Visando a continuidade dos experimentos em laboratório, entre esses, determinar o mecanismo de ação desse peptídeo recombinante em insetos, faz-se necessário um estudo da expressão desse peptídeo recombinante em biorreatores.

1 Revisão da Literatura

1.1 Expressão de proteína recombinante em *E. coli*

Desde ao advento da tecnologia do DNA recombinante, 1970, um enorme número de diferentes genes têm sido isolados, caracterizados e expressos em células hospedeiras (GLICK & PASTERNAK, 1994; GLICK, 1995).

E. coli foi o primeiro organismo utilizado como célula hospedeira e apesar da variedade de organismos e sistemas de expressão conhecidos para a produção de proteína recombinante, essa bactéria gram negativa ainda é largamente utilizada (SWARTZ, 2001).

Entretanto, *E. coli* possui algumas limitações em seu sistema de expressão incluindo a incapacidade de realizar modificações pós-tradução, comum em eucariotos, ausência de um sistema de secreção para uma eficiente liberação da proteína recombinante para o meio de cultura e limitada capacidade produzir algumas proteínas complexas (proteínas contendo múltiplas pontes de dissulfeto) (DÚLIO *et al.*, 2004). No entanto, proteínas como interferons, interleucinas, hormônio de crescimento, albumina sérica humana, estão entre as proteínas recombinantes expressas com sucesso em *E. coli* recombinante (LEE, 1996).

Contudo, a aplicação industrial de *E. coli* para sintetizar proteínas terapêuticas requer a ausência de proteínas da célula hospedeira para garantir a segurança do produto final (LEE & LEE, 2003). Muitas dessas proteínas são produzidas na forma insolúvel, biologicamente inativadas em corpos de inclusão, sendo que a atividade biológica dessa proteína pode ser reconstituída através de complicados processos adicionais que aumentam os custos e diminuem a produtividade (VILLAVERDE & CARRIÓ, 2003).

Estratégias para prevenir a formação de corpos de inclusão são visadas para reduzir a perda da proteína recombinante, tais como: 1) baixo número de cópias de plasmídeo, 2) promotor fraco, 3) cultivo em baixa

temperatura ou em condições extremas de pH (SCHUMANN & FERREIRA, 2004).

Devido ao rápido crescimento celular, a velocidade de produção de proteínas, combinado com o extenso conhecimento fisiológico e os avanços na manipulação genética, *E. coli* tem sido um sistema de expressão altamente versátil (SWARTZ, 2001). Entretanto, todo esse conhecimento acumulado não irá garantir a eficiente expressão da proteína recombinante em *E. coli*. Não existe, por exemplo, um sistema de expressão eficiente para todas as proteínas recombinantes. Cada proteína apresenta um novo problema, e o alto nível de síntese tem sido otimizado em cada caso através de variações empíricas dos diferentes parâmetros (SCHUMANN & FERREIRA, 2004).

1.2 Estratégias para a uma eficiente expressão de proteína recombinante em *E. coli*

Aproximadamente 80 % das proteínas submetidas ao banco de dados de proteínas (PDB) em 2003 foram expressa no sistema *E. coli* (S↓RENSEN & MORTENSEN, 2005). Entretanto, a eficiência e alto nível de expressão de proteína recombinante em *E. coli* depende de vários fatores, tais como: promotor forte, estabilidade de mRNA e plasmídeo, frequência de códons, acúmulo de biomassa e condição de fermentação, favoráveis para a obtenção de alta produtividade com baixo custo agregado (JANA & DEB, 2005).

Vários estudos sobre sistemas de cultivo celular têm sido publicados, demonstrando que a composição do meio de cultura, condições ambientais como pH, temperatura, aeração e outros parâmetros podem afetar a tradução do mRNA, aumentar atividade proteolítica e níveis de expressão (BIRD *et al.*, 2004; CORISDEO & WANG, 2004), uma vez que a superexpressão de proteínas recombinantes resulta em uma rápida resposta de estresse e mudança no metabolismo de *E. coli* (DONG *et al.*, 1995; RINAS, 1996). Essa resposta celular pode acarretar a instabilidade do plasmídeo, degradação do ribossomo, inibição do crescimento ou lise celular o que pode afetar negativamente a produção da proteína recombinante (BENTLEY *et al.*, 1990; KURLAND & DONG, 1996).

1.2.1 Linhagens *E. coli*

O conhecimento da seqüência do cromossomo de *E. coli* e a variedade de ferramentas genéticas, permitem várias modificações em linhagens dessa bactéria obtendo mutantes com metabolismo diferenciado que favoreçam a expressão de proteína recombinante (SWARTZ, 2001).

A formação de ácido acético, em cultivos de *E. coli*, tem sido freqüentemente discutida na literatura e há um consenso geral em evitar a formação desse metabolito (SANDÉN *et al.*, 2002), uma vez que um dos maiores problemas da expressão em *E. coli* é o acúmulo de acetato ao longo do cultivo o que contribui para a redução da produção da proteína alvo (JANA & DEB, 2005).

Várias estratégias têm sido propostas para reduzir o acúmulo de acetato, tais como: a) cepas mutantes que reduzem a síntese do acetato (ARISTIDOU *et al.*, 1994; SAN *et al.*, 1994), b) uso de ar enriquecido com oxigênio ou oxigênio puro (NEUBAUER *et al.*, 2003), c) uso de substratos alternativos que reduzem a formação de acetato, como glicerol (ANDERSON & VON MEYENBURG, 1980), d) co-expressão de hemoglobina para aumentar a capacidade de oxidação (KALLIO *et al.*, 1994).

FLORES *et al* (1996), inativaram completamente o sistema fosfoenoltransferase (PTS) para evitar a hidrólise do fosfoenolpiruvato por PTS e então direcionar o fluxo da glicose através do transporte galactose permease. Tanto essa modificação genética na cepa ou o que tradicionalmente é realizado, isto é, a diminuição do fluxo de glicose no meio de alimentação, implica na redução do transporte desse açúcar para dentro da célula evitando assim a formação de acetil-CoA.

Entretanto, FARMER & LIAO (1997) reduziram a formação de acetato sem a necessidade da limitação de glicose. A construção de uma linhagem que superexpressa a carboxilase fosfoenolpiruvato, catalisa a conversão direta do fosfoenolpiruvato em oxaloacetato evitando assim a etapa de síntese de acetil-CoA.

Outra interessante manipulação genética em *E. coli* foi descrita por ROWE & SUMMERS (1999). A superexpressão de pequenos RNAs conhecidos como Rcd em mutantes *hns* (linhagens deficientes na expressão de H-NS histona-like) produziu células quiescentes. Após a indução de Rcd, essas

células diminuem significativamente a produção das suas proteínas, mas continua a expressão da proteína recombinante. A capacidade de biosíntese desse sistema é demonstrada através da expressão de cloranfenicol acetiltransferase representar mais de 40% da proteína total. Contudo, ainda não há pesquisa demonstrando a eficiência dessa linhagem em alta densidade celular.

Além disso, a produção de proteínas recombinante por *E. coli* também é reduzida devido à ação de proteases e/ou degradação de RNA mensageiro (mRNA) da proteína recombinante (BIRD *et al.*, 2004; S↓RENSEN & MORTENSEN, 2005). Essa é uma resposta ao estresse gerado pela alta produção de proteína recombinante (RAMIREZ & BENTLEY, 1995). Para contornar esse problema, linhagens deficientes em proteases, como *E. coli* BL 21, comercializada pela Novagen (Brasil), apresenta mutação em ompT e lon, duas proteases que podem interferir na expressão ou na purificação da proteína recombinante (NOVAGEN).

Livros textos freqüentemente descrevem com ênfase a expressão dos genes sob o controle do início da transcrição, o qual é realizado através de proteínas que modulam a atividade da RNA polimerase. Contudo, estudos recentes indicam que a bactéria comumente explora vários mecanismos de regulação pós-transcricionais para coordenar a expressão de seus genes. Entre esses está a estabilidade do RNA mensageiro (mRNA) (WINKLER, 2005).

A rápida degradação dos mRNAs pode comprometer a produção da proteína recombinante (HANNING & MAKRIDES, 1998). A meia-vida dos mRNAs em *E. coli* a 37° C está entre segundos e no máximo 20 minutos

(RAUHUT & KLUG, 1999; REGNIER & ARRAIANO, 2000). A degradação é realizada por RNases, principalmente por duas exonucleases, RNase II e PNPase, e uma endonuclease, RNase E (S↓RENSEN & MORTENSEN, 2005).

Linhagens como *E. coli* BL 21 são mutantes no gene que codifica a RNase E (*rne* 131), ou seja, esses sistemas recombinantes de expressão apresentam uma maior estabilidade do mRNA (LOPEZ *et al.*, 1999) favorecendo a tradução da proteína recombinante.

1.2.2 Promotores

A regulação da expressão gênica requer um sistema de indução ou de repressão, portanto, todos os sistemas de expressão estão sob controle de promotores (SHUMANN & FERREIRA, 2004).

Promotores freqüentemente utilizados em vetores de expressão em *E. coli* devem apresentar algumas características importantes (GOLDSTEIN & DOI, 1995). Primeiro, um promotor forte é caracterizado quando a expressão da proteína recombinante representa 10-30 % da proteína total da célula. Segundo, deve apresentar o mínimo de atividade de transcrição basal. Isso é particularmente importante em casos onde a proteína expressa é tóxica ou interfere no metabolismo celular (HANNING & MAKRIDES, 1998). Além disso, essa baixa atividade do promotor também é solicitada quando há produção de proteína recombinante em larga-escala, onde se explora o crescimento celular para atingir alta densidade celular (JANA & DEB, 2005). A terceira característica

no promotor é a indução ser realizada de forma simples e de baixo custo (HANNING & MAKRIDES, 1998). A indução térmica ou química é largamente utilizada na produção em larga-escala de proteína recombinante. Mas existem alguns promotores sob controle de vários sinais, tais como: pH, concentração de oxigênio, osmolaridade, etc (CHOU *et al.*, 1995; GOLDSTEIN & DOI, 1995).

A indução térmica é baseada na troca de temperatura para que ocorra o início da transcrição da proteína alvo. Entretanto, existem algumas desvantagens nesse sistema. A indução baseada no aumento da temperatura induz uma resposta de heat-shock e concomitantemente a superexpressão de proteases (HANNING & MAKRIDES, 1998) o que diminui a produção da proteína recombinante. Enquanto que a indução realizada pela diminuição da temperatura, o tempo de indução é relativamente curto, 1-2 horas, para acúmulo de proteína recombinante (BANEYX, 1999).

O IPTG (isopropiltiogalactosídeo) é um forte indutor químico utilizado largamente em pesquisa básica (MENZELLA *et al.*, 2003) na indução de promotores *lac*, *tac* e *trc* (MAKRIDES, 1996). Entretanto, estudos demonstram que somente o IPTG (independente da produção de proteína recombinante) pode causar uma resposta de estresse em *E. coli*. Observou-se que há tanto uma diminuição na velocidade de crescimento como uma elevada síntese de proteínas de estresse (KOSINSKI *et al.*, 1992; ADERSSON *et al.*, 1996). E ainda, devido a essa toxicidade do IPTG, o uso desse indutor é indesejável na produção de proteínas recombinantes com finalidade terapêutica ou na produção em larga-

escala devido ao alto custo desse indutor (DONOVAN *et al.*, 1996; GOMBERT & KILIKIAN, 1998).

A lactose pode ser uma alternativa ao IPTG na indução de diferentes proteínas recombinantes (DONOVAN *et al.*, 1996; GOMBERT & KILIKIAN, 1998; SUNITHA *et al.*, 2000). A utilização da lactose como indutor é atrativa principalmente em cultivos realizados em biorreatores, devido ao baixo custo agregado, por não apresentar toxicidade às células e ainda servir como fonte de carbono, diferentemente dos casos onde o IPTG é utilizado (NEUBAUER *et al.*, 1992; KOSINSKI *et al.*, 1992; GOMBERT & KILIKIAN, 1998).

1.2.3 Número de cópias e estabilidade do plasmídeo

O número de cópias do plasmídeo determina a quantidade de genes disponíveis para a expressão, portanto, alto número de cópias do plasmídeo proporciona maior produtividade (JANA & DEB, 2005). Entretanto, essa grande quantidade de plasmídeo impõe uma carga metabólica à célula devido à demanda de replicação, transcrição e tradução do genoma do plasmídeo, levando a instabilidade do mesmo (SUMMERS, 1991; JANA & DEB, 2005).

Um dos principais problemas da aplicação de linhagens recombinantes na produção de proteínas é a instabilidade do plasmídeo durante o cultivo (NAYAK & VYAS, 1999). A desigual distribuição desses plasmídeos para as células filhas durante a divisão celular, resulta no aumento das células sem

plasmídeo (HÄGG *et al.*, 2004). Essas células apresentam uma vantagem na velocidade de crescimento sobre as células com plasmídeo (ENSLEY, 1986; NORDSTROM & AUSTIN;1989). Isso torna o processo dispendioso uma vez que essas células sem plasmídeo consomem substrato e não são células produtoras de proteína recombinante (NAYAK & VYAS, 1999; HÄGG *et al.*, 2004). O cultivo industrial de células recombinantes requer que o plasmídeo seja estável por mais de vinte e cinco gerações (IMANAKA & AIBA, 1981).

Inúmeros estudos experimentais têm demonstrado que a estabilidade do plasmídeo é afetada pelo sistema de segregação (MEACOK & COHEN,1980), meio de cultura (MATSUI *et al.*, 1990), velocidade de crescimento (GUPTA *et al.*, 1995), tamanho do inserto (WARNES & STEPHENSON, 1986), nível da expressão da proteína recombinante (BENTLEY & KOMPALA, 1990; KHALILZADEH *et al.*, 2003), expressão de proteínas tóxicas, células cultivadas em alta densidade celular e em processos contínuos também são fatores que levam a instabilidade do plasmídeo (BANEYX, 1999).

Dois tipos de instabilidade de plasmídeo têm sido caracterizadas. O primeiro tipo, instabilidade de segregação, surge devido ao defectivo sistema de segregação do DNA plasmidial entre as células filhas durante a divisão celular resultando na perda desse plasmídeo para uma das células. O segundo tipo, instabilidade estrutural, é resultado de uma mudança física como a deleção, inserção ou rearranjo do DNA plasmidial (GUPTA *et al.*, 1995).

Para tentar diminuir a instabilidade do plasmídeo é comumente realizada a pressão seletiva através da adição de antibióticos no meio de cultivo

ou o silenciamento de um gene, o qual deve ser um gene que expressa uma proteína ou um aminoácido essencial para o desenvolvimento celular, localizado no cromossomo e cópia desse mesmo gene inserida no plasmídeo recombinante (BANEYX, 1999; HÄGG *et al.*, 2004).

A inserção de alguns genes de resistência a antibióticos no plasmídeo seguido da adição do antibiótico correspondente ao meio de cultivo permite a pressão seletiva das células com plasmídeo (HÄGG *et al.*, 2004). Os antibióticos mais comumente utilizados são ampicilina, canamicina, cloranfenicol e tetraciclina. Contudo, a concentração do antibiótico utilizada na seleção do plasmídeo, freqüentemente diminui ao longo do cultivo devido à degradação enzimática, proporcionando o crescimento das células sem plasmídeo (DEGRYSE, 1991; BALBAS, 2001).

A transferência de um gene essencial do cromossomo da célula hospedeira para o plasmídeo é uma tentativa de condicionar a sobrevivência dessa célula à presença do plasmídeo. Por exemplo, DEGRYSE (1991), descreve um plasmídeo onde o gene de resistência ao antibiótico, ampicilina, foi substituído pelo gene *dapD*, sendo a cópia desse gene silenciada no cromossomo. Esse gene é essencial para a sobrevivência dessa célula hospedeira, uma vez que o diaminopimelato (DAP) é precursor da síntese de lisina. Quando a lisina está presente no meio de cultura, ocorre a síntese das proteínas. No entanto, células *dap⁻* após a divisão celular sofrem lise devido à ausência desse aminoácido na célula (BUKHARI & TAYLOR, 1971). Contudo, a cópia do gene no cromossomo é somente silenciada, por isso, freqüentemente pode haver a reestruturação da

cópia do gene no cromossomo permitindo o desenvolvimento das células sem plasmídeo. Além disso, as células sem plasmídeo podem obter uma fonte de sobrevivência do produto do gene silenciado através da alimentação durante o cultivo, secreção ou lise celular (HÄGG *et al.*, 2004).

1.2.4 Condições de cultivo

Atualmente a maioria das proteínas recombinantes expressas em *E. coli* são consideradas de alto custo e baixa produção. Para alto-volume-baixo-valor do produto, a alta densidade celular juntamente com alta produtividade são essenciais para esse produto ser economicamente viável (SHILOACH & FASS, 2005).

Técnicas de cultura de alta densidade celular têm sido desenvolvidas para melhorar a produtividade, tendo-se inúmeras vantagens na obtenção desse processo, como a redução do volume da cultura, redução no investimento em equipamentos e no valor do produto (LEE, 1996). A obtenção do cultivo de alta densidade celular é iniciada através do estudo em biorreator, o qual pode operar em três diferentes regimes: batelada, batelada alimentada e contínua. O processo de batelada alimentada é freqüentemente o mais utilizado para atingir elevadas concentrações celulares (LEE, 1996).

A composição do meio de cultivo deve ser cuidadosamente formulada e monitorada uma vez que tem significativo impacto metabólico sobre a produção de células e proteína recombinante (JANA & DEB, 2005). Por exemplo,

a tradução de diferentes mRNAs é diferentemente afetada pela temperatura assim como a mudança no meio de cultura (CORISDEO & WANG, 2004).

O meio Luria Bertani (LB), meio complexo composto de peptona, extrato de levedura e cloreto de sódio, comumente utilizado para o cultivo de bactérias em laboratório de pesquisa, desde o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante e produção proteínas recombinantes (LOSEN *et al.*, 2004), não é o meio de cultura adequado para a obtenção de alta densidade celular, uma vez que em condições controladas de temperatura, pH e oxigênio, pode atingir uma densidade celular de 1 g/l (SHILOACH & FASS, 2005). O fator limitante do crescimento celular em meio LB, ou em qualquer meio rico, é a ausência de magnésio na sua composição (STUDIER, 2005).

Para a obtenção de alta densidade celular é necessário o desenvolvimento de meios de cultura que contenham todos os nutrientes necessários para suportar o crescimento celular (LEE, 1996) Entre esses componentes nutricionais requeridos pela bactéria estão fonte de carbono, nitrogênio, fósforo, magnésio, potássio, ferro, manganês, zinco e cobre (GUNSALUS & STANIER, 1960). O meio definido, onde as concentrações dos nutrientes estão estabelecidas e controladas durante o processo, é geralmente utilizado para a obtenção de alta densidade celular (LEE, 1996). RIESENBERG e colaboradores (1991) estabeleceram a concentração máxima de alguns nutrientes presentes no meio de cultivo que a *E. coli* pode suportar. Esses nutrientes e concentrações são: glicose (50 g/l), amônia (3 g/l), ferro (1,15 g/l), magnésio (8,7 g/l), fósforo (10 g/l) e zinco (0,038 g/l).

Além disso, durante a preparação do meio de cultivo ou mesmo durante o cultivo, deve-se evitar a formação de complexos insolúveis, devido a concentrações de vários ânions (fósforo, cloreto) e cátions (magnésio, amônia), o que pode interferir no processo de fermentação (DEAN, 1979).

No entanto, a cultura de alta densidade celular, apesar do alto nível de eficiência na produção de diferentes proteínas e não proteínas como aminoácidos e polihidroxitirato, apresenta vários problemas, como limitação na capacidade de transferência de oxigênio, acúmulo de gás carbônico o qual pode diminuir a velocidade de crescimento e estimular a formação de acetato, redução na eficiência da homogeneização do meio de cultivo e na dissipação do calor (JANA & DEB, 2005; LEE, 1996).

Apesar da importância, as informações sobre o efeito do oxigênio sobre a produção de proteína recombinante por *E. coli* são relativamente escassas (BYLUND *et al.*, 1999 ; De LEÓN *et al.*, 2003; LARA *et al.*, 2005). Contudo, sabe-se que a concentração de oxigênio, a qual é influenciada pela velocidade de agitação e temperatura do meio de cultivo, pode ser um fator limitante na velocidade de crescimento do microrganismo (De LEÓN *et al.*, 2003; MARÉ *et al.*, 2005).

No cultivo de *E. coli* recombinante em condições anaeróbicas ou condições onde a concentração do oxigênio oscila, há uma redução da produção de proteína recombinante (provavelmente devido à redução da produção de aminoácidos), instabilidade do plasmídeo e diminuição da quantidade de RNA quando comparado com condições aeróbicas (NAMDEV *et al.*, 1993; SALMON *et*

al., 2003). A degradação do RNA é também uma estratégia da célula em reduzir o gasto de energia, evitando assim a tradução de proteínas que não serão utilizadas durante o crescimento celular (LARA *et al.*, 2005). Além disso, existe uma relação inversa entre a concentração do oxigênio no meio de cultivo e a formação de acetato. Esse acúmulo de acetato reduz o gradiente eletroquímico em torno da membrana da bactéria, necessário para a síntese de ATP. Conseqüentemente, contribuindo para a inibição do crescimento celular e produção de proteína recombinante (GOMBERT & KILIKIAN, 1998; De LEÓN *et al.*, 2003).

A temperatura é uma importante variável que pode ser utilizada no controle do metabolismo celular. Por exemplo, quando há a diminuição da temperatura no meio de cultivo de 37° C para 26 – 30° C , há uma redução na captação de nutrientes, na velocidade de crescimento do microrganismo, diminuição da formação de metabólitos secundários e redução na demanda de oxigênio (LEE, 1996).

1.2.5 Freqüência de códons

E. coli, e em todas as células , utiliza um conjunto de 61 códons de aminoácidos para a produção de várias moléculas de mRNA. Nesse conjunto há os códons que são freqüentemente expressos, códons principais, e os códons pouco expressos, códons raros (GAO *et al.*, 2004).

Apesar de *E. coli* possuir uma enorme capacidade de produzir grande quantidade de proteínas, no entanto, quando o mRNA é de um gene de

eucarioto ou outro organismo com diferente frequência de códons (KANE, 1995), então, freqüentemente ocorrem problemas na tradução durante a fase de produção, levando a redução na quantidade e qualidade da proteína recombinante (MCNULTY *et al.*, 2003). Entre esses erros de tradução estão: a substituição de aminoácidos, troca de fase de leitura (frameshift) em que um ou alguns pares de nucleotídeos são deletados ou inseridos, ou terminação prematura da tradução (KURLAND & GALLANT, 1996; S↓RENSEN *et al.*, 2003).

Os códons, AGG/AGA, AUA, CUA, CGA e CCC, são encontrados em baixa frequência em *E. coli* e sabe-se que esse grupo de códons geralmente pode ocasionar problemas de erros de tradução (JANA & DEB, 2005).

No entanto, algumas estratégias são utilizadas para evitar os erros de tradução, a redução da quantidade e da qualidade da proteína recombinante. Um dos caminhos é a co-transformação da célula hospedeira com um plasmídeo contendo a seqüência do tRNA do anticódon raro (KANE *et al.*, 1993; CALDERONE *et al.*, 1996). Por exemplo, o códon raro de arginina (AGG/AGA) pode ser um fator limitante na expressão bacteriana para vários genes de mamíferos, porque os códons AGA e AGG não são freqüentes em *E. coli*. A co-expressão do gene *argU* (*dnaY*), o qual codifica o tRNA^{Arg} (AGG), resulta em alto nível de expressão da proteína recombinante (CHEN & INOUE, 1994).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho tem o objetivo de estudar a estabilidade do plasmídeo pET101/*jaburetox-2Ec* em *E. coli* BL 21. Otimizar as condições de cultivo para produção de *jaburetox-2Ec* avaliando parcialmente o impacto da transferência de oxigênio, controle do pH e utilização de lactose como indutor em substituição ao IPTG.

2.2 Objetivos específicos

- I)** Substituir o indutor IPTG por lactose e determinar a melhor concentração desse açúcar para realizar a indução da expressão de *jaburetox-2Ec*.
- II)** Determinar a melhor condição de pH, aeração e agitação para a otimização da produção de *jaburetox-2Ec*.
- III)** Analisar a expressão de *jaburetox-2Ec* e da estabilidade do pET101/*jaburetox-2Ec* ao longo do cultivo.
- IV)** Padronizar o ensaio imunoenzimático (ELISA) para a quantificar a concentração de *jaburetox-2Ec* em extrato celular total.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Plasmídeo e sistema de expressão

A seqüência de nucleotídeos codificante do jaburetox-2Ec foi inserida no sítio de clonagem do vetor pET101 (Invitrogen). O peptídeo recombinante obtido, que tem sua expressão sob o controle do promotor T7, apresenta-se fusionado ao determinante antigênico V5 e uma cauda de histidina. O sistema de expressão utilizado foi preparado através da transformação da *Escherichia coli* BL 21 (Invitrogen) com vetor recombinante pET101/*jaburetox-2Ec* (Figura 1), o qual contém o gene de resistência à ampicilina para a seleção de colônias transformadas (como descrito por MULINARI, 2004). A bactéria recombinante foi cedida gentilmente pela Professora Célia Carlini, Laboratório de Proteínas Tóxicas, Departamento de Biofísica da UFRGS.

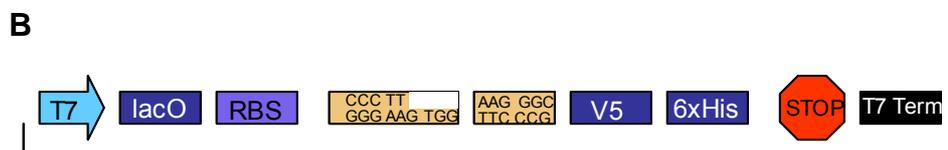
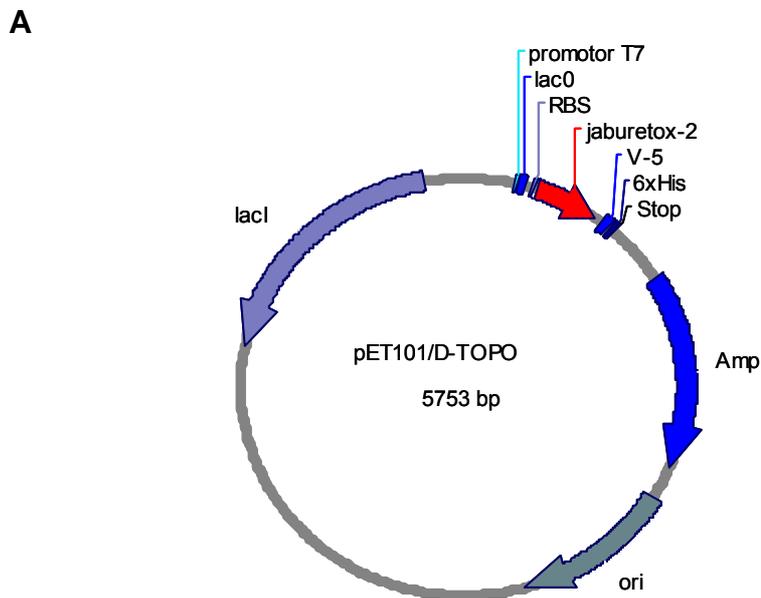


Figura 1: Representação esquemática do vetor pET101/*jaburetox-2Ec*.

A: Representação esquemática do vetor pET 101 (Invitrogen), contendo o inserto *jaburetox-2Ec*. Construção realizada por MULINARI (2004).

B: Detalhe da região compreendida entre os sítios de iniciação e terminação da transcrição.

3.2 Análise da substituição do indutor IPTG por lactose

A substituição do indutor IPTG por lactose foi inicialmente testada através do cultivo da *E. coli* BL 21 em 50 ml de meio LB (10 g/l de peptona, 5 g/l de extrato de levedura, 10 g/l de NaCl e suplementado com 150 µg/ml ampicilina) a 37° C sob 100 rpm de agitação. Esse meio de cultivo foi inoculado com 0,5% (v/v) de um pré-inóculo cultivado sob as mesmas condições. A cultura, após atingir uma densidade ótica (DO₆₀₀) de 0,7 (fase exponencial), adicionou-se a essa 25 ml de meio LB contendo lactose dissolvida. Duas concentrações de lactose, soluções de 10 g/l e 20 g/l (concentração final em 75 ml do meio de cultivo) desse açúcar dissolvido em meio LB, foram avaliadas para identificar qual dessas concentrações induz uma maior expressão de jaburetox-2Ec. A partir da indução, amostras de 10 ml foram retiradas de 2 em 2 horas até o final de oito horas. As amostras foram centrifugadas e o pellet formado foi ressuspensionado em 1 ml tampão de lise (50 mM de fosfato de potássio, 400 mM de NaCl, 100 mM de KCl, 5% de glicerol, 0,5% Triton X-100). A essa solução foram adicionadas pérolas de vidro (diâmetro 0,45-0,5mm) para a realização da ruptura celular através da agitação da mesma em vortex, velocidade máxima, durante 5 minutos. Proteínas totais solúveis, presente no sobrenadante, foram quantificadas pelo método de BRADFORD (1976) e cerca 35 µg dessa proteína contida no extrato celular foram analisados em gel de poli-acrilamida, SDS-PAGE (12,5%), corado com azul brilhante de Coomassie G250. A quantificação da concentração de jaburetox-2Ec foi realizada através do ensaio imunoenzimático (ELISA).

3.3 Ensaio imunoenzimático – ELISA

O ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizado para a quantificação do jaburetox-2Ec foi realizado em microplacas (High Binding), onde foram adicionados 50 µl, em triplicatas, de amostra de extrato celular, tampão de lise, extrato celular de cultura não induzida e diferentes concentrações de jaburetox-2Ec purificado em cromatografia de afinidade por níquel (ácido nitrilotriacético-Níquel – QIAGEN), para a construção de uma curva padrão.

Microplacas de 96 poços contendo as amostras foram incubadas durante 1 h, para a sensibilização das mesmas, em seguida, foram adicionados 100 µl de solução bloqueio (5% de leite em pó desnatado em tampão salina TBS, 0,15 M NaCl, 0,05 M Tris-HCl, pH 7,4) em cada poço. Após o período de 1 hora de bloqueio, essa solução foi removida e adicionados 50 µl de anticorpos primários anti-jaburetox-2Ec (policlonal), diluídos 1: 2 500 em solução TBS contendo 0,5% leite desnatado. Novamente essas microplacas foram incubadas durante 2 horas e posteriormente essa solução foi removida para a adição de anticorpos secundários anti IgG de coelho, o qual apresenta-se conjugado a fosfatase alcalina (Sigma Chem. Co.), diluído 1: 5 000 em solução TBS contendo 0,5% leite desnatado. Todas as etapas acima foram realizadas em temperatura ambiente e a cada adição de uma nova solução, as microplacas foram lavadas 3 vezes com TBS.

Ao término de 2 horas de incubação com o anticorpo secundário, foram adicionados 50 µl de solução de revelação (borato de sódio -

10 mM , $MgCl_2$ - 0,25 mM , pH 9,8) contendo 1 mg/ml de p-nitrofelinfosfato, substrato da fosfatase alcalina. As microplacas foram incubadas a 37° C por no máximo 30 minutos, em seguida a leitura da absorbância foi realizada em Espectramax.

3.4 Western-blot

Cerca de 10 µg de proteína foi submetida a eletroforese de poliacrilamida, SDS-PAGE 12,5%. Após a corrida, um sistema de transferência de proteína por capilaridade foi montado, o qual consiste em : papel de filtro, gel, membrana PVDF (previamente hidratada com metanol 100%), papel de filtro. Terminada a transferência, o gel foi corado com prata e a membrana era bloqueada durante 2 horas com uma solução de TBS contendo 5% de leite em pó desnatado. Ao término de cada etapa a membrana foi lavada três vezes com TBS. Após esse período, novamente a membrana era incubada por 2 horas com anticorpo primário anti-jaburetox-2Ec, diluído 1:2 500 em TBS (v/v) . O anticorpo secundário anti IgG coelho foi adicionado em diluição 1 : 30 000 em solução TBS (v/v). A revelação colorimétrica foi realizada através da adição da solução de revelação (0,2M de Tris-Cl, 0,1 M de NaCl, 2,5mM de MgCl) contendo NBT (nitro-blue tetrazolium chloride) e BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate p-toluidine salt).

3.5 Bioprocessos

3.5.1 Inóculo do biorreator

A partir de uma colônia isolada de *E. coli* BL 21 (pET101/*jaburetox-2Ec*) foi preparado o pré-inóculo em um erlenmeyer (125ml) contendo 25 ml de meio LB (150 µg/ml de ampicilina), cultivado a 37° C sob 100 rpm durante 18 horas. Em seguida, essa cultura foi transferida para um erlenmeyer (500ml) contendo 125 ml de meio LB (150 µg/ml de ampicilina) e cultivada sob as mesmas condições acima até atingir uma DO₆₀₀ igual a 1. Essa cultura foi utilizada como inóculo dos biorreatores.

3.5.2 Batelada em meio LB

Após o preparado do inóculo, como descrito anteriormente, esse foi transferido para um biorreator de 2 L (B.Braun, Germany) contendo um volume inicial de 1350 ml de meio LB (150 µg/ml de ampicilina) a 37° C sob agitação e aeração de 400 rpm e 2 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto), respectivamente.

Para cada condição estudada foram realizados dois experimentos independentes. Na primeira condição analisada, o pH não foi controlado mas monitorado. Enquanto que na segunda condição, o pH foi mantido em 7,0 através da adição de NaOH e/ou H₃PO₄ (10%). De acordo com os resultados da melhor condição de pH para a expressão do peptídeo recombinante, essa condição foi

mantida e aumentava-se a aeração e agitação para 5 vvm e 500 rpm, respectivamente.

Todas as bateladas foram induzidas com lactose (concentração determinada em experimentos anteriores) dissolvida em 500 ml de meio LB (suplementado com 150 µg/ml de ampicilina), quando esse cultivo atingia uma DO_{600} igual a 0,7 (densidade celular igual 0,22 g/l).

3.5.3 Batelada em meio mínimo

Um biorreator de 2 l foi carregado com um volume inicial de 1350 ml de meio mínimo contendo (g/l) : glicose, 10; KH_2PO_4 , 3; NaCl, 0,5; NH_4Cl , 1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5; $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 12,8; peptona, 10; 150 µg/ml ampicilina e 1ml/l de solução de elementos-traços. Essa solução consiste em : 2,8 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 2,8 g $CoSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,5 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,2 g $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ e 0,3 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ por litro de solução de HCl 1 M. A glicose foi esterilizada separadamente e a solução de traços de elementos esterilizada por filtração. A temperatura foi mantida a 37° C, sob 600 rpm e 4 vvm. A melhor condição de pH observada em batelada usando meio LB foi mantida nesse cultivo. Esse cultivo foi induzido com lactose dissolvida em 500 ml de meio mínimo (suplementado com 150 µg/ml de ampicilina), sem glicose, ao entrar na fase estacionária. O pré-inóculo e inóculo para essa batelada foram preparados em meio mínimo, como descrito acima.

Amostras foram retiradas desde o início do cultivo para a análise da estabilidade do plasmídeos, açúcares redutores, biomassa, quantificação de proteínas totais (BRADFORD, 1976) e expressão do jaburetox-2Ec (ELISA).

3.6 Métodos Analíticos

3.6.1 Determinação da biomassa

Ao final do cultivo, 100 ml da cultura (em triplicadas) foram centrifugados e o pellet formado lavado três vezes em tampão PBS (140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄.12 H₂O, 2,7 mM KCl, pH 7,2). Em seguida, os tubos (com a tara previamente determinada) eram levados a estufa de 75° C durante 72 horas. Após esse período os tubos foram pesados até manterem o peso constante. A diferença entre o tubo com células e vazio determinava a concentração celular. Uma amostra também foi retirada para determinar, de acordo com as diluições necessárias, a DO₆₀₀. Uma curva padrão foi gerada entre concentração celular, obtida através do peso seco das células, com a respectiva leituras de DO . Desta forma, a biomassa foi determinada através da DO e convertida em peso seco através da curva padrão.

3.6.2 Estabilidade do plasmídeo

Ao decorrer do cultivo, amostras estéreis foram retiradas e diluídas em PBS. De acordo com a diluição apropriada, essa era semeada sobre placas de meio LB ágar sem e com ampicilina (150 µg/ml) pelo método de espalhamento. Essas placas foram incubadas a 37° C por 24 horas. A estabilidade do plasmídeo foi determinada através da contagem das colônias resistentes ao antibiótico.

3.6.3 Determinação de açúcares redutores

A concentração de açúcares redutores foi determinada no sobrenadante de cada amostra retirada das diferentes bateladas realizadas. 100 µl do sobrenadante foi adicionado a 1 ml do reagente de DNSA (CHAPPLIN & KENNETY, 1994), em seguida, essa solução foi fervida durante 10 min. De acordo com o açúcar a ser determinado, utilizava-se uma solução padrão de lactose ou glicose para a construção de uma curva padrão. A leitura das amostras realizadas em DO₅₇₀.

4 RESULTADOS

4.1 Ensaio imunoenzimático – ELISA

A partir da reação imunoenzimática contendo diferentes concentrações da solução padrão do peptídeo recombinante purificado, obteve-se uma curva padrão entre a concentração do jaburetox-2Ec *versus* absorvância (Figura. 2). Desta forma, foi possível determinar a concentração de jaburetox-2Ec presente no extrato celular dos diferentes cultivos.

O método de ELISA detectou uma concentração mínima de 312 ng/ml de jaburetox-2Ec. O tampão de lise e o extrato celular do cultivo sem a realização da indução foram utilizados como controles negativos para demonstrar que não houve interferência desse tampão no processo ou reação cruzada com as proteínas da *E. coli*. Entretanto, o tampão de lise foi utilizado para zerar o aparelho (branco).

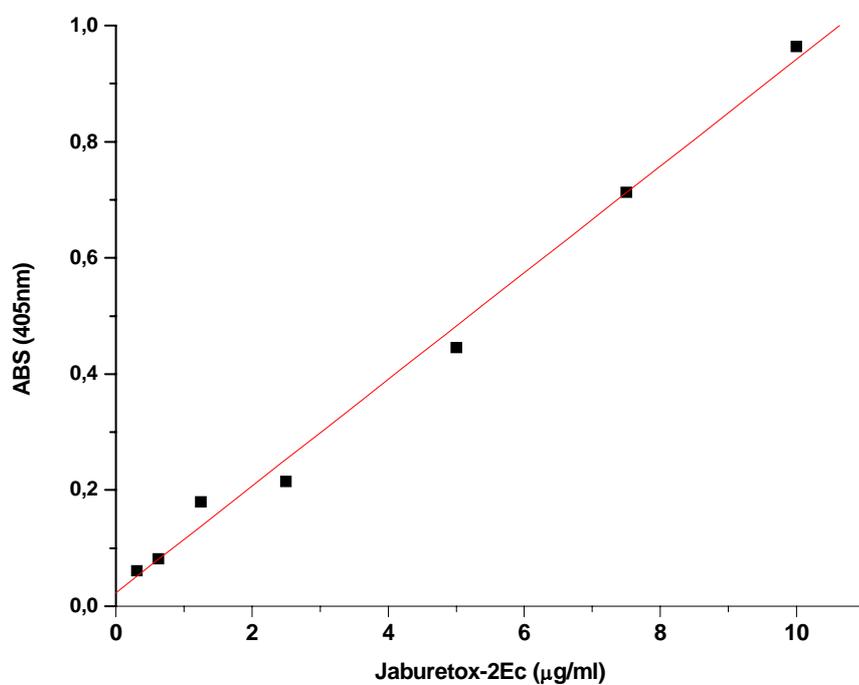


Figura 2. Curva padrão da reação imunoenzimática (ELISA).

ELISA realizado com diferentes concentrações da solução padrão de jaburetox-2Ec. Peptídeo purificado em cromatografia de afinidade por níquel (Ni-NTA).

4.2 Indução da expressão de jaburetox-2Ec realizada por lactose

A figura 3 mostra os resultados das culturas de *E. coli* BL 21, hospedeira do pET101/*jaburetox-2Ec* cultivada em meio LB contendo 10 ou 20 g/l de lactose dissolvida para a realização da indução da expressão de jaburetox-2Ec. As amostras retiradas de 2 em 2 horas eram lisadas e o extrato celular total obtido foi submetido à eletroforese de poliacrilamida 12,5%. Através da análise do gel, observa-se uma banda diferencial no perfil de eletroforese do extrato celular das amostras dos diferentes tempos de indução quando comparado com o extrato celular da cultura não induzida. Essa banda diferencial corresponde a massa molecular do peptídeo recombinante, ~13 kDa, demonstrando que o IPTG pode ser eficientemente substituído por lactose para induzir a expressão de jaburetox-2Ec.

A concentração desse peptídeo recombinante no extrato celular dos cultivos induzidos com 10 e 20 g/l de lactose, foi determinada através do ELISA. De acordo com a figura 4, os resultados demonstram que a produção do jaburetox-2Ec com 10 g/l de lactose atingiu 1,26 µg/mg de proteína total, enquanto que em 20 g/l de lactose o acúmulo desse peptídeo foi de somente 0,76 µg/mg de proteína total. Portanto, 10 g/l de lactose foram suficientes para induzir a expressão do peptídeo recombinante.

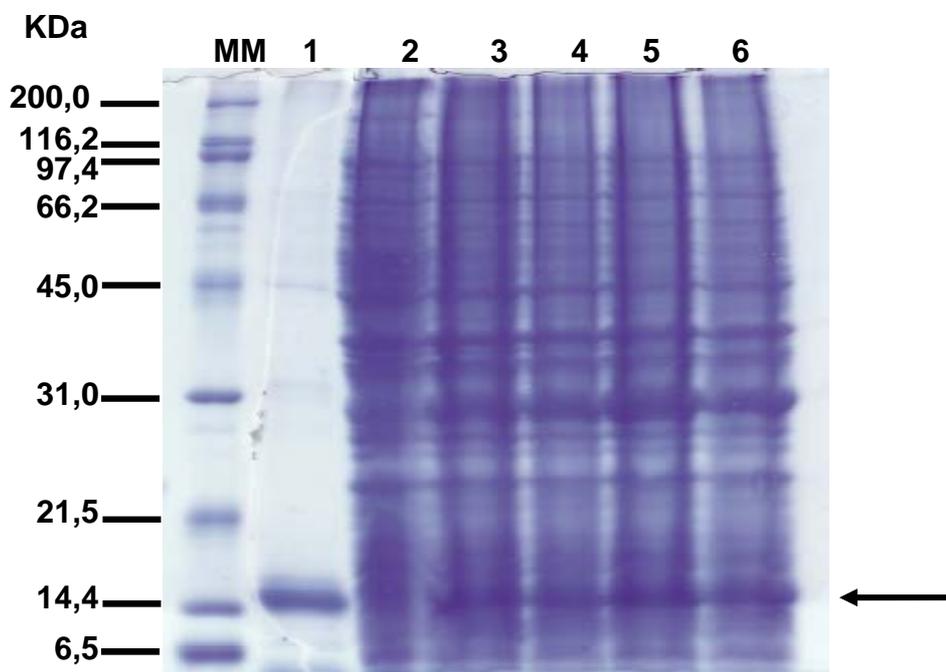


Figura 3. SDS-PAGE para verificação da expressão de jaburetox-2Ec em *E. coli* BL 21, induzida através da adição de lactose.

35 µg de proteína total presente no extrato celular de cada amostra, retiradas do cultivo da *E. coli* BL 21 (pET101/*jaburetox-2Ec*) em incubadora orbital, foram submetidos a SDS-PAGE 12,5% e corado com azul de Coomassie Blue. A seta indica a banda diferencial em relação ao controle negativo, correspondente ao jaburetox-2Ec. O controle negativo, cultivo da *E. coli* (pET101/*jaburetox-2Ec*) sem a realização da indução.

MM : Marcador de massa molecular.

1 : jaburetox-2Ec purificado em resina de níquel.

2 : extrato celular da cultura não induzida com lactose.

3 a 6: extrato celular após 2, 4, 6 e 8 horas de indução com lactose (10 g/l), respectivamente.

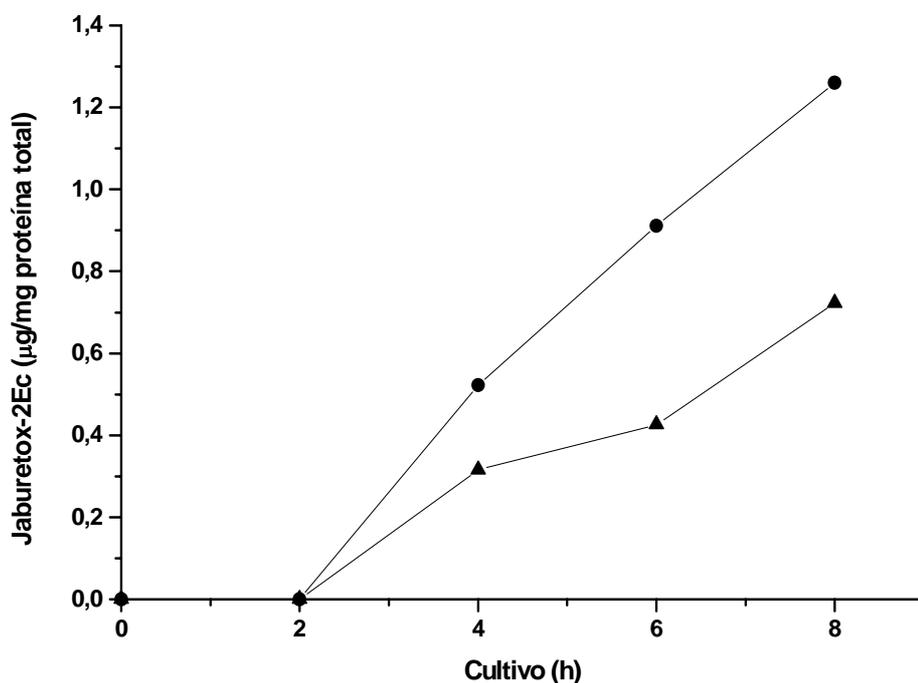


Figura 4. Expressão de jaburetox em *E. coli* BL 21.

Culturas de *E. coli* BL 21 (pET101/*jaburetox-2Ec*) foram induzida com 10 (●) e 20 g/l (▲) de lactose. A partir do extrato celular, obtido das amostras retiradas nos respectivos intervalos de tempo e lisadas com pérolas de vidro em tampão de lise, foi determinada a concentração de jaburetox-2Ec presente nesse extrato através do ELISA. Resultados representam a média de dois experimentos independentes.

4.3 Western-blot

As proteínas do extrato celular, de cada amostra retirada nos respectivos intervalos de tempo do cultivo induzido com lactose, foram submetidas a SDS-PAGE 12,5% e transferidas para membrana PVDF para a realização do Western-blot.

Os anticorpos anti-jaburetox-2Ec, os quais foram obtidos através da imunização de coelho contra o jaburetox-2Ec, foram utilizados no Western-blot para o reconhecimento desse peptídeo recombinante. Observou-se o reconhecimento da banda correspondente ao jaburetox-2Ec, de acordo com o controle, peptídeo purificado (Figura. 5). As bandas visualizadas abaixo da forte banda de jaburetox-2Ec, indicam a degradação desse peptídeo recombinante por proteases da bactéria.

4.4 Bioprocessos

4.4.1 Influência do pH sobre a indução e estabilidade do pET101/jaburetox-2Ec

E. coli BL 21 (pET101/jaburetox-2Ec) foi cultivada em biorreator contendo meio LB, a 37° C sob 400 rpm e 2 vvm, até atingir DO₆₀₀ igual a 0,7 para em seguida realizar a indução com 10 g/l de lactose dissolvida em meio LB, concentração determinada de acordo com os experimentos em incubadora orbital. Sob essas condições, primeiramente, foi analisado o cultivo sem o controle do pH sobre a expressão do jaburetox-2Ec e estabilidade do plasmídeo.

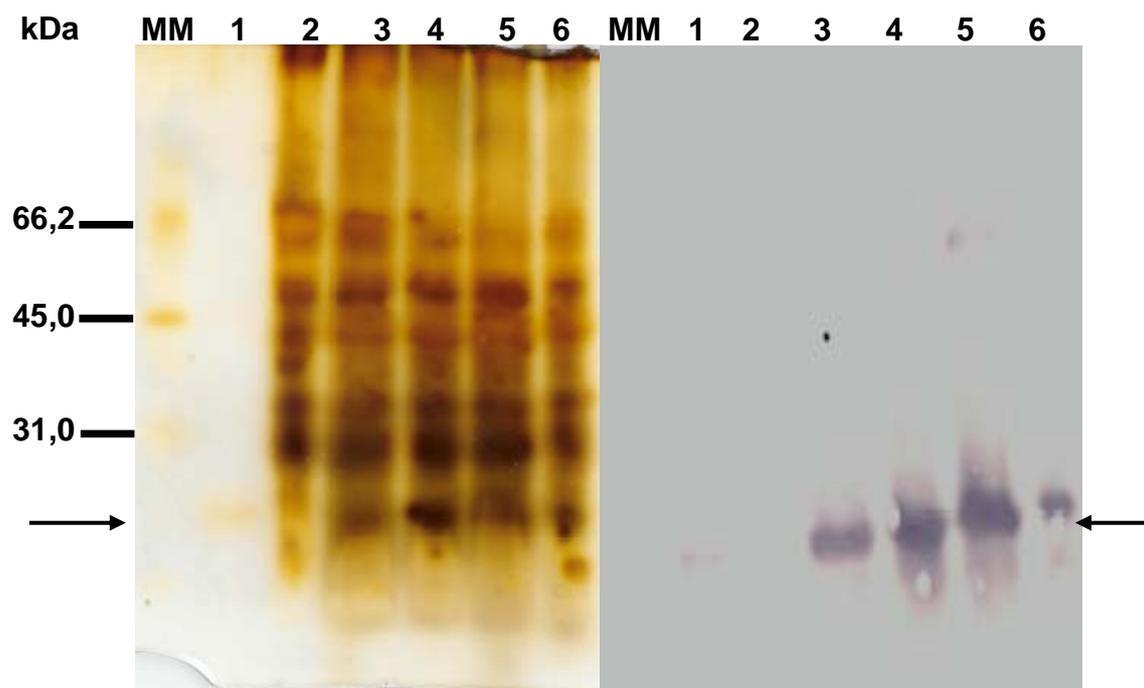


Figura 5. Western-blot do jaburetox-2Ec

10 µg de proteína presente no extrato celular, de cada amostra, foram submetidos a SDS-PAGE 12,5% e transferidos para membrana de PVDF. O gel foi corado com prata, após a transferência. A membrana incubada com anticorpo primário policlonal anti-jaburetox-2Ec, produzidos através da imunização de coelho, em um título de 1: 2 500 e anticorpo secundário anti IgG de coelho, 1: 30 000. Revelação com NBT.

MM : Marcador de massa molecular.

1 : jaburetox-2Ec purificado em resina de níquel.

2 : extrato celular da cultura não induzida com lactose.

3 a 6: extrato celular após 2, 4, 6 e 8 horas de indução com lactose (10 g/l), respectivamente.

Nesse cultivo, a concentração máxima atingida do peptídeo recombinante após 2 horas de indução, foi de 4,74 µg/mg de proteína total (Figura. 6A). Contudo, observa-se que a expressão de jaburetox-2Ec diminui significativamente a estabilidade do pET101/*jaburetox-2Ec*. Isso pode ser visualizado na figura 6A, que demonstra o aumento da concentração de jaburetox-2Ec concomitantemente à acentuada instabilidade do plasmídeo. Enquanto que o cultivo sob o controle do pH (Figura. 6B), mantido em 7,0 através da adição de NaOH/H₃PO₄, a instabilidade do plasmídeo também é observada, entretanto, menos acentuada quando comparada com a condição anterior de pH. Além disso, após 3 horas de indução a concentração de jaburetox-2Ec atinge um valor de 7,15 µg/mg de proteína total, ou seja, aumento em torno de 50% da produção desse peptídeo sob essa condição, pH controlado. Essa diferença da produção de jaburetox-2Ec e estabilidade é devido a acidificação do meio do cultivo sem o controle do pH, o qual ao final do cultivo o pH é igual a 5,2.

4.4.2 Influência da aeração e agitação sobre a indução e estabilidade do pET101/*jaburetox-2Ec*.

Sob a melhor condição de pH, aumentou-se a aeração e agitação para 5 vvm e 500 rpm, respectivamente, com o objetivo de aumentar a disponibilidade de oxigênio no meio de cultivo para estudar a influência desse parâmetro sobre a expressão do peptídeo e estabilidade do plasmídeo.

Entretanto, sob essa condição houve uma diminuição da concentração de jaburetox-2Ec que atinge um valor máximo de 1 µg/mg de proteína total (Figura. 7).

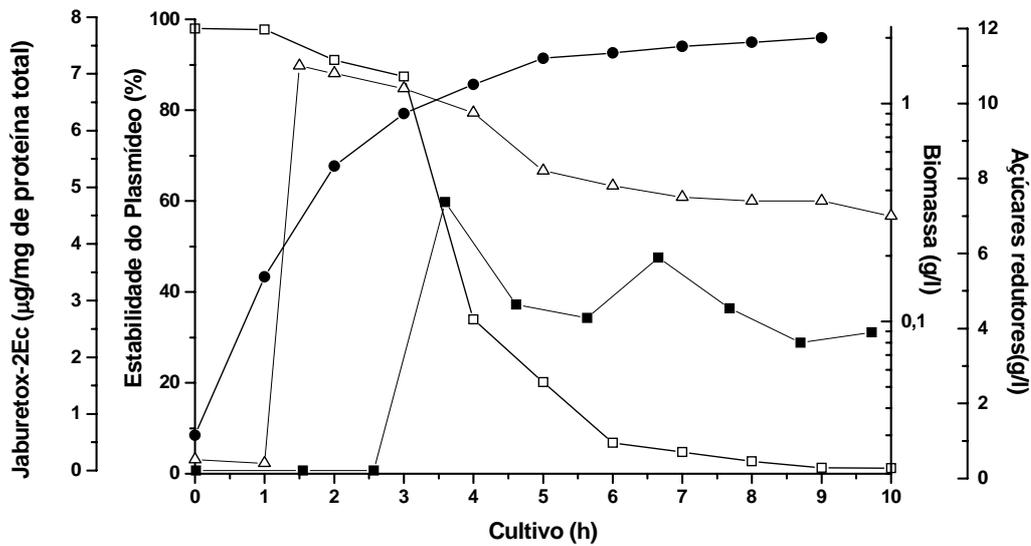
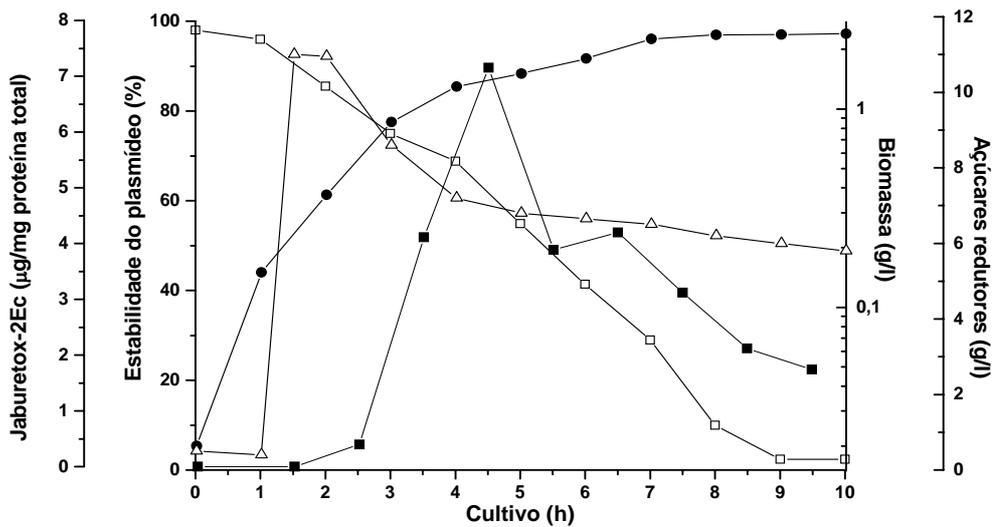
A**B**

Figura 6. Influência do pH sobre *E. coli* BL 21 (pET101/jaburetox-2Ec).

E. coli BL 21 (pET101/jaburetox-2Ec) cultivada em biorreator contendo meio LB a 37° C sob 400 rpm e 2 vvm. Adição de lactose (10 g/l) após 1:30 h de cultivo (A) pH não controlado; (B) pH mantido em 7,0. Biomassa (●), estabilidade do pET101/jaburetox-2Ec (□), jaburetox-2Ec (■) e açúcares redutores (Δ). Resultados representam a média de dois experimentos independentes.

Essa concentração é sete vezes menor quando comparada com a condição anterior, pH mantido em 7, 400 rpm e 2 vvm.

Observou-se também a instabilidade do plasmídeo ao longo do cultivo. Contudo, a estabilidade do plasmídeo está em torno de 80% quando é atingida a máxima concentração de jaburetox-2Ec (Figura. 7). No entanto, isso não significou maior produção de jaburetox-2Ec devido ao maior número de células com plasmídeo. Portanto, o aumento da aeração e agitação diminui a expressão de jaburetox-2Ec.

4.4.3 Degradação do jaburetox-2Ec

Nas três primeiras bateladas, observamos que após a máxima concentração de jaburetox-2Ec ser atingida, essa concentração diminui ao longo do cultivo (Figuras. 6 e 7). Isso ocorre, provavelmente, devido à degradação do peptídeo recombinante por proteases bacterianas. Isso também pode ser observado no Western-blot (Figura. 5), visualizando bandas logo abaixo da forte banda de jaburetox-2Ec.

4.4.4 Influência da expressão do jaburetox-2Ec sobre a estabilidade do pET101/jaburetox-2Ec.

Observamos nas três primeiras bateladas (Figuras. 6 e 7) que ao final de todos esses cultivos, menos de 10% das células contêm o plasmídeo, pET101/jaburetox-2Ec. Provavelmente essa instabilidade do

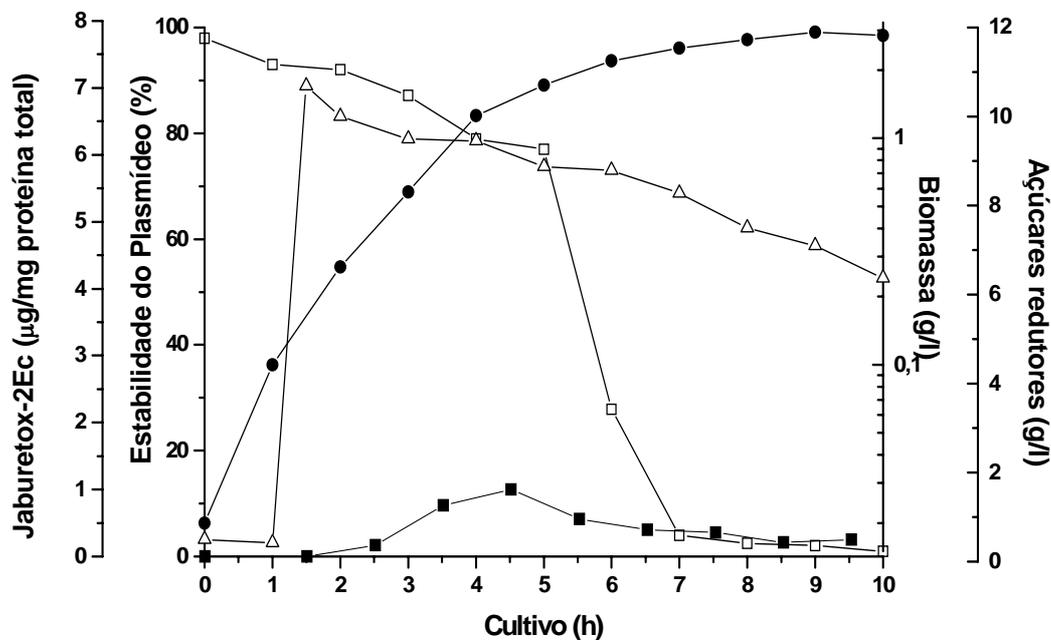


Figura 7. Influência da aeração sobre *E. coli* BL 21 (pET101/*jaburetox-2Ec*).

E. coli BL 21 (pET101/*jaburetox-2Ec*) cultivada em biorreator contendo meio LB a 37° C, pH 7,0, sob 500 rpm e 5 vvm. Adição de lactose (10 g/l) após 1: 30 h de cultivo. Biomassa (●), estabilidade do pET101/*jaburetox-2Ec* (□), *jaburetox-2Ec* (■) e açúcares redutores (Δ). Resultados representam a média de dois experimentos independentes.

plasmídeo observada seja resultado da carga metabólica imposta pela expressão do peptídeo recombinante a célula hospedeira.

Para verificar essa hipótese foi realizada uma batelada sob a melhor condição de expressão: pH 7,0 , 400 rpm e 2 vvm, sem a indução da expressão.

Nesse experimento, cujos resultados são mostrados na figura 8, ao final do cultivo a estabilidade está em torno de 60 %. De acordo com esses resultados, demonstra-se que a expressão do jaburetox-2Ec é uma das causas da instabilidade do pET101/*jaburetox-2Ec* devido à carga imposta pela expressão do jaburetox-2Ec.

4.4.5 Produção de biomassa

A densidade celular nas diferentes bateladas, realizadas em meio LB, permaneceu entre 2 a 2,95 g/l. Com o objetivo de aumentar a produção de biomassa juntamente com a produção de jaburetox-2Ec, *E. coli* (pET101/*jaburetox-2Ec*) foi cultivada em meio mínimo a 37° C , pH 7,0 sob 600 rpm e 4 vvm , contendo 10 g/l de glicose como fonte de carbono.

A densidade celular nesse cultivo atingiu 5 g/l o que representou uma boa conversão, em torno de 50%, da glicose em biomassa (Figura. 9). E diferentemente das bateladas anteriores, em que a indução foi realizada na fase exponencial, nessa batelada a adição de lactose (indutor) foi realizada no início da fase estacionária, uma vez que a concentração celular é maior quando comparada com a fase log.

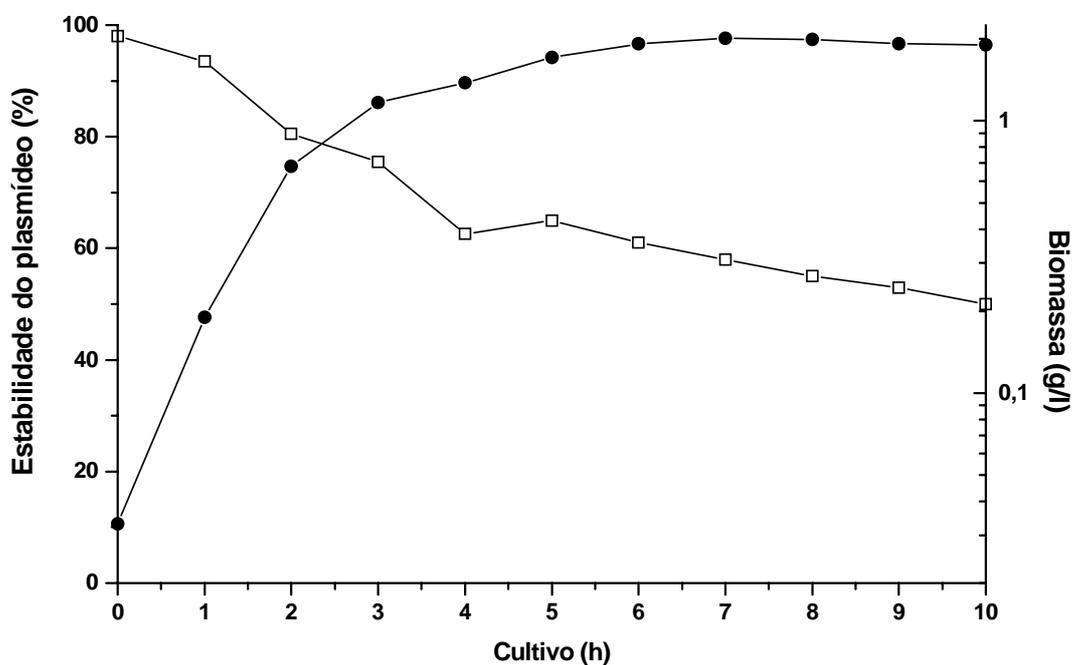


Figura 8. Batelada da *E. coli* (pET101/*jaburetox-2Ec*) sem a adição de lactose como indutor.

E. coli BL 21 (pET101/*jaburetox-2Ec*) cultivada em biorreator contendo meio LB a 37° C, pH 7,0, sob 400 rpm e 2 vvm. Biomassa (●), estabilidade do pET101/*jaburetox-2Ec* (□). Resultados representam a média de dois experimentos independentes.

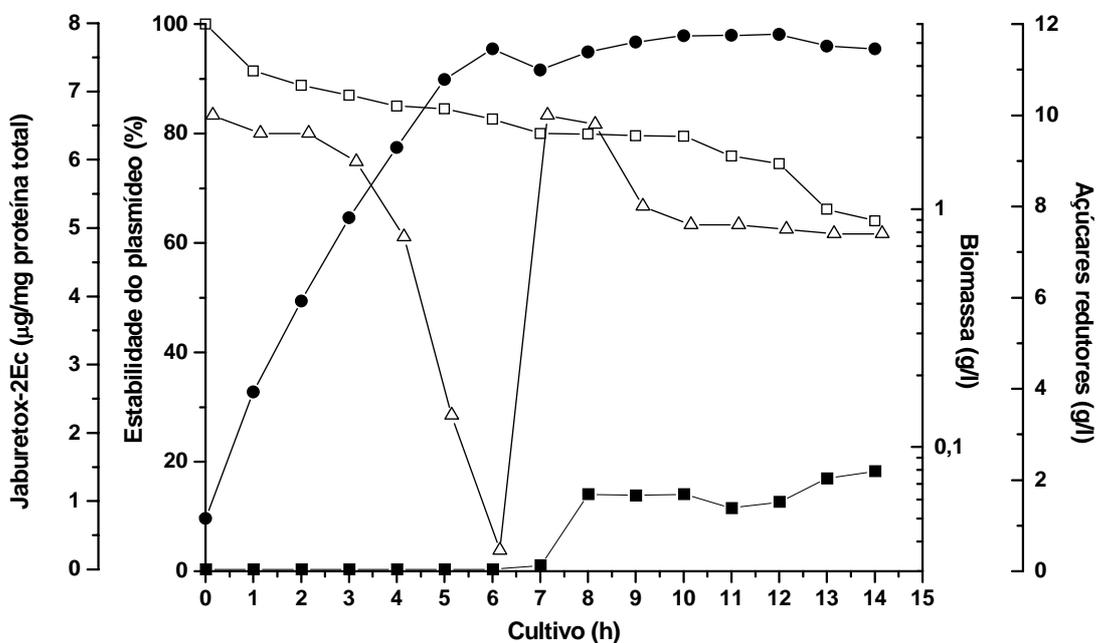


Figura 9. Batelada da *E. coli* (pET101/*jaburetox-2Ec*) em meio mínimo .

E. coli BL 21 (pET101/*jaburetox-2Ec*) cultivada em biorreator contendo meio mínimo, glicose como fonte de carbono, a 37° C, pH 7,0, sob 600 rpm e 4 vvm. Adição de lactose (10 g/l) após 6 h de cultivo. Biomassa (●), estabilidade do pET101/*jaburetox-2Ec* (□), *jaburetox-2Ec* (■) e açúcares redutores (Δ). Resultados representam a média de dois experimentos independentes.

Apesar do aumento da biomassa e maior estabilidade do plasmídeo, a qual ao final do cultivo está em acima de 60%, isso não representou aumento da produção de jaburetox-2Ec. A concentração máxima atingida foi 1,4 μ g/mg de proteína total de jaburetox-2Ec.

De acordo com a figura 9, a concentração de jaburetox-2Ec apesar de aumentar gradativamente, o cultivo foi interrompido devido ao início da lise celular observada no cultivo através da diminuição da DO e aumento da concentração de oxigênio no meio de cultivo, registrado pelo eletrodo de oxigênio. Assim, a continuação desse cultivo não representaria aumento da concentração do peptídeo recombinante.

4.4.6 Açúcares redutores

Em todas as bateladas induzidas com lactose (Figuras. 6, 7 e 9), observa-se que a concentração de açúcares redutores ao final do cultivo permaneceu entre 6 a 8 g/l. Apesar da lactose ser utilizada como um indutor da expressão de jaburetox-2Ec, esse açúcar não foi eficientemente metabolizado pela *E. coli* recombinante.

4.4.7 Produção de jaburetox-2Ec

Comparando a expressão do jaburetox-2Ec nos cultivos em incubadora orbital (Figura. 4) com a realizada em biorreator nas melhores condições (Figura. 6B), a concentração do peptídeo aumenta de 1,26 para 7,15 μ g/mg de proteína total, representando um aumento de seis vezes na produção

de jaburetox-2Ec. A concentração de 7,15 μg de jaburetox /mg de proteína total, representa 1,7 % da proteína total da célula.

5 DISCUSSÃO

5.1 Expressão de jaburetox-2Ec sob indução de lactose e determinação da concentração do peptídeo recombinante por ELISA.

GOMBERT & KILIKIAN (1998) descrevem uma concentração de lactose como indutor da expressão de troponina C entre 20 – 55 g/l e sugerem essa variação de concentração de lactose na indução da expressão de diferentes proteínas recombinantes. Entretanto, de acordo com nossos experimentos, na figura 4, observa-se que 10 g/l de lactose foram suficientes para induzir a expressão de jaburetox-2Ec e acumular quase duas vezes mais peptídeo recombinante quando comparado com a indução realizada com 20 g/l de lactose.

Vários estudos ainda são necessários para determinar a concentração ideal de lactose como indutor, a qual provavelmente mude de acordo com as condições de cultivo (GOMBERT & KILIKIAN, 1998) o que pode ser observado no desenvolvimento desse trabalho.

A quantificação da concentração de jaburetox-2Ec no extrato celular foi realizada através da reação imunoenzimática (ELISA). Contudo, apesar

de não haver outro método para comparar a eficiência na determinação da concentração de jaburetox-2Ec no extrato celular, o ELISA apresentou boa sensibilidade, detectando uma concentração mínima de 312 ng/ml desse peptídeo recombinante em solução padrão (Figura. 2), e especificidade, não sendo detectado reação cruzada com qualquer proteína da *E. coli* (demonstrado através do controle negativo, cultura não induzida) mesmo o anticorpo primário anti-jaburetox-2Ec utilizado nesse método ser um policlonal.

5.2 Bioprocessos

Nos cultivos analisados quanto a influência do pH não houve a mensuração da concentração do ácido acético produzido, no entanto, muito provavelmente a acidificação do meio de cultura (sem o controle do pH, Figura. 6 A) seja devido à produção desse ácido orgânico. Sabe-se que o acúmulo de ácido acético inibe o crescimento de *E. coli* (diminuindo a produção de biomassa) e interfere na biossíntese da proteína recombinante (LULI & STROHL, 1990; De MARÉ *et al.*, 2005). Entretanto, nesses cultivos, sob influência do pH, não houve diferença na produção de biomassa (Figura. 6), no entanto, há uma diminuição da produção de jaburetox-2Ec em 50% e maior instabilidade do plasmídeo na cultura sem controle do pH (Figura. 6A), quando comparada com a cultura sob pH controlado.

Além disso, observa-se que a acidificação do meio de cultura não só interferiu na produção de jaburetox-2Ec, como causou maior instabilidade

do pET101/*jaburetox-2Ec*. Entretanto, GUPTA *et al* (1995) observaram que uma variação de pH entre 5 - 8 não tem efeito sobre a estabilidade do plasmídeo, pCPPS-31, em *E. coli* DH5 α . Em outro estudo, MARMELSTEIN & PAPOUTSAKIS (1993), relatam uma maior estabilidade de plasmídeos em pH ácido em processos com *Clostridium acetobutylicum*.

Nas séries de bateladas realizadas, após estabelecer a melhor condição de pH para expressão de *jaburetox-2Ec* e estabilidade do pET101/*jaburetox-2Ec*, a próximo fator ambiental analisado foi à influência da aeração sobre a cultura de *E. coli* BL 21 (pET101/*jaburetox-2Ec*). Duas condições de agitação e aeração foram testadas : 400 rpm, 2 vvm, e 500 rpm, 5 vvm, respectivamente. E o pH mantido em 7,0 através da adição de NaOH/H₃PO₄. A condição sob maior oxigenação (500 rpm, 5 vvm), a expressão de *jaburetox-2Ec* atingiu um valor de 1 μ g/mg de proteína total (Figura. 7), representando uma redução de sete vezes na produção desse peptídeo quando comparado com a batelada sob 400 rpm e 2 vvm (Figura. 6B). Resultados semelhantes também foram observados na produção de piranose oxidase (P2O) e penicilina acilase (PA) quando ocorreu a limitação de oxigênio no cultivo. Nestes casos a velocidade de crescimento e a produção de biomassa diminuíram, no entanto, observou-se um aumento da atividade dessas enzimas (De LEON *et al.*, 2003; KOTIK *et al.*, 2004). Entretanto, para a expressão de proteína recombinante nenhuma regra pode ser generalizada das informações disponíveis, uma vez que várias proteínas e sistemas de vetor/hospedeiro são descritos com diferentes comportamentos. Por exemplo, a limitação de oxigênio pode ser favorável,

desfavorável, ou não ter efeito sobre a produção de diferentes proteínas recombinantes (QORONFLEH, 1999; CHAO *et al.*, 2001).

De acordo com SHILOACH & FASS (2005), o cultivo de *E. coli* em meio LB sob temperatura, pH, e oxigênio controlado pode atingir uma densidade celular em torno de 1 g/l. Neste trabalho, nas diferentes condições de cultivo, a densidade celular em meio LB permaneceu entre 2 e 3 g/l, representando uma boa otimização do processo. Contudo, para aumentar a produção de biomassa juntamente com a produção de jaburetox-2Ec, *E. coli* BL 21 (pET101/*jaburetox-2Ec*) foi cultivada em meio mínimo contendo glicose como fonte de carbono. Nesse experimento, ao contrário das três diferentes bateladas em meio LB induzida na fase log, a indução dessa batelada foi baseada na estratégia de OU *et al* (2004), que descrevem a indução realizada com lactose na fase estacionária, ser uma estratégia mais eficaz na produção de proteína recombinante.

De acordo com resultados demonstrados na figura 9, a densidade celular atinge 5,2 g/l, isso representou 50 % da glicose convertida em biomassa, no entanto, o aumento dessa biomassa não representou um aumento da produção de jaburetox-2Ec, a qual atinge uma concentração máxima de 1,4 µg/mg de proteína total. Além disso, observamos que após 14 horas de cultivo, mais de 60 % das células ainda mantinham o pET101/*jaburetox-2Ec*. Observa-se que em meio mínimo a velocidade de crescimento da *E. coli* BL 21 recombinante ($\mu = 0,22 \text{ h}^{-1}$) é menor quando comparada com a velocidade de crescimento em meio LB ($\mu = 0,67 - 0,84 \text{ h}^{-1}$), o que corrobora os resultados observados por GUPTA *et al* (1995), os quais relatam que a alta estabilidade do plasmídeo em meio mínimo seja devido à ausência de uma vantagem da velocidade de

crescimento das células sem plasmídeo sobre as células com plasmídeo ou a velocidade de replicação do plasmídeo estar sincronizada com a velocidade de replicação do hospedeiro.

A instabilidade do pET101/*jaburetox-2Ec* é principalmente observada em meio LB após a indução da expressão de *jaburetox-2Ec*. Uma das causas dessa instabilidade, de acordo com GUPTA *et al* (1995), é devido à complexidade do meio de cultivo, uma vez que a velocidade de crescimento da *E. coli* é maior em meio LB quando comparada com a velocidade de crescimento em meio mínimo. Outro fator que contribuiu para a maior instabilidade do pET101/*jaburetox-2Ec*, foi a expressão de *jaburetox-2Ec*. Observamos na figura 8, batelada sem a indução sob a melhor condição de expressão (pH mantido em 7,0 , 400 rpm, 2 vvm), que após 10 horas de cultivo, em torno 50% das células ainda mantinham o plasmídeo. Quando essa estabilidade é comparada a estabilidade das bateladas induzidas, ao final do mesmo tempo de cultivo, esta está próxima de 5%, demonstrando que a expressão do peptídeo recombinante impõe uma carga fisiológica a célula, sendo uma das causas da instabilidade do plasmídeo.

SUNITHA *et al* (2000), descrevem resultados similares, que a estabilidade do plasmídeo diminui com o aumento da atividade de fitase após a indução, e concluem que o curto período de expressão para alta produtividade da proteína é necessário devido à instabilidade do plasmídeo ao longo período de cultivo.

5.3 Açúcares redutores

Sabe-se que para realizar a indução com lactose, deve-se considerar 2 concentrações: uma alta concentração que pode inibir o início da transcrição (repressão do promotor T7 devido ao excesso de glicose liberada da hidrólise da lactose) e uma concentração mínima capaz de iniciar a transcrição (GOMBERT & KILIKIAN, 1998; LIM *et al.*, 2004). Observamos ao final de todas as bateladas induzidas uma concentração residual de lactose. Essa concentração residual de lactose parece ter importante função no processo de indução (GOMBERT & KILIKIAN, 1998; KOTIK *et al.*, 2004). Entretanto, MENZELLA *et al* (2003), introduziram 2 modificações genéticas em *E. coli* BL 21, para permitir a essa nova cepa uma eficiente utilização da lactose como indutor e fonte de carbono. Essa completa metabolização da lactose resultou em um aumento da velocidade de síntese de produção e concentração de proquimosina.

5.4 Degradação do jaburetox-2Ec

Apesar da *E. coli* BL 21 ser descrita como mutante em *ompT* e *lon*, principais proteases que podem degradar a proteína recombinante, diminuindo a produção dessa proteína alvo (NOVAGEN). Observa-se que nas diferentes bateladas realizadas para expressar jaburetox-2Ec, após atingir a máxima concentração desse peptídeo recombinante, essa concentração reduz ao longo do cultivo devido à degradação desse peptídeo por proteases. Essa

degradação de jaburetox-2Ec também pode ser observada no Western-blot (Figura. 5), visualizando as pequenas bandas abaixo da forte banda de reconhecimento do jaburetox-2Ec. Provavelmente essa degradação seja devido à rápida e maciça expressão de proteína recombinante impor uma carga fisiológica à célula hospedeira, o que causa um aumento da síntese de proteases com o intuito de liberar os aminoácidos dessa proteína recombinante para serem incorporados em proteínas essenciais (HARCUM & BENTLEY, 1993; RAMCHURAN *et al.*, 2002).

5.5 Produção de jaburetox-2Ec

Sob melhor condição de cultivo analisada em biorreator (Figura. 6B), obteve-se um aumento de seis vezes na produção desse peptídeo recombinante quando comparada à produção obtida em incubadora orbital. Essa otimização da produção de jaburetox-2Ec foi realizada utilizando lactose como indutor, açúcar de baixo custo, sendo uma alternativa ao IPTG, um indutor de custo elevado que torna a produção de proteínas recombinantes mesmo em média escala dispendioso. Desta forma, observamos que a lactose é um indutor eficiente do promotor T7 para a obtenção de uma considerável quantidade de jaburetox-2Ec, necessária para prosseguir os estudos de bioensaios com insetos, determinando o mecanismo de ação e da aplicação desse peptídeo recombinante como um bioinseticida.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A lactose pode ser utilizada eficientemente como indutor da expressão de jaburetox-2Ec em *E. coli* BL 21 (pET101/*jaburetox-2Ec*) em substituição ao IPTG.

Em todas as bateladas a concentração de jaburetox-2Ec após atingir a máxima concentração diminui ao longo do cultivo, devido à ação de proteases da célula sobre o peptídeo recombinante.

Uma das causas da instabilidade do pET101/*jaburetox-2Ec* é o fato de que a expressão de jaburetox-2Ec impõe uma carga fisiológica a célula.

Os resultados observados sugerem que o sistema pET101/*E. coli* BL 21 não é o mais adequado para futura aplicação comercial da produção de jaburetox-2Ec, sendo necessário mais estudos, como a reclonagem da seqüência codificante desse peptídeo recombinante em outro sistema de expressão ou otimizar a produção diminuindo a degradação do jaburetox-2Ec, visando à produção biotecnologia desse bioinseticida.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, K. B. & VON MEYENBURG, K. Are growth rates of *Escherichia coli* in batch cultures limited by respiration? *J. Bacteriology*. 144 : 114-123, **1980**.

ANDERSSON, A.; YANG, S.; NEUBAUER, P. & ENFORS, SO. Impact of plasmid presence and induction on cellular responses in fed batch cultures of *Escherichia coli*. *J. Biotechnology*. 46 : 255-263, **1996**.

ARISTIDOU, A. A.; SAN, KY. & BENNETT, G.N. Modification of central metabolic pathway in *Escherichia coli* to reduce acetate accumulation by heterologous expression of the *Bacillus subtilis* acetolactate synthase gene. *Biotechnology and Bioengineering*. 44: 944-951, **1994**.

BALBAS, P. Understanding the art of producing protein and nonprotein molecules in *Escherichia coli*. *Molecular Biotechnology*. 19 : 251-267, **2001**.

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

BENTLEY, W. E.; MIRJALILI, N. ; ANDERSON, D. C. ; DAVIS, R. H. & KOMPALA, D. S. Plasmid-encoded protein: the principal factor in the “metabolic burden” associated with recombinant bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*. 35:668–681. **1990**.

BENTLEY, W.E. & KOMPALA, D.S. Stability in continuous culture in recombinant bacteria: a metabolic approach. *Biotechnology Letters*. 12: 329-334, **1990**.

BIRD, P.I.; PAK, S.C.L.; WORRALL, D.M. & BOTTOMLEY, S.P. Production of recombinant serpins in *Escherichia coli*. *Methods*. 32: 169-176, **2004**.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72 : 248-254, **1976**.

BUKHARI, A. I. & TAYLOR, A. L. Genetic analysis of diamonopimelic acid and lysine-requiring mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriology*. 105: 844-854, **1971**.

BYULEND, F.; GUILARD, F.; ENFORS, S.; TRÄGARDH, C. & LARSSON G. Scale down of recombinant protein production: A comparative study of scaling performance. *Bioprocess Eng*. 18: 377-389, **1999**.

CALDERONE, T. L.; STEVENS, R. D.; OAS, T. G. High-level misincorporation of lysine for arginine at AGA codons in a fusion protein expressed in *Escherichia coli*. *J. Molecular Biology*. 262 : 407-412, **1996**.

CARLINI, C.R. & GUIMARÃES, J. A. Isolation and characterization of a toxic protein from *canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. *Toxicon*. 19: 667-676, **1981**.

CHAO, Y.P.; WEN, C.S.; CHIANG, C.J. & WANG, J.J. Construction of the expression vector based on the growth phase- and growth rate-dependent *rmf* promoter : use of cell growth rate to control the expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*. 23: 5-11, **2001**.

CHAPLIN, M. & KENNETY, J. F. Carbohydrate analysis: a practical approach. 2 ed. **1994**.

CHEN, G. F. T. & INOUE, M. Role of the AGA/AGG codons, the rarest codons in global gene expression in *Escherichia coli*. *Genes Dev*. 8: 2641-2652, **1994**.

CHOU, CH. ; ARISTIDOU, A. A.; MENG, S. Y.; BENNETT, G. N. & SAN, K. Y. Characterization of a pH-inducible promoter system for high-level expression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 47 : 186-192, **1995**.

CORISDEO, S. & WANG, B. B. Functional expression and display of an antibody Fab fragment in *Escherichia coli*: study of vector designs and culture conditions. *Protein Expression and Purification*. 34 : 270-279, **2004**.

DE LÉON, A.; HERNANDEZ, V.; GALINDO. & RAMIREZ, O.T. Effects of dissolved oxygen tension on the production of recombinant penicillin acylase in *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*. 33: 689-697, **2003**.

De MARÉ, L.; VELUT, S.; LEDUNG, E.; CIMANDER, C.; NORRMAN, B.; KARLSSON, E.N.; HOLST, O. & HAGANDER, P. A cultivation technique for *E. coli* fed-batch cultivations operating close to the maximum oxygen transfer capacity of the reactor. *Biotechnology Letters*. 27: 983-990, **2005**.

DEAN, J.A. Lang's handbook of chemistry. 12 th ed. New York: McGraw-Hill. **1979**.

DEGRYSE, E. Stability of a host-vector system based on complementation of an essential gene in *Escherichia coli*. *J. Biotechnology*. 18 :29-40, **1991**.

DONG, H.; NILSSON, L. & KURLAND, C. G. Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *J. Bacteriology*. 177:1497-1504, **1995**.

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

DUILIO, A.; TUTINO, M. I.; MARINO, G. Recombinant protein production in Antarctic gram-negative bacteria. *Methods Mol Biol.* 267 : 225-238, **2004**.

ENSLEY, B. D. Stability of recombinant plasmids in industrial micro-organisms. *Critical Reviews in Biotechnology.* 4 : 263-277, **1986**.

FARMER, W.R. & LIAO, JC. Reduction of aerobic acetate production by *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology.* 63: 3205-3210, **1997**.

FERREIRA-DASILVA, C.T.; GOMBAROVITS, M. E. C.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, C. M. & CARLINI, C. R. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 44 (4) : 162-171, **2000**.

FLORES, N.; XIAO, J.; BERRY, A.; BOLIVAR, F. & VALLE, F. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnology.* 14: 620-623, **1996**.

FOLLMER, C.; BARCELLOS, G. B. S.; ZINGALI, R. B.; MACHADO, O. L. T.; ALVES, E. W.; BARJA-FIDALGO, C.; GUIMARÃES, J. A. & CARLINI, C. R. Canatoxin, a toxic protein of jackbeans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5). Biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochemical J.* 360: 217-224, **2001**.

GAO, W.; RZEWSKI, A.; SUN, H.; ROBBINS, P. D. & GAMBOTTO, A. UpGene: application of a Web-based DNA codon optimization algorithm. *Biotechnology Prog.* 20 : 443-448, **2004**.

GLICK, B. R. Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnology Advances.* 13, 247-261, **1995**.

GLICK, B.R. & PASTERNAK, J.J. Molecular Biotechnology: Principles and Applications of recombinant DNA. American Society for Microbiology, Washington, **1994**.

GOLDSTEIN, M.A. & DOI, R.H. Prokaryotic promoters in biotechnology. *Biotechnology Annu Rev.* 1: 105-128, **1995**.

GOMBERT, A. K. & KILIKIAN, B.V. Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer. *J. Biotechnology.* 60: 47-50, **1998**.

GUNSALUS, I.C. & STANIER, R.Y. The bacteria. New York: Academic Press. 14-16, **1960**.

GUPTA, R.; SHARMA, P. & VYAS, V.V. Effect of growth environment on stability of recombinant shuttle plasmid, pCPPS-31, in *Escherichia coli*. *J. Biotechnology.* 41: 29-37, **1995**.

HÄGG, P.; DePOHL, J.W.; ABDULKARIM, F. & ISAKSSON, L.A. A host/plasmid system that is not dependent on antibiotics and antibiotic resistance genes for stable plasmid maintenance in *Escherichia coli*. *J. Biotechnology*. 111: 17-30, **2004**.

HANNING, G. & MAKRIDES, S.C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnology*. 16 : 54-60, **1998**.

HARCUM, S.W. & BENTLEY, W.E. Response dynamics of 26-, 34-, 39-, 54-, 80-kDa protease in induced cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 42: 675-685, **1993**.

IMANAKA, T. & AIBA, S. A perspective on the application of genetic engineering stability of recombinant in chemostat culture. *Ann. NY Acad. Sci.* 389 : 1-14, **1981**.

JANA, S. & DEB, J.K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol Biotechnol*. 67: 289-298, **2005**.

KALLIO, P. T.; KIM, D. J.; TSAI, P. S. & BAILEY, J. E. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin alters *Escherichia coli* energy metabolism under oxygen-limited conditions. *Eur. J. Biochemical*. 219: 201-208, **1994**.

KANE, J. F. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*. 6 : 494-500, **1995**.

KANE, J. F.; VIOLAND, B.N.; CURRAN, D. F.; STATEN, N. R. DUFFIN, K. L. & BOGOSIAN, G. Novel in-frame two codon translational hop during synthesis of bovine placental lactogen in a recombinant strain of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 20 : 6707-6712, **1993**.

KHALILZADEH, R.; SHOJAOSADATI, S.A.; BAHRAMI, A. & MAGHSOUDI, N. Over-expression of recombinant human interferon-gamma in high cell density fermentation of *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*. 25 : 1989-1992, **2003**.

KOSINSKI, M. J.; RINAS, U. & BAILEY, J. Isopropyl- β -thiogalactopyranoside influences the metabolism of *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 36 : 782-784, **1992**.

KOTIK, M.; KOCANOVÁ, M.; MARESOVÁ, H. & KYSLIK, P. High-level expression of a fungal pyranose oxidase in high cell-density fed-batch cultivations of *Escherichia coli* using lactose as inducer. *Protein Expression and Purification*. 36: 61-69, **2004**.

KURLAND, C. & GALLANT, J. Errors of heterologous protein expression. *Current Opinion Biotechnology*. 7 : 489-493, **1996**.

KURLAND, C. G. & DONG. Bacterial growth inhibition by overproduction of protein. *Mol. Microbiol.* 21: 1-14, **1996**.

LARA, A. R.; LEAL, L.; FLORES, N.; GOSSET, G.; BOLIVAR, F. & RAMIREZ, O. T. Transcriptional and metabolic response of recombinant *Escherichia coli* to spatial dissolved oxygen tension gradients simulated in scale-down system. *Biotechnology and Bioengineering.* 20: 1-13; **2005**.

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

LEE, S. Y. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnology.* 14: 98-105, **1996**.

LIM, H. K.; KIM, S. G.; JUNG, K. H. & SEO, J. H. Production of the kringle fragments of human apolipoprotein (a) by continuous lactose induction strategy. *J. Biotechnology.* 108: 271-278, **2004**.

LOPEZ, P. J.; MARCHAND, I.; JOYCE, S. A. & DREYFUS, M. The C terminal half of Rnase E, which organizes the *Escherichia coli* degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing in vivo. *Molecular Microbiology.* 33 : 188-199, **1999**.

LOSEN, M.; FRÖLICH, B.; POHL, M. & BÜCHS, J. Effect of limitation and medium composition on *Escherichia coli* fermentation in shake-flask cultures. *Biotechnol Prog.* 20:1062-1068, **2004**.

LULI, G. W. & STROHL, W. R. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Applied and Environmental Microbiology.* 56: 1004-1011, **1990**.

MAKRIDES, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiology review.* 60 : 512-538, **1996**.

MARMELSTEIN, L. D. & PAPOUTSAKIS, E. T. Evolution of microlide and lincosamide antibiotics for plasmid maintenance in low pH *Cl. Acetobutylicum* ATCC-824 fermentations. *FEMS Microbiol. Letters.* 113: 71-76, **1993**.

MATSUI, T.; SATO, H.; SATO, S.; MUKATAKA, S. & TAKAHASHI, J. Effects of nutritional conditions on plasmid stability and production of tryptophan synthase by a recombinant *Escherichia coli*. *Agric. Biology Chemical.* 54: 619-624, **1990**.

MEACOK, P. A. & COHEN, S. N. Partitioning of bacterial plasmid during cell division, a cis-acting locus, that accomplishes stable plasmid inheritance. *Cell.* 20 : 529-542, **1980**.

MENZELLA, H.G.; CECCARELLI, E.A. & GRAMAJÓ, H.C. Novel *Escherichia coli* strain allows efficient recombinant protein production using lactose as inducer. *Biotechnology and Bioengineering*. 82: 809-817, **2003**.

MULINARI, F. jaburetox-2Ec: um peptídeo recombinante derivado de urease de *Canavalia ensiformis* com potencial bioinseticida. Dissertação de Mestrado, UFRGS, Brasil, **2004**.

NAYAK, D.P. & VYAS, V.V. Improved stability and expression of a recombinant shuttle plasmid in *Escherichia coli* during fedbatch cultivation. *World J. Microbiology & Biotechnology*. 15 : 65-71, **1999**.

NEUBAUER, P.; HOFMANN, K.; HOLST, O.; MATTIASSON, B. & KRUSCHKE, P. Maximizing the expression of a recombinant gene in *Escherichia coli* by manipulation of induction time using lactose as inducer. *Appl. Microbiol. Biotechnology*. 36 : 739-744, **1992**.

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

NORSDTROM, K. & AUSTIN, S. J. Mechanism that contribute to the stable segregation of plasmid. *Annual Reviews of Genetic*. 23 : 37-69, **1989**.

OU, J.; WANG, L.; DING, X.; DU, J.; ZHANG, Y.; CHEN, & XU, A. Stationary phase protein overproduction is a fundamental capability of *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 314: 174-180, **2004**.

POLACCO, J.C. & HOLLAND, M.A. Roles of urease in plant cells. *International Review of Cytology*. 145: 56-103, **1993**.

QORONFLEH, M.W. Dissolved oxygen concentration affects the accumulation of HIV-1 recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl Biochemical Biotechnology*. 80 : 107-120, **1999**.

RAMCHURAN, S.O.; KARLSSON, E.N.; VELUT, S.; De MARÉ, L.; HAGANDER, P. & HOLST, O. Production of heterologous thermostable glycoside hydrolases and the presence of host-cell proteases in substrate limited fed-batch cultures of *Escherichia coli*. BL 21 (DE3). *Appl. Microbiol Biotechnol*. 60 : 408-416, **2002**.

RAMIREZ, D. M. & BENTLEY, W. E. Fed-batch feeding and induction policies that improve foreign protein synthesis and stability by avoiding stress response. *Biotechnology and Bioengineering*. 47 : 596-608, **1995**.

RAUHUT, R. & KLUG, G. mRNA degradation on bacteria. *FEMS Microbiol. Rev* 23 : 353-370, **1999**.

REGNIER, P. & ARRAIANO, C. M. Degradation of mRNA in bacteria: emergence of ubiquitous features. *Bioessays*. 22: 235-244, **2000**.

RIESENBERG, D.; SHULZ, V.; KNORRE, WA.; POHL, H.D.; KORZ, D. & SANDERS, E. A. High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. *J. Biotechnology*. 20: 17-28, **1991**.

RINAS, U. Synthesis rates of cellular proteins involved in translation and protein folding are strongly altered in response to overproduction of basic fibroblast growth factor by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog*. 12:196–200, **1996**.

ROWE, D. C.D. & SUMMERS, D. K. The quiescent-cell expression system for protein synthesis in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 2710-2715, **1999**.

S↓RENSEN, H. P.; SPERLING-PETERSEN, H. U.; MORTENSEN, K. K. Production of recombinant thermostable proteins expressed in *Escherichia coli* : completion of protein synthesis is the bottle-neck. *J. Chromatogr*. 786 : 207-214, **2003**.

S↓RENSEN, H.P. & MORTENSEN, K.K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnology*. 115 : 113-128, **2005**.

SAIR, M. H. Jr. Differential codon usage: a safeguard against inappropriate expression of specialized genes? *FEBS Lett*. 362 : 1-4, **1995**.

SALMON, K.; HUNG, S.; MEKJAN, K.; BALDI,P.; HATFIELD, GW. & GUNSALUS,RP. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of oxygen availability and FNR. *J Biology Chemical*. 278 : 29837-29855, **2003**.

SAN, K, Y.; BENNETT, G. N.; ARISTIDOU, A. A. & CHOU, C. H. Strategies in high-level expression of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Ann. Acad Sci*. 721: 257-267, **1994**.

SANDÉN, A.M.; PRYTZ,I.; TUBULEKAS, I.; FÖRBERG, C.; LE,H.; HEKTOR, A.; NEUBAUER, P.; PRAGAI, Z.; HARWOOD,C.; WARD,A.; PICON,A.; MATTOS, J.T.; POSTMA, P.; FAREWELL, A.; NYSTRÖM, T.; REEH, S.; PEDERSEN, S. & LARSSON, G. Limiting factors in *Escherichia coli* fed-batch production of recombinant proteins. *Biotechnology and Bioengineering*. 81: 158-166, **2003**.

SCHUMANN, W. & FERREIRA, L.C. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genetics and Molecular Biology*. 27: (3) 442-453, **2004**.

SHILOACH, J. & FASS, R. Growing *E. coli* to high cell density – A historical perspective on method development. *Biotechnology Advances*. 23 : 345-457, **2005**.

STANISÇUASKI, F.; FERREIRA-DeSILVA, C.T.; MULINARI, F.; PIRES-ALVES, M. & CARLINI, C.R. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdecus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon* 45: 753-760, **2005**.

STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein expression and purification*. 41: 207–234, **2005**.

SUMMERS, D.K. The kinetics of plasmid loss. *Trends Biotechnology*. 9: 273-278, **1991**.

SUNITHA, K.; KIM, YO.; LEE, JK. & O, TK. Statistical optimization of seed and induction conditions to enhance phytase production by recombinant *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering J.* 5: 51-56, **2000**.

SWARTZ, J.R. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Current Opinion in Biotechnology*. 12 : 195-201, **2001**.

VILLAVERDE, A. & CARRIÓ, M.M. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnology Letters*. 25:1385-1395, **2003**.

WANG, J.H. & TARR,D.A. On the mechanism of the urease action. *J. Am. Chemical. Soc.* 77: 6205-6206, **1955**.

WARNES, A. & STEPHENSON , J.R. The insertion of large pieces of foreign genetic material reduces the stability of bacterial plasmids. *Plasmid*. 16: 116-123, **1986**.

WINKLER, W.C. Metabolic monitoring by bacterial mRNAs. *Arch Microbiol*. 183: 151-159, **2005**.

ANEXO 1

CURRICULUM VITAE

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Geizecler Tomazetto
Nome em publicações : Tomazetto, G.
Nascimento: 22/10/1979 – Paranavaí, PR.
E-mail: geizetomazetto@uol.com.br

Endereço profissional: Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos,
Departamento de Tecnologia de Alimentos.
Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio, 43 212
sala 212-216. Agronomia
CEP: 91570-901, Porto Alegre, RS, Brasil
Caixa Postal : 15090
Telefone: (51) 3316 66 85.

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO:

Graduação:

2000-2003: Graduação em Biomedicina. Universidade Estadual de Londrina, UEL, Paraná, Brasil.

Pós-Graduação:

2004/2 – em andamento: Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

3. ESTÁGIOS

08/2000 a 12/2003 : Bolsista de Iniciação Científica
Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular
Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas.
Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR, Brasil.
Orientadora : Marilda Carlos Vidotto.

08/2001 - 12/2001 : Estágio Curricular em Bioquímica de Microrganismo.
Departamento de Bioquímica e Biotecnologia.

08/2002 – 12/2002 : Estágio Curricular em Imunologia.
Departamento de Ciências Patológicas.

4. MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO

Título : Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Escherichia coli* isoladas de hemocultura humana.

Orientadora: Marilda Carlos Vidotto.

Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas.UEL, Londrina, PR, Brasil.

5. PUBLICAÇÕES DE RESUMOS

TOMAZETTO, Geizecler; **CARON**, Deise; **CARLINI**, Célia Regina; **AYUB**, Marco Antonio Z. Estudo da Produção de jaburetox expresso em *Escherichia coli* BI 21 induzida com Lactose. In: VII Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, UFRGS, 2005, Porto Alegre.

TOMAZETTO, Geizecler; **CARLINI**, Celia Regina; **AYUB**, Marco Antonio Z. Reclonagem da seqüência codificante para o peptídeo jaburetox-2Ec em *Kluyveromyces marxianus* e o Estudo da sua expressão em Biorreatores. In: VI Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, UFRGS, 2004, Porto Alegre.

TOMAZETTO, Geizecler. Caracterização Genotípica e Fenotípica de amostras de *Escherichia coli* isoladas de hemocultura humana. In: I Simpósio Integrado dos Bacharelados em Biomedicina e I Mostra de Painéis em Biomedicina, 2003, Londrina.

TOMAZETTO, Geizecler; **VIDOTTO**, Marilda Carlos. Detecção de genes de virulência em plasmídeo conjugativos de amostras de *Escherichia coli* isoladas de hemocultura humana. In: XII Encontro Anual de Iniciação Científica PIBIC/CNPQ, 2003, Foz do Iguaçu. CD-ROOM XII EAIC.

TOMAZETTO, Geizecler. Estudos dos Fatores de Virulência em isolados de *Escherichia coli* de Hemocultura Humana e da Localização dos Genes de Virulência em Plasmídeos Conjugativos. In: XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2003, Florianópolis. CD-Room.

TOMAZETTO, Geizecler; **VIDOTTO**, Marilda Carlos. Estudos dos Fatores de

Virulência e determinantes genéticos em *Escherichia coli* isoladas de hemocultura de origem humana. In: XI Encontro Anual de Iniciação Científica PIBIC/CNPQ, 2002, Maringá. CD-ROOM XI EAIC.

TOMAZETTO, Geizecler; VIDOTTO, Marilda Carlos. Genes de virulência das amostras de *Escherichia coli* isoladas de infecção extraintestinal são localizadas em plasmídios conjugativos. In: I Congresso Paranaense de Biologia Aplicada à Saúde ; V Congresso Londrinense de Biologia Aplicada a Saúde ; II Encontro Paranaense de Biomedicina , Londrina. Anais. 2002.

TOMAZETTO, Geizecler; SILVA, Amália Campos Milani E; VIDOTTO, Marilda Carlos. Estudo dos fatores de Virulência e Determinantes Genéticos em *Escherichia coli* isoladas de Hemocultura de Origem Humana. In: Congresso Londrinense de Biologia Aplicada à Saúde, 2001, Londrina. Biosaúde.: Editora UEL, 2001. v. 3, p. 01-100.