



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

**HORMÔNIO DE CRESCIMENTO RECOMBINANTE DE TAMBAQUI
(*Colossoma macropomum*): OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO EM
FRASCOS AGITADOS E PRODUÇÃO EM BIORREATOR**

ELSON ANTONIO SADALLA PINTO

**MANAUS, AMAZONAS
2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

ELSON ANTONIO SADALLA PINTO

**HORMÔNIO DE CRESCIMENTO RECOMBINANTE DE TAMBAQUI
(*Colossoma macropomum*): OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO EM
FRASCOS AGITADOS E PRODUÇÃO EM BIORREATOR**

**Tese apresentada ao Programa Multi-
Institucional de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal do
Amazonas, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia.**

**Orientação: Edmar Vaz de Andrade
Spartaco Astolfi Filho**

**MANAUS, AMAZONAS
2018**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S124h Sadalla Pinto, Elson Antônio
Hormônio de crescimento recombinante de tabaqui (*Colossoma macropomum*): otimização da expressão em frascos agitados e produção em biorreator / Elson Antônio Sadalla Pinto. 2018
86 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Edmar Vaz de Andrade
Orientador: Spartaco Astolfi-Filho
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. hormônio de crescimento. 2. tabaqui. 3. expressão heteróloga. 4. frascos agitados. 5. biorreator. I. Andrade, Edmar Vaz de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

ELSON ANTONIO SADALLA PINTO

**HORMÔNIO DE CRESCIMENTO RECOMBINANTE DE TAMBAQUI
(*Collossoma macropomum*): OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO EM
FRASCOS AGITADOS E PRODUÇÃO EM BIORREATOR**

**Tese apresentada ao Programa Multi-
Institucional de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal do
Amazonas, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia.**

DEFESA DE TESE EM 31 / 03 / 2018

BANCA EXAMINADORA

TITULARES:

Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade - Presidente

Prof. Dr. Edson Junior do Carmo – UFAM

Profa. Dra. Elen Bethleen Pedraça dos Santos – UFAM

Prof. Dr. Adolfo José da Mota – UFAM

Profa. Dra. Sandra Patrícia Zanotto – CBA

SUPLENTES:

Profa. Dra. Cintia Mara de Oliveira – UFAM

Prof. Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva - UFAM

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, irmãos, esposa e filhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, saúde e força para prosseguir sempre com entusiasmo nos desafios da vida humana.

Agradeço aos meus familiares pelo apoio constante e incondicional.

Agradeço aos grandes mestres que me conduziram nesta trabalhosa etapa de minha vida:

Ao Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade, por ter aceitado orientar-me e prosseguido até o fim com este propósito.

Ao Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho, por acreditar no potencial deste trabalho e por suas preciosas orientações; de longe o conhecia pela fama de grande cientista, agora, de perto, o conheço pelo grande ser humano que é.

Ao Prof. Dr. Nei Pereira Júnior e sua equipe, pela acolhida e acompanhamento passo-a-passo dos experimentos realizados no Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos - LADEBIO da Escola de Química da UFRJ, em especial aos pós-graduandos Rodrigo e Douglas, dois gurus do bioprocessos.

Ao Prof. Dr. Ítalo Matos e Dr. Roberto Maeda, pelos ensinamentos de introdução ao Planejamento Experimental Fatorial.

Ao Dr. Marcos Pessoa, amigo e grande colaborador deste trabalho.

A estudante Larissa Matos, que muito contribuiu nos experimentos iniciais deste trabalho.

Aos professores membros da Banca Avaliadora do exame de qualificação e da defesa de tese.

A todos os docentes do PPGBIOTEC, que me conduziram a incríveis horizontes de conhecimentos imprescindíveis à minha formação profissional.

Aos amigos do CAM: Júlio Nino, Luciana, Isabelle, Filipe, Jefferson, Suelén, Eliane, Anita, Rogério, Andrezão, Dina, Diego, Kerollen e Lana, agradeço pelas trocas de experiências e aprendizagem.

Também agradeço:

À UFAM e ao PPGBIOTEC, pela oportunidade de avançar nos estudos.

A FAPEAM, pelo apoio financeiro.

E ao IFAM, por ter autorizado meu afastamento para participar deste curso de doutorado.

Muito obrigado!

RESUMO

A expressão heteróloga do hormônio de crescimento recombinante de tambaqui (rtGH), *Colossoma macropomum*, na levedura metilotrófica *Pichia pastoris* aponta a perspectiva de geração de um produto biotecnológico inovador para a piscicultura brasileira, em especial para o cultivo do tambaqui. Nessa perspectiva, esta pesquisa teve por objetivo avaliar o potencial de expressão do rtGH na levedura *P. pastoris*, em sistema de frascos agitados e em biorreator. Inicialmente foi realizada uma seleção dos clones transformantes de *P. pastoris* com capacidade de produzir os melhores níveis de rtGH, levando em consideração o fenótipo. Para melhorar o nível de expressão do rtGH em sistema de frascos agitados, foram utilizadas as ferramentas estatísticas de planejamento experimental fatorial. Primeiramente, um *screening design* baseado no delineamento Plackett e Burman foi utilizado para seleção dos parâmetros mais significativos relacionados à produção de rtGH e biomassa: extrato de levedura, peptona, ureia, tampão fosfato, biotina, metanol, inóculo e pH. Posteriormente, os parâmetros selecionados, metanol e peptona, foram avaliados em DCCR e analisados por meio da metodologia de superfície de resposta. Por fim, foi realizada uma fermentação conduzida em batelada alimentada por pulsos de metanol e o perfil cinético de produção do rtGH determinado. Os resultados obtidos indicaram o clone 32b, fenótipo Mut⁺, como o mais produtivo. O metanol foi apontado como o parâmetro mais importante para a produção do rtGH, seguido da peptona, biotina e inóculo. Em relação à formação de biomassa, o metanol, extrato de levedura e tampão fosfato foram os parâmetros mais importantes. De acordo com o modelo obtido, as concentrações de 1,55 % de metanol e 2,8% de peptona foram consideradas ótimas para produção do rtGH. O modelo foi validado com aumento da produção de rtGH de 0,3 mg/L para 2,4 mg/L na condição otimizada. A fermentação em biorreator, conduzida em batelada alimentada por pulsos de metanol, resultou num nível de produção de rtGH de 250 mg/L, aproximadamente 100 vezes superior ao obtido em frascos agitados. Esta pesquisa foi pioneira no desenvolvimento de estratégias de otimização da produção do rtGH em *P. pastoris* utilizando frascos agitados e biorreator.

Palavras-chave: hormônio de crescimento, tambaqui, expressão heteróloga, frascos agitados, biorreator.

ABSTRACT

The heterologous expression of recombinant growth hormone of tambaqui (rtGH), *Colossoma macropomum*, in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* points to the prospect of generating an innovative biotechnological product for Brazilian fish farming, especially for the cultivation of tambaqui. In this perspective, this research aimed to evaluate the potential of rtGH expression in yeast *P. pastoris*, in shaken flasks and in bioreactor. Initially, a selection of the transforming clones of *P. pastoris* with the capacity to produce the best rtGH levels was carried out, taking into account the phenotype. In order to improve the level of rtGH expression in the shaken flasks system, the statistical tools of factorial experimental planning were used. First, a screening design based on the Plackett and Burman design was used to select the most significant parameters related to the production of rtGH and biomass: yeast extract, peptone, urea, phosphate buffer, biotin, methanol, inoculum and pH. Subsequently, the selected parameters, methanol and peptone, were evaluated in DCCR and analyzed using the response surface methodology. Finally, a fermentation was carried out in batch fed by pulses of methanol and the kinetic profile of the determined rtGH production. The results indicated clone 32b, Mut⁺ phenotype, as the most productive. Methanol was identified as the most important parameter for rtGH production, followed by peptone, biotin and inoculum. In relation to biomass formation, methanol, yeast extract and phosphate buffer were the most important parameters. According to the obtained model, the concentrations of 1.55% methanol and 2.8% peptone were considered optimal for rtGH production. The model was validated with increased rtGH production from 0.3 mg / L to 2.4 mg / L in the optimized condition. Bioreactor fermentation conducted in batch pulsed methanol resulted in a rtGH production level of 250 mg / L, approximately 100 times greater than that obtained in shaken flasks. This research pioneered the development of optimization strategies for rtGH production in *P. pastoris* using shaken flasks and bioreactor.

Keywords: growth hormone, tambaqui, heterologous expression, shaken flasks, bioreactor.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação de algumas das muitas funções fisiológicas afetadas direta ou indiretamente pelo GH, por meio do fator de crescimento semelhante à insulina, IGF (*insulin-like growth factor*) em peixes..... 22
- Figura 2.** Regulação endócrina do crescimento por meio do eixo GH/IGF em peixes teleósteos. Múltiplos fatores hormonais e nutricionais podem estimular a produção e/ou modificar (+/-) a atividade do IGF I. O IGF I atua como *feedback* negativo (-) sobre a secreção do GH pela glândula pituitária..... 24
- Figura 3.** Modelos estruturais do GH em vertebrados. À esquerda: modelo molecular da estrutura 3D do GH de *Labeo rohita* mostrando as quatro α -hélices antiparalelas. É a estrutura tridimensional consenso para as moléculas de GHs. À direita: o GH humano com as duas ligações dissulfeto entre as cadeias..... 26
- Figura 4.** Via metabólica do metanol em *P. pastoris*. Enzimas da via: 1-álcool oxidase; 2-catalase; 3-formaldeído desidrogenase; 4-formato desidrogenase; 5-diidroxiacetona sintase; 6-diidroxiacetona cinase; 7-frutose 1,6-bifosfato aldolase; 8-frutose 1,6-bifosfatase. Abreviações: GAP: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; DHA: diidroxiacetona; DHAP: diidroxiacetona fosfato; FBP: frutose 1,6-bifosfato; F6P: frutose 6-fosfato; Xu5P: 5-fosfato de xilulose..... 29
- Figura 5.** Vetor de expressão padrão para a levedura *P. pastoris*. A maioria dos vetores desenvolvidos para esta levedura compartilham as características gerais mostradas em preto (regiões: 5' AOX1 – promotor; MCS – múltiplo sítio de clonagem; HIS4 – gene da enzima histidinol desidrogenase; 3' AOX1 – região homóloga ao genoma da levedura; Amp – gene de resistência a ampicilina), enquanto outros possuem uma sequência sinal (Sig) e/ou origem em bacteriófago (f1 ori), mostrado em cinza..... 32
- Figura 6.** Integração por adição do vetor ao genoma de *P. pastoris*. A integração ocorre por recombinação simples entre a região HIS4 do vetor com a região homóloga no genoma da levedura. O gene *his4* mutado no genoma é restaurado durante a recombinação com a região HIS4 não mutada do vetor..... 33
- Figura 7.** Integração por adição do vetor ao genoma de *P. pastoris*. A integração ocorre por recombinação simples entre a região 3' AOX1 do vetor com a região homóloga no genoma da levedura. O gene *his4* mutado no genoma é restaurado durante a recombinação com a região HIS4 não mutada do vetor..... 33
- Figura 8.** Integração por substituição gênica do vetor com o genoma de *P. pastoris*. A substituição ocorre por recombinação dupla entre as regiões 5' AOX1 e 3' AOX1 (ambas no promotor) com as respectivas regiões homólogas no genoma da levedura. Esse tipo de integração resulta em transformantes de fenótipo Mut^s..... 34
- Figura 9.** Fluxograma das etapas e experimentos que foram realizados ao longo da pesquisa. Abreviações: rtGH – Hormônio de crescimento recombinante de tabaqui; PB

| | |
|---|----|
| – Delineamento Placktt & Burman; DCCR – Delineamento composto central rotacional; RSM - Metodologia de superfície de resposta..... | 39 |
| Figura 10. Estratégia experimental utilizada..... | 45 |
| Figura 11. Blot de colônia dos clones de <i>P. pastoris</i> GS115/pPIC-tGH. As manchas indicam os clones que expressam o rtGH. Os controles negativos estão indicados por setas vermelhas na parte superior central de todas as imagens. Nos círculos estão os clones selecionados para os experimentos de indução em sistema de frascos agitados, e os círculos com seta indicam os clones com os melhores níveis de expressão obtidos neste trabalho..... | 51 |
| Figura 12. Perfil eletroforético de proteínas em gel SDS-PAGE 15 % corado em <i>Coomassie</i> do sobrenadante da cultura de diferentes clones <i>P. pastoris</i> GS115/pPIC-tGH/Mut ⁺ . Canaletas: M – marcador de massa molecular de proteínas (<i>Thermo Scientific Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder</i>); C-: controle negativo (GS115/pPIC-GLA/Mut ⁺); 20c, 24d, 25a, 30d e 32b: clones produtores de rtGH em diferentes níveis..... | 52 |
| Figura 13. Western blot do sobrenadante da cultura de diferentes clones de <i>P. pastoris</i> GS115/pPIC-tGH/Mut ⁺ . Canaletas: M – marcador de massa molecular de proteínas (<i>InVision BenchMark His-tagged Protein Standard, Life Technologies</i>); 20c, 24d, 25a, 30d e 32b: clones produtores de rtGH; C-: controle negativo (GS115/pPIC-GLA/Mut ⁺)..... | 53 |
| Figura 14. Perfil eletroforético de proteínas em gel SDS-PAGE 15 % do sobrenadante da cultura de diferentes clones de <i>P. pastoris</i> GS115/pPIC-tGH/Mut ^s . Canaletas: M – marcador de massa molecular de proteínas (<i>InVision BenchMark His-tagged Protein Standard, Life Technologies</i>); C-: controle negativo (GS115/pPIC-GLA/Mut ^s); 1c, 2c, 3c e 4c: clones produtores de rtGH em diferentes níveis..... | 54 |
| Figura 15. Western blot do sobrenadante da cultura de diferentes clones de <i>P. pastoris</i> GS115/pPIC-tGH/Mut ^s . Canaletas: M – marcador de massa molecular de proteínas (<i>InVision BenchMark His-tagged Protein Standard, Life Technologies</i>); C-: controle negativo (GS115/pPIC-GLA/Mut ^s); 1c, 2c, 3c e 4c: clones produtores de rtGH em diferentes níveis de expressão..... | 54 |
| Figura 16. Diagrama de Pareto obtido a partir do delineamento Plackett & Burman, de oito parâmetros avaliados, tendo como variável de resposta a produção do rtGH. Abreviações: Met: metanol; Pep: peptona; Biot: biotina; EL: extrato de levedura e Tp Fosf: tampão fosfato..... | 58 |
| Figura 17. Diagrama de Pareto obtido a partir do delineamento Plackett & Burman, de oito parâmetros avaliados, tendo como variável de resposta a formação de biomassa. Abreviações: Met: metanol; Pep: peptona; Biot: biotina; EL: extrato de levedura e Tp Fosf: tampão fosfato..... | 59 |
| Figura 18. Gráfico de superfície de resposta e superfície de contorno do DCCR tendo como fatores o metanol e a peptona. À esquerda: gráfico de superfície de resposta. À direita: gráfico de superfície de contorno. A variável de resposta considerada foi a | |

produção de rtGH (mg/L)..... 62

Figura 19. Perfil eletroforético de proteínas em gel SDS-PAGE 15 % do sobrenadante da cultura de *P. pastoris* GS115/pPIC-tGH/Mut⁺ induzida em condições não otimizadas e otimizadas. Canaletas: 1: condição não otimizada contendo ureia como fonte de nitrogênio; 2: condição não otimizada contendo YNB como fonte de nitrogênio; 3: condição otimizada contendo ureia como fonte de nitrogênio; 4: condição otimizada contendo YNB como fonte de nitrogênio; M – marcador de massa molecular de proteínas (*ECLTM RainbowTM Marker Full Range*); C-: controle negativo (*P. pastoris* GS115/pPIC-TPP 61)..... 64

Figura 20. Perfil cinético da fermentação conduzida em meio de cultivo FM22 e biorreator modelo STR. A abreviação X significa concentração celular / formação de biomassa..... 66

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Parâmetros físicos, químicos e físico-químicos importantes para cultivo e expressão heteróloga em <i>P. pastoris</i> em frascos agitados..... | 42 |
| Tabela 2. Valores utilizados no delineamento Plackett & Burman (PB) constituído por oito parâmetros..... | 45 |
| Tabela 3. Matriz de dados codificados no delineamento Plackett & Burman (PB) para oito parâmetros e duas variáveis de resposta..... | 46 |
| Tabela 4. Faixa de variação da região experimental do DCCR executado..... | 47 |
| Tabela 5. Matriz de dados codificados e respostas avaliadas no DCCR executado..... | 47 |
| Tabela 6. Matriz com os parâmetros avaliados no delineamento Plackett & Burman (PB) constituído por doze ensaios fatoriais e três repetições do ponto central. Nas colunas da direita estão mostrados os resultados obtidos para as duas variáveis de resposta (produção de rtGH e formação de biomassa) após 72 horas de indução do clone 32b/Mut ⁺ | 56 |
| Tabela 7. Matriz de dados e respostas obtidas no DCCR executado por 72 h de indução em sistema de frascos agitados..... | 61 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------------------------|--|
| α | Alfa |
| μ | Micrômetro |
| Amp | Gene de resistência a ampicilina |
| aox | Gene codificador da enzima álcool oxidase |
| AOX | Promotor do gene da enzima álcool oxidase |
| Asn | Asparagina |
| cDNA | Ácido desoxirribonucleico complementar |
| Cys | Cisteína |
| DCCR | Delineamento composto central rotacional |
| D.O.₆₀₀ | Densidade óptica a 600 nanômetros |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| F1 ori | Origem em bacteriófago |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| GH | Hormônio de crescimento |
| GHR | Receptor do hormônio de crescimento |
| GHRH | Hormônio liberador do hormônio de crescimento (<i>growth hormone release hormone</i>) |
| GRAS | Organismo geralmente considerado como seguro (<i>generally regarded as safe</i>) |
| his4 | gene codificador da histidinol desidrogenase |
| HIS4 | Região presente nos vetores utilizados para transformação auxotrófica de linhagens comerciais de <i>P. pastoris</i> responsável pela recomposição do gene <i>his4</i> mutado |
| His⁻ | Fenótipo de <i>P. pastoris</i> incapaz de sintetizar o aminoácido histidina |
| His⁺ | Fenótipo de <i>P. pastoris</i> que tem a capacidade de sintetizar o aminoácido histidina |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| IGF | Fator de crescimento insulínico (<i>insulin-like growth factors</i>) |
| IGFBP | Proteínas de ligação ao fator de crescimento insulínico (<i>insulin-like growth factors binding proteins</i>) |
| kDa | Quilodalton (unidade de massa molecular) |
| L | Litro |
| LacZ | Gene codificador da β -galactosidase |
| M | Molar |
| mA | Miliampères (10^{-3} Unidade de corrente elétrica) |
| MCS | Múltiplo sítio de clonagem |
| mL | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| mRNA | Ácido ribonucleico mensageiro |
| Mut⁺ | Máxima utilização de metanol (<i>methanol utilization plus</i>) |
| Mut^s | Lenta utilização do metanol (<i>methanol utilization slow</i>) |
| nm | Nanômetro |
| PA | Para análise |
| PB | Delineamento Plackett & Burman |
| pep4 | Gene codificador da proteinase A vacuolar |
| prb1 | Gene codificador da proteinase B vacuolar |
| QTL | <i>Quantitative Trait Loci</i> |
| RFLP | <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> |
| rGH | Hormônio de crescimento recombinante |

| | |
|-----------------|--|
| rhGH | Hormônio de crescimento recombinante humano |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| rpm | Rotação por minuto |
| RSM | Metodologia de superfície de resposta |
| rtGH | Hormônio de crescimento recombinante de tabaqui |
| SDS-PAGE | Dodencil sulfato de sódio – gel de poliacrilamida (<i>sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis</i>) |
| Ser | Serina |
| Sig | Sequência sinal de secreção |
| tgh | Gene codificador do hormônio de crescimento de tabaqui |
| tGH | Hormônio de crescimento de tabaqui |
| Thr | Treonina |
| TT | Região presente nos vetores utilizados para expressão de proteínas heterólogas em linhagens comerciais de <i>P. pastoris</i> responsável pelo término de transcrição do promotor |
| AOX | |
| W | Watt (Unidade de potência) |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| DEDICATÓRIA..... | 05 |
| AGRADECIMENTOS..... | 06 |
| RESUMO..... | 07 |
| ABSTRACT..... | 08 |
| LISTA DE FIGURAS..... | 09 |
| LISTA DE TABELAS..... | 12 |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS..... | 13 |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 17 |
| | |
| 2. OBJETIVOS..... | 21 |
| 2.1 Objetivo Geral..... | 21 |
| 2.2 Objetivos Específicos..... | 21 |
| | |
| 3. REVISÃO DA LITERATURA..... | 22 |
| 3.1 Hormônio de crescimento: fisiologia e estrutura..... | 22 |
| 3.2 O sistema de expressão <i>Pichia pastoris</i>..... | 27 |
| 3.2.1 Características gerais..... | 27 |
| 3.2.2 Metabolismo do metanol e o promotor AOX1..... | 29 |
| 3.2.3 Glicosilação..... | 30 |
| 3.2.4 Linhagens e vetores..... | 31 |
| 3.2.5 Transformação..... | 32 |
| 3.3 Fatores relacionados à expressão heteróloga..... | 35 |
| | |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 39 |
| 4.1 Estratégia utilizada..... | 39 |
| 4.2 Linhagens de hospedeiras..... | 39 |
| 4.3 Triagem dos clones de <i>Pichia pastoris</i> GS115/pPIC-tGH/Mut⁺ e Mut^s produtores de rtGH..... | 40 |
| 4.3.1 Determinação fenotípica..... | 40 |
| 4.3.2 <i>Blot</i> de colônia..... | 41 |
| 4.4 Avaliação do potencial de expressão do rtGH em frascos agitados..... | 41 |
| 4.4.1 Considerações iniciais..... | 41 |
| 4.4.2 Expressão do rtGH em <i>Pichia pastoris</i> em frascos agitados..... | 42 |
| 4.4.3 Análise do produto expresso em gel desnaturante SDS-PAGE..... | 43 |
| 4.4.4 Análise do produto expresso em Western blotting..... | 43 |
| 4.5 Otimização da expressão do rtGH em frascos agitados..... | 44 |
| 4.5.1 Planejamento experimental..... | 44 |
| 4.5.2 Delineamento Plackett & Burman (PB)..... | 45 |
| 4.5.3 DCCR..... | 46 |
| 4.5.4 RSM..... | 48 |
| 4.6 Expressão do rtGH em biorreator..... | 48 |
| 4.6.1 Condução do bioprocesso..... | 48 |
| 4.6.2 Quantificações de glicerol e metanol durante a fermentação..... | 49 |
| 4.7 Quantificação do rtGH..... | 49 |
| 4.8 Análise estatística..... | 50 |

| | |
|--|-----------|
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 51 |
| 5.1 Triagem dos clones de <i>Pichia pastoris</i> GS115/pPIC-tGH/Mut⁺ e Mut^s produtores de rtGH..... | 51 |
| 5.2 Avaliação do potencial de expressão heteróloga dos clones produtores de rtGH em frascos agitados..... | 52 |
| 5.2.1 Fenótipo Mut ⁺ | 52 |
| 5.2.2 Fenótipo Mut ^s | 53 |
| 5.2.3 Seleção do fenótipo Mut ⁺ para otimização da expressão do rtGH..... | 55 |
| 5.3 Otimização da expressão do rtGH em frascos agitados..... | 56 |
| 5.3.1 Delineamento Plackett & Burman (PB)..... | 56 |
| 5.3.2 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)..... | 61 |
| 5.4 Indução do rtGH em biorreator..... | 65 |
| 5.5 Comparação dos níveis de rtGH produzido em frascos agitados e biorreator..... | 67 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 69 |
| 7. PERSPECTIVAS..... | 70 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 71 |
| APÊNDICE..... | 83 |

1. INTRODUÇÃO

Pesquisas voltadas para a compreensão das características ecológicas, fisiológicas e de manejo das muitas espécies de peixes nativas do Brasil têm contribuído para o conhecimento atual sobre o potencial das mesmas para a piscicultura. Além desses estudos, outros temas de pesquisas considerados prioritários, nas áreas de sistemas de produção aquícola, nutrição, profilaxia, sanidade, reprodução, larvicultura, melhoramento genético, tratamento pós-colheita, qualidade da água, tratamento de efluentes, bioecologia e transporte de organismos aquáticos têm alavancado a busca de soluções tecnológicas para promover a competitividade e a sustentabilidade da aquicultura nacional e regional (Amazônia Ocidental) (Queiroz et al., 2002; Izel et al., 2013a).

Todos esses enfoques, bem como a realização de experimentações zootécnicas com foco no melhoramento do desempenho produtivo de peixes, têm agregado progressos na piscicultura e edificado as bases científicas para o desenvolvimento de pacotes tecnológicos para melhoramento produtivo das muitas espécies de peixes nativas atualmente utilizadas na piscicultura brasileira (Melo et al., 2001; Queiroz et al., 2002; Pereira-Filho et al., 2003; Izel & Melo, 2004; Fim et al., 2009; Izel et al., 2013b).

Há décadas a Biotecnologia tem contribuído para a melhoria das plataformas tecnológicas de várias áreas do conhecimento humano, como nas ciências biomédicas, agricultura e indústria farmacêutica. Com o avanço de cada plataforma tecnológica, novas ondas de atividade de pesquisa são criadas, assim como novas fronteiras de conhecimento e oportunidades de negócios na indústria biotecnológica (Hew & Fletcher, 2001).

Dentre as plataformas biotecnológicas importantes para a aquicultura, destacam-se (1) tecnologias de expressão heteróloga; (2) análises de microssatélites, polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição – RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e locos de caracteres quantitativos – QTL (*Quantitative Trait Loci*); (3) mapeamento genético e genômica; (4) vacinas de DNA; (5) chips de DNA; (6) proteômica; (7) tecnologia transgênica e tecnologia de células-tronco embrionárias (Hew & Fletcher, 2001). Na aquicultura, as implicações práticas destas plataformas podem ser observadas no melhoramento do crescimento, das matrizes, da resistência aos estressores ambientais e patogênicos, do controle reprodutivo, na redução dos custos de produção, bem como no desenvolvimento de novos e/ou melhores produtos (Melamed et al., 2002).

Com o progresso e expansão da plataforma biotecnológica de expressão heteróloga, as

pesquisas voltadas à busca, clonagem e expressão de genes codificadores de proteínas associadas a importantes processos fisiológicos e características economicamente vantajosas têm acrescentado novas abordagens técnicas e tecnológicas nos modelos tradicionalmente empregados no cultivo de organismos aquáticos, sinalizando o início de uma nova fase para a aquicultura nacional, colocando a Biotecnologia Aquática como área propulsora de inovações e desenvolvimento de tecnologias voltadas para a produtividade desses organismos.

Em nível mundial, observa-se uma tendência cada vez maior na aquicultura para utilização de produtos oriundos de plataformas biotecnológicas, sejam produtos recombinantes ou organismos geneticamente modificados. No ano de 2016, nos Estados Unidos, a agência reguladora de drogas e alimentos – FDA (*Food and Drug Administration*), após rigorosa averiguação científica, liberou para consumo humano o primeiro animal transgênico: um salmão produzido pela empresa americana de biotecnologia aquática *AquaBounty Technologies*. Este salmão transgênico, engenheirado com um gene adicional do hormônio de crescimento, possui a capacidade de crescimento cerca de duas vezes mais rápido do que os espécimes selvagens. Ao invés de três anos o peixe geneticamente modificado precisa de apenas dezoito meses para alcançar o tamanho comercial. Em termos de mercado, tal desenvolvimento biotecnológico representa inúmeras vantagens competitivas, como a economia de tempo, energia e ração no processo produtivo (Waltz, 2016).

No cenário amazônico, sabe-se que o peixe é um dos recursos naturais mais abundantes e consumidos na região (Suframa, 2003; Batista et al., 2007) e que dentre as várias espécies que podem ser utilizadas na piscicultura, o tambaqui (*Colossoma macropomum*) vem ganhando cada vez mais destaque por ser uma das espécies de peixe tradicionalmente mais apreciadas na culinária amazônica (Araújo-Lima & Goulding, 1998). Além disso, por reunir características que o tornam apropriado à piscicultura, tais como a fácil obtenção de alevinos, bom potencial de crescimento, produtividade e rusticidade (Woynarovich, 1986; Araújo-Lima & Goulding, 1998), o tambaqui vem sendo a espécie nativa mais produzida no Brasil.

Segundo dados do IBGE (2016), a produção de tambaqui foi responsável por aproximadamente 27 % (136.991,48 toneladas) da produção da aquicultura continental nacional (508.256,14 toneladas), ficando atrás somente da produção de tilápia (*Oreochromis sp.*), espécie exótica que representou 47 % (239.090,9 toneladas) da produção de pescado nessa modalidade. Esses números mostram um crescimento expressivo na produção de tambaqui, passando de 54.313,1 toneladas em 2010 para 136.991,48 toneladas em 2016.

Em relação ao estado do Amazonas, a despeito de ser o estado brasileiro com o maior potencial natural para o desenvolvimento da aquicultura continental, decorrente da grande extensão territorial recoberta pela bacia hidrográfica amazônica, o mesmo ainda não alcançou um lugar de destaque no *ranking* nacional da produção de tambaqui. De acordo com o IBGE, em 2016, a produção de tambaqui no Amazonas foi de 13.438,442 toneladas, cerca de 7,2 vezes inferior à produção alcançada por Rondônia (69.625,326 toneladas), por exemplo. Além de não suprir a demanda interna de consumo da população amazonense, cujo hábito de consumo de pescado é um dos maiores do mundo, esta baixa produtividade coloca o Amazonas na condição de mercado consumidor de pescado produzido em outros estados. Destaca-se que somente na cidade de Manaus, o consumo per capita fica entre 100 e 200 g/dia, o que equivale de 36 a 72 kg/ano, colocando Manaus como o maior centro consumidor de pescado do Brasil e do mundo, cujas médias per capita são de 9,75 kg/ano e 16 kg/ano, respectivamente (Ferreira, 2009; Izel et al., 2013a)

Neste cenário de desenvolvimento da piscicultura brasileira, com o aumento da produção de espécies nativas, torna-se expoente a necessidade da realização de pesquisas voltadas para desenvolvimento e inovação de processos e produtos capazes de incrementar a produtividade dessas espécies. Assim, destaca-se a importância de estudos que visam melhorar a resistência e/ou tratamentos a doenças ou fatores ambientais, diminuir o tempo de maturação sexual de matrizes, melhorar os métodos de reprodução, bem como robustecer o desempenho zootécnico durante o cultivo.

Sabe-se que nos vertebrados, um gene cujo produto está envolvido em uma cadeia de processos fisiológicos interessantes para fins biotecnológicos é o gene codificador do hormônio de crescimento (GH). Nos estudos ictiológicos de cunho biotecnológico, a caracterização molecular e a expressão heteróloga deste gene têm sido objeto de extensas pesquisas objetivando aplicações em estudos genéticos, fisiológicos e na piscicultura (Tsai et al., 1997; Venugopal et al., 2002a; Funkenstein et al., 2006; Acosta et al., 2007, 2009; Souza et al., 2016).

O sucesso da expressão heteróloga de GHs de várias espécies de peixes, por meio das técnicas moleculares da Engenharia Genética, vem abrindo novos caminhos para a realização de pesquisas voltadas para a investigação da viabilidade de utilização desses produtos biotecnológicos na piscicultura. Para chegar a um produto com potencial mercadológico, os primeiros passos são os estudos voltados para a maximização dos bioprocessos de produção, seguidos dos estudos sobre os efeitos fisiológicos e zootécnicos de GHs nos peixes utilizados

na piscicultura.

A maioria das descrições a respeito da identificação e expressão heteróloga de GHs de peixes é resultado de pesquisas com espécies de origem europeia e de países como a China e a Índia. Embora a bacia amazônica seja o berço da maior biodiversidade de peixes do planeta (Barthem & Fabré, 2003; Buckup et al., 2007), o tambaqui tem sido, até o presente, a única espécie de peixe nativa contemplada com pesquisas sobre o gene codificador do GH. A nível de Brasil, o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), espécie nativa do Pantanal, teve o cDNA do GH isolado, sequenciado e filogeneticamente analisado por Pinheiro e colaboradores (2008), sendo a expressão heteróloga, até o presente, ainda não relatada na literatura.

No ano de 2009, a sequência do gene codificador do GH de tambaqui foi identificada (Souza, 2009). Nos anos seguintes, a sequência deste gene foi otimizada com os códons preferenciais utilizados para as hospedeiras *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*, sendo o hormônio de crescimento recombinante de tambaqui (rtGH) expresso com sucesso nestes sistemas de expressão heteróloga (Silva, 2012; Sadalla-Pinto et al., 2014). Atualmente, a sequência nucleotídica do rtGH está depositada no GenBank (Souza et al., 2016).

Considerando o sucesso das etapas de identificação e expressão heteróloga do rtGH, o foco desta pesquisa foi avaliar o potencial de expressão do rtGH na levedura *P. pastoris*, utilizando-se sistemas de frascos agitados e biorreator, levando em consideração o melhoramento produtivo da proteína recombinante. Esta é uma etapa fundamental para o desenvolvimento de um novo produto biotecnológico com potencial de utilização no melhoramento da produtividade do tambaqui em cativeiro.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o potencial de expressão do hormônio de crescimento recombinante de tambaqui (rtGH) na levedura *Pichia pastoris*, em sistema de frascos agitados e biorreator.

2.2 Específicos

- ❖ Otimizar a expressão do rtGH em sistema de frascos agitados.
- ❖ Produzir o rtGH em biorreator.
- ❖ Comparar o nível de produção do rtGH obtida em frascos agitados nas condições otimizadas com o nível de produção obtida em biorreator.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Hormônio de crescimento: fisiologia e estrutura

O hormônio de crescimento (GH) foi, depois da insulina, o segundo produto biotecnológico produzido pelas técnicas moleculares de engenharia genética. Este produto foi desenvolvido e inicialmente comercializado pela empresa Genentech, sendo usado clinicamente para o tratamento de distúrbios de crescimento e nanismo (Goeddel et al., 1979). Mais tarde, os GHs de diferentes espécies de animais também foram produzidos em organismos transgênicos e estes utilizados com diversas finalidades: estudos fisiológicos de animais aquáticos, na pecuária e piscicultura.

Em termos fisiológicos, o GH é uma proteína pluripotente produzida pela porção anterior – adenoipófise – da glândula pituitária dos vertebrados. No geral, a atividade biológica do GH não está restrita à promoção do crescimento por hiperplasia e hipertrofia, mas participa de outros processos fisiológicos que vão desde o desenvolvimento ontogenético, passando pelo metabolismo energético, até a homeostase orgânica. Em peixes, este hormônio participa de quase todos os principais processos fisiológicos do corpo. Sua ação inclui a regulação dos íons e lipídios, balanço osmótico, metabolismo dos carboidratos e proteínas, crescimento dos tecidos moles e esqueléticos, reprodução, funções imunes, mobilização de energia, desenvolvimento gonadal, apetite e comportamento social (figura 1) (Björnsson, 1997; Canosa, et al., 2007; Yousefian & Shirzad, 2011; Costa et al., 2016).

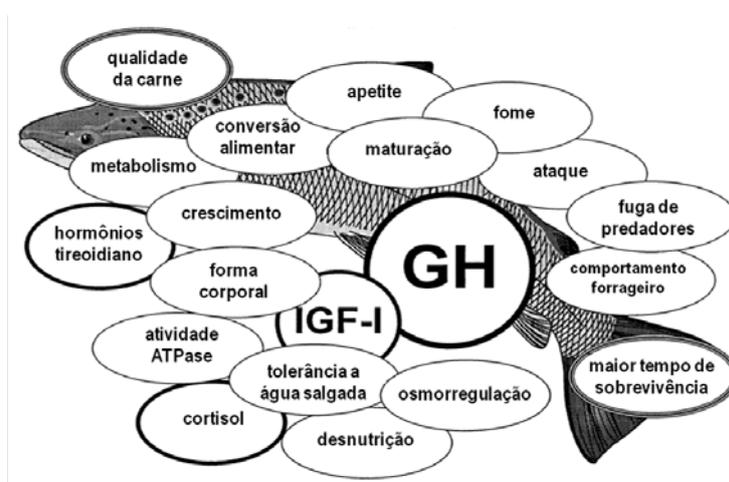


Figura 1. Representação de algumas das muitas funções fisiológicas afetadas direta ou indiretamente pelo GH, por meio do fator de crescimento semelhante à insulina, IGF (*insulin-like growth factor*) em peixes.

Fonte: Björnsson (1997) com modificações.

Por apresentar estrutura molecular bem conservada, o GH tem revelado um padrão similar de atuação nos diferentes grupos de vertebrados. Sua secreção é regulada por meio de um complexo sistema de controle neuroendócrino constituído principalmente por dois reguladores hipotalâmicos, o hormônio liberador do GH (GHRH – *growth hormone release hormone*) e a somatostatina, os quais exibem influência estimulatória e inibitória, respectivamente, sobre as células somatotrópicas da glândula pituitária (Bideci & Çamurdan, 2009).

O GHRH é o estimulador fisiológico da síntese e liberação do GH. A somatostatina atua na regulação dos pulsos de secreção, por isso é considerada o principal modulador da liberação do GH pela glândula pituitária (Müller et al., 1999; Bideci & Çamurdan, 2009). Em humanos, a liberação de GH no plasma também pode ser estimulada por hipoglicemia, exercícios físicos, certos aminoácidos e sono. Contrariamente, os ácidos graxos livres no plasma, a obesidade e a hiperglicemia podem atuar como fatores de repressão da secreção do GH (Broglia et al., 2002; Goldenberg & Barkan, 2007; Bideci & Çamurdan, 2009).

Em relação à atuação no organismo, o GH inicia sua ação biológica ligando-se às proteínas receptoras de GHs (GHRs) existentes na membrana das células dos tecidos alvos, induzindo a ocorrência de uma cascata de fosforilação e expressão gênica (Rousseau & Dufour, 2007). Esses receptores estão presentes em muitos tecidos incluindo os músculos, o tecido adiposo, os ossos e os rins (Yousefian & Shirzad, 2011). A presença de GHRs nos músculos e no tecido adiposo reflete a importância do GH na promoção do crescimento e homeostase energética (Peréz-Sánchez, 2000).

A interação do GH/GHRs estimula as células-alvo, especialmente as hepáticas, a expressarem os fatores de crescimento insulínicos, IGFs I e II (*insulin-like growth factors*), os quais recebem esse nome por apresentarem homologia estrutural ao hormônio insulina. Em experimentos, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, já foram observados que a alimentação e a insulina também atuam positivamente sobre a expressão do IGF I no fígado, acentuando o efeito estimulatório do GH (Duan & Plisetskaya, 1993; Peréz-Sánchez et al., 1995).

Os IGFs têm a função mediadora dos efeitos do GH nos diversos tecidos, atuando desde o crescimento somático até diversas reações bioquímicas e fisiológicas no organismo. Os IGFs presentes na circulação e nos fluidos extracelulares encontram-se ligados com alta afinidade a uma família de proteínas de ligação, as IGFbps (*IGF binding proteins*). O complexo IGF/IGFBP na circulação pode prolongar a meia-vida dos IGFs de 12 a 15 horas em comparação com os 10 a 12 minutos dos IGFs livres (Guler et al., 1989) e tamponar os

possíveis efeitos agudos hipoglicêmicos causados por altas concentrações de IGFs livres (Duan, 1997).

Em ratos, o IGF II é expresso predominantemente durante o estágio fetal em vários tecidos. Já o IGF I é expresso em uma ampla variedade de tecidos durante os estágios fetal e pós-natal. Logo após o nascimento, o fígado torna-se o principal local de produção endócrina do IGF I. Esse padrão de expressão parece estar conservado em peixes teleósteos (Duan, 1997).

Em peixes, o IGF I está envolvido em múltiplos mecanismos de controle fisiológico, exercendo efeito regulatório sobre o crescimento, divisão celular, adaptação, comportamento, maturação gonadal e gametogênese, metamorfose, entre outros. O IGF I também exerce efeito de *feedback* negativo sobre a liberação do GH na hipófise, estimulando o hipotálamo a secretar a somatostatina. Na figura 2 está ilustrado o modelo de regulação endócrina do crescimento por meio do eixo GH/IGF I em peixes.

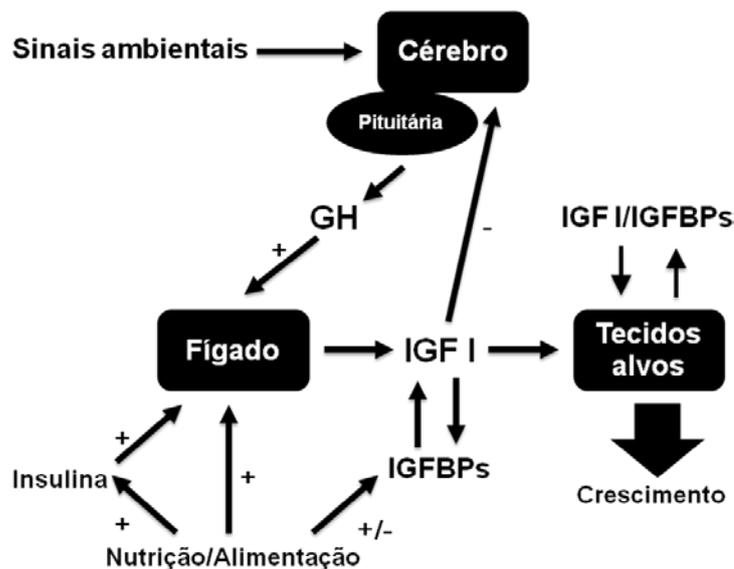


Figura 2. Regulação endócrina do crescimento por meio do eixo GH/IGF em peixes teleósteos. Múltiplos fatores hormonais e nutricionais podem estimular a produção e/ou modificar (+/-) a atividade do IGF I. O IGF I atua como *feedback* negativo (-) sobre a secreção do GH pela glândula pituitária.

Fonte: Duan (1997) com modificações.

Em nível molecular, o GH é uma proteína de 22-23 kDa e, em peixes teleósteos e humanos, apresenta quatro resíduos de cisteínas em posições altamente conservadas, responsáveis pela formação de duas ligações dissulfeto essenciais à manutenção da integridade estrutural e atividade biológica da molécula. Muitos estudos de análise molecular mostram que os cDNAs de GHs de peixes codificam um polipeptídeo maduro com cerca de

178-190 resíduos de aminoácidos e um peptídeo sinal de 17-22 resíduos de aminoácidos (Agellon & Chen, 1986; Saito et al., 1988; Venugopal et al., 2002ab).

Em humanos, são conhecidas até cinco isoformas de GHs resultantes de diferentes *splicing* alternativos e processamentos pós-traducionais. Essas isoformas possuem massa molecular que varia de 20 a 26 kDa, sendo a isoforma de 22 kDa a mais produzida pela glândula pituitária (Ray et al., 1989). Também há relatos da ocorrência de um resíduo adicional de cisteína nos GHs de alguns Ciprinídeos (“carpa cabeça grande” *Hypophthalmichthys nobilis*, “carpa prateada” *H. molitrix*, “carpa capim” *Ctenopharyngodon idellus*) (Chang et al., 1992).

Em conjunto com a prolactina, somatolactina e somatomamotropina (*placental lactogen*), o GH compõe uma família de hormônios pituitários estrutural e funcionalmente relacionados, cuja análise dos genes e da estrutura primária da molécula proteica sugere a evolução a partir de uma sequência ancestral comum (Moore et al., 1982; Chen et al., 1994).

Também tem sido demonstrada a existência de potenciais sítios de glicosilação Asn-X-Ser/Thr (em que X pode ser qualquer aminoácido, exceto a prolina) na molécula do GH de várias espécies de peixes, a exemplo do GH de “salmão-cão” (*Oncorhynchus keta*) (Sekine et al., 1985), o que pode implicar na geração de diferentes isoformas da proteína após o processamento pós-traducional. Em relação ao GH humano, estudos já demonstraram que o GH secretado pela glândula pituitária não é glicosilado, enquanto o GH secretado pela placenta durante a gravidez é glicosilado (Ray et al., 1989; Frankenne et al., 1990).

Com relação à estrutura tridimensional do GH, Venugopal e colaboradores (2002b) observaram que os GHs das três espécies de carpas indianas “rohu” (*Labeo rohita*), “mrigal” (*Cirrhina mrigala*) e “catla” (*Catla catla*), similar ao GH humano, apresentam estrutura proteica globular constituída de quatro α -hélices antiparalelas e duas ligações dissulfeto entre as cadeias (figura 3).

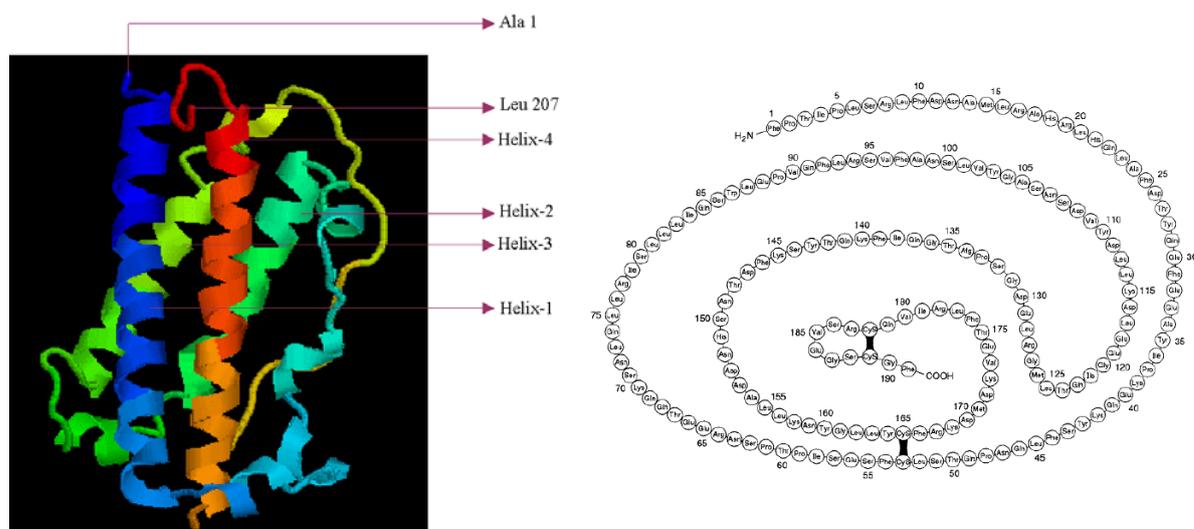


Figura 3. Modelos estruturais do GH em vertebrados. À esquerda: modelo molecular da estrutura 3D do GH de *Labeo rohita* mostrando as quatro α -hélices antiparalelas. É a estrutura tridimensional consenso para as moléculas de GHs. À direita: o GH humano com as duas ligações dissulfeto entre as cadeias.

Fonte: Venugopal e colaboradores (2002b); Norman (1997) in Bayraktar (2009).

O GH tem sido amplamente utilizado em estudos endocrinológicos, eficiência no consumo alimentar, composição nutricional e crescimento de peixes. Visto que em condições fisiológicas a quantidade endógena do GH é extremamente baixa e sua disponibilidade é limitada (Li et al., 2003), a expressão heteróloga é uma importante alternativa para produção exógena de maiores níveis deste hormônio, o que pode viabilizar a realização de estudos voltados para a fisiologia e desempenho zootécnico das espécies de peixes utilizadas na piscicultura. Entre as espécies utilizadas na piscicultura mundial, cuja expressão heteróloga de GH foi realizada com sucesso, estão: carpa comum (*Cyprinus carpio*), “Indian major carps” (*Labeo rohita*; *Cirrhina mrigala*; *Catla catla*), tilápia (*Oreochromis sp*), dourada (*Sparus aurata*), “red sea bream” (*Pagrus major*), atum (*Thunnus albacares*), “barramundi” (*Lates calcarifer*), salmão (*Oncorhynchus kisutch*), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), “turbot” (*Scophthalmus maximus*), “flounder” (*Paralichthys olivaceus*), “striped bass” (*Morone saxatilis*), “sea bass” (*Lateolabrax japonicas*) e enguia (*Anguilla japonica*) (Moriyama & Kawachi, 1990; Fine et al., 1993; Venugopal et. al., 2002ab; Funkenstein et al., 2006; Acosta et al., 2007; Costa et al., 2016).

Em relação às espécies de peixes amazônicas não há relatos da utilização de GHs recombinantes (rGH) de peixes em estudos fisiológicos ou zootécnicos. O único relato encontrado com este objetivo foi realizado com o tambaqui, o qual utilizou rGH bovino

comercial (Paz, 2015). Apesar do cenário lacunoso, percebe-se um interesse crescente da comunidade científica por este campo de estudo, o que pode ser observado por meio da expansão das pesquisas em Biologia Molecular em vários laboratórios e centros de pesquisa da Região Norte.

Até o presente, o tambaqui vem sendo a única espécie amazônica contemplada com a expressão heteróloga do GH, no entanto, ainda há muitas questões a serem investigadas, em especial àquelas envolvendo as seguintes indagações: (a) quais os níveis de produção obtidos nos sistemas de expressão heteróloga utilizados, eucarioto e/ou procaríoto? (b) como esses níveis podem ser melhorados? (c) quais os efeitos do rtGH sobre os peixes cultivados? (d) sua utilização na piscicultura é possível/viável?

Por fim, esses estudos consistem não só numa possibilidade de desenvolvimento e inovação biotecnológica, mas, sobretudo, abrem as portas para o surgimento de novas perspectivas na piscicultura brasileira cada vez mais articulada à Biotecnologia Aquática.

3.2 O sistema de expressão *Pichia pastoris*

3.2.1 Características gerais

Pichia pastoris é uma levedura metilotrófica cujas características genéticas e fisiológicas possibilitam usá-la como sistema de expressão para proteínas heterólogas. Essa levedura foi inicialmente desenvolvida como sistema hospedeiro para transformação com DNA heterólogo por Cregg e colaboradores em 1985 que produziram a mutante GS115 a partir da linhagem selvagem NRRL-Y 11430 (*Northern Regional Research Laboratories, Peoria, IL*). A mutante GS115 possui deficiência metabólica na biossíntese do aminoácido histidina (His^-), sendo incapaz de crescer em meio auxotrófico para esse aminoácido. A transformação auxotrófica baseia-se na restauração da mutação no gene *his4* que codifica a enzima histidinol desidrogenase, que é a quarta enzima da via biossintética da histidina. Os transformantes podem ser selecionados por restaurarem a habilidade de sintetizar a sua própria histidina (His^+) e crescerem em meio auxotrófico. O gene *lacZ* (codificador da β -galactosidase), fusionado num vetor contendo o fragmento do promotor AOX1, regulado por metanol, foi o primeiro gene expresso nesta levedura (Tschopp et al., 1987).

Pelo fato de *P. pastoris* apresentar status GRAS, os primeiros estudos realizados na década de 1970, pela empresa Phillips Petroleum Company (EUA), eram primordialmente

voltados à possibilidade de usá-la como fonte de proteína barata na alimentação animal. Embora esse objetivo não tenha se concretizado, o maior avanço advindo dessa época foi o desenvolvimento das primeiras técnicas de fermentação envolvendo grandes volumes de cultura e elevadas densidades celulares, superiores a 100 gramas por litro de peso celular seco (Cregg et al., 1993). Desse modo, o cultivo de *P. pastoris* pode ser facilmente realizado em todas as escalas, desde frascos até grandes fermentadores (Siegel & Brierley, 1989; Romanos, 1995), sendo útil para produzir quantidades em miligramas até gramas de proteínas heterólogas, seja em laboratórios de pesquisas básicas ou em plataformas industriais.

Como a produção de proteínas funcionais está intimamente relacionada à maquinaria celular do organismo hospedeiro (Macauley-Patrick et al., 2005), as células eucarióticas dispõem de habilidades de processamento proteico ausentes em células procarióticas. Dessa forma, o mérito de *P. pastoris* como sistema de expressão está associado ao fato de a mesma combinar características importantes de organismos eucariotos e procariotos. Essas características incluem a fácil manipulação genética e o rápido crescimento celular inerente aos procariotos, com uma complexa maquinaria celular que possibilita as modificações pós-traducionais tipicamente associadas aos eucariotos superiores, tais como o processamento da sequência sinal, dobramento da proteína, formação de ligações dissulfeto e clivagem proteolítica (Cregg et al., 1985, 1993, 2000).

Entre as características vantajosas de *P. pastoris* como sistema de expressão heteróloga estão: (a) a alta frequência de transformação por DNA heterólogo; (b) o uso de vetores integrativos por complementação homóloga diretamente no genoma celular, o que acarreta maior estabilidade genética dos recombinantes; (c) os altos níveis de expressão proteica intra ou extracelular sob controle de promotores fortes e induzíveis, como o promotor AOX1 do gene da enzima álcool oxidase I; (d) possibilidade de secreção da proteína de interesse e baixa produção de proteínas endógenas; (e) a disponibilidade de técnicas de manipulação genética e fermentativa padronizadas, acompanhadas de uso comercial; e (f) as modificações pós-traducionais mais compatíveis com as encontradas em eucariotos (Cregg et al., 1993; Cereghino & Cregg 2000; Cereghino et al., 2002; Macauley-Patrick et al., 2005). Proteínas ineficientemente expressas em bactérias, *Saccharomyces cerevisiae* ou células de insetos/baculovírus têm sido produzidas com sucesso e na forma funcional em *P. pastoris* (Cereghino et al., 2002).

A expressão de qualquer gene heterólogo em *P. pastoris* requer três passos básicos: (a) a inserção do gene no vetor de expressão; (b) a introdução do vetor de expressão no genoma

da levedura; e (c) a examinação do potencial de expressão do produto gênico da linhagem hospedeira (Cereghino & Cregg, 2000; Macauley-Patrick et al., 2005; Li et al., 2007).

3.2.2 Metabolismo do metanol e o promotor AOX1

Nas leveduras metilotróficas, o metanol é metabolizado como fonte de carbono alternativa à glicose. A utilização de metanol por *P. pastoris* requer uma nova via metabólica com a presença de algumas enzimas exclusivas desta via. O metanol é inicialmente oxidado nos peroxissomos pela ação da enzima álcool oxidase (AO), produzindo formaldeído e peróxido de hidrogênio. O formaldeído gerado poderá seguir duas vias metabólicas: geração de energia ou formação de constituintes celulares, conforme ilustrado na figura 4.

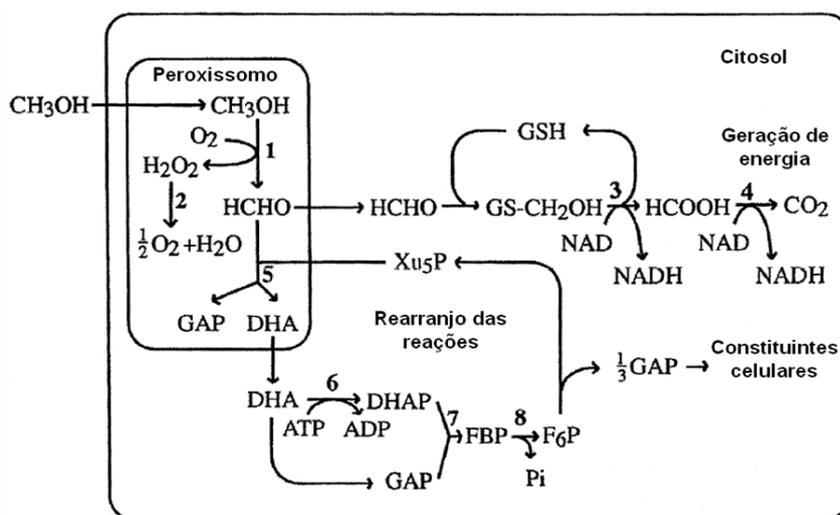


Figura 4. Via metabólica do metanol em *P. pastoris*. Enzimas da via: 1-álcool oxidase; 2-catalase; 3-formaldeído desidrogenase; 4-formato desidrogenase; 5-diidroxiacetona sintase; 6-diidroxiacetona cinase; 7-frutose 1,6-bifosfato aldolase; 8-frutose 1,6-bifosfatase. Abreviações: GAP: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; DHA: diidroxiacetona; DHAP: diidroxiacetona fosfato; FBP: frutose 1,6-bifosfato; F₆P: frutose 6-fosfato; Xu₅P: 5-fosfato de xilulose.

Fonte: Cereghino & Cregg (2000) com modificações.

Durante o crescimento de *P. pastoris* em metanol a enzima AO constitui a proteína mais abundante da célula, chegando a representar mais de 30 % do total das proteínas solúveis da célula, sendo a produção desta enzima a base conceitual para a utilização de *P. pastoris* como sistema de expressão (Couderc & Baratti, 1980; Cereghino & Cregg, 2000).

A enzima AO é codificada por dois genes distintos existentes no genoma de *P.*

pastoris: *aox1*, responsável por 90 % da expressão, e *aox2*, responsável por 10 % da expressão (Cregg et al., 1993; Cregg, 1999). A enzima expressa pelo *aox2* é 97 % idêntica à expressa por *aox1*, com atividade conservada (Cregg et al., 1989, 1993; Koutz et al., 1989). A expressão de ambos os genes é regulada a nível transcricional pelos respectivos promotores AOX1 e AOX2. O promotor AOX1 é fortemente regulado pela fonte de carbono adicionada ao meio de cultura: na presença de glicose ou glicerol a expressão é reprimida e, na presença de metanol como única fonte de carbono, induzida mais de mil vezes. Em células expostas ao metanol como única fonte de carbono o promotor AOX1 é responsável por até 5 % da transcrição dos RNAs poli-A⁺ totais, os quais são indetectáveis em células cultivadas em outras fontes de carbono, como glicose ou glicerol (Cregg et al., 1993; Cereghino & Cregg, 2000). O elevado nível transcricional do promotor AOX1 é comparável aos promotores dos genes constitutivos expressos na via glicolítica, a exemplo do promotor PGK, do gene codificador da enzima fosfoglicerato cinase.

3.2.3 Glicosilação

Outra característica importante da levedura *P. pastoris* é o seu perfil de glicosilação durante o processamento pós-traducional de proteínas transitantes na via de secreção. Aproximadamente 0,5 % a 1 % das proteínas traduzidas nos genomas eucarióticos são glicoproteínas (Daly & Hearn, 2005). A glicosilação ocorre no lúmen do retículo endoplasmático seguida de processamento no complexo de Golgi (Bretthauer & Castellino, 1999). Em *P. pastoris* e em outros eucariotos, as proteínas que possuem o sítio sinal de glicosilação Asn-X-Ser/Thr estão susceptíveis à adição de cadeias oligossacarídicas N-ligadas ao resíduo de Asn (asparagina) ou O-ligadas em quaisquer dos resíduos de Ser (serina) ou Thr (treonina) (Cregg, 1999; Cregg et al., 2009).

Tem sido relatado que a glicosilação pode servir como um controle de qualidade antes da proteína entrar na via de secreção (Ellgaard & Helenius, 2003) e/ou aumentar a resistência da proteína contra a degradação proteolítica (Pratap et al., 2000), auxiliar no dobramento correto e na passagem pela via secretória, bem como aumentar a estabilidade e a termoestabilidade da proteína madura (Rayon et al., 1998; Romanos et al., 1992; Daly & Hearn, 2005). No entanto, há relatos de que a N-glicosilação extensiva pode reduzir a termoestabilidade enzimática (Tull et al., 2001).

Em revisão bibliográfica, Li e colaboradores (2007) observaram que a maioria das

proteínas heterólogas N- ou O-glicosiladas expressadas em *P. pastoris* preservaram a bioatividade encontrada na proteína nativa não glicosilada. A outra parte teve a bioatividade intensificada e apenas uma minoria apresentou bioatividade inferior à da proteína nativa.

3.2.4 Linhagens e vetores

Atualmente várias linhagens de *P. pastoris* estão disponíveis. A escolha da linhagem específica é determinada pela aplicação desejada. As linhagens hospedeiras de *P. pastoris* frequentemente utilizadas nos experimentos de expressão heteróloga são as mutantes GS115, KM71 e SMD1163/SMD1165/SMD1168. Todas essas linhagens possuem mutação no gene *his4*, não crescendo em meio sem o aminoácido histidina – fenótipo His⁻. Além dessa mutação, a linhagem KM71 não é funcional para o gene *aox1*, dependendo da enzima álcool oxidase produzida a partir do gene *aox2* para metabolizar metanol – fenótipo Mut^s. E as três linhagens SMD1163, SMD1165 e SMD1168 são proteases defeituosas devido à mutação nos genes *pep4* (SMD1163), *prb1* (SMD1165) ou ambos (SMD1168).

Os vetores de expressão utilizados para *P. pastoris* carregam um gene que atua como marcador de seleção auxotrófica. O mais comum é o HIS4 (gene da enzima histidinol desidrogenase), que complementa o gene *his4* mutado na maioria das linhagens hospedeiras disponíveis, restaurando a habilidade de sintetizar o aminoácido histidina nos transformantes – fenótipo His⁺. Os vetores de expressão também possuem a região promotora (AOX1) e terminadora (TT) do gene *aox1* para o controle da indução da expressão gênica e término da transcrição, respectivamente. Esses vetores ainda possuem o gene de resistência a ampicilina (*Amp*) e a origem de replicação de *E. coli*, características importantes para a manipulação dos vetores durante a clonagem nessa bactéria.

Embora a levedura *P. pastoris* tenha se mostrado um eficiente sistema de expressão de proteínas, tanto intra quanto extracelular, neste último caso existe a vantagem de a levedura secretar baixos níveis de proteínas endógenas, o que faz da secreção da proteína heteróloga uma efetiva etapa de purificação, já que o produto encontra-se no sobrenadante da cultura, separado dos outros componentes celulares (Cregg et al., 1993; Cereghino & Cregg, 2000).

Para a expressão extracelular, têm sido empregados vetores acrescidos de uma sequência codificadora de um peptídeo sinal de secreção localizada imediatamente após a região promotora AOX1. O fator- α de *S. cerevisiae* é a sequência sinal frequentemente utilizada nos vetores comerciais. No entanto, vetores contendo a sequência sinal derivada do

gene da enzima fosfatase ácida também estão disponíveis (Cregg et al., 2000). Na Figura 5, são mostradas as principais regiões comumente encontradas em vetores usados para transformação de *P. pastoris*.

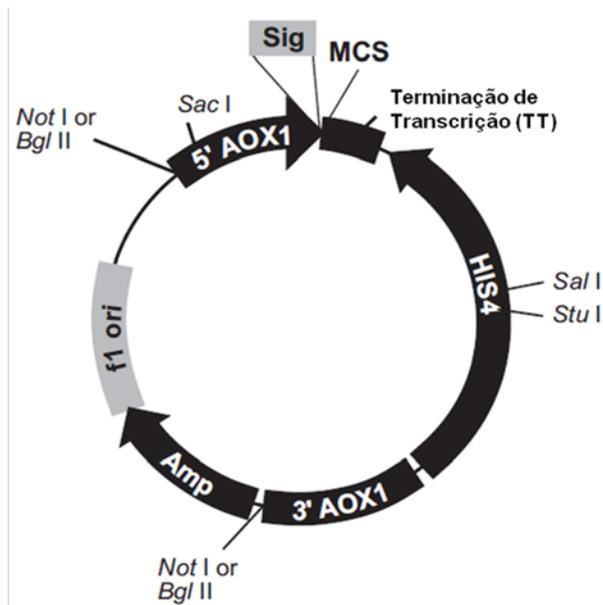


Figura 5. Vetor de expressão padrão para a levedura *P. pastoris*. A maioria dos vetores desenvolvidos para esta levedura compartilham as características gerais mostradas em preto (regiões: 5' AOX1 – promotor; MCS – múltiplo sítio de clonagem; HIS4 – gene da enzima histidinol desidrogenase; 3' AOX1 – região homóloga ao genoma da levedura; Amp – gene de resistência a ampicilina), enquanto outros possuem uma sequência sinal (Sig) e/ou origem em bacteriófago (f1 ori), mostrado em cinza.

Fonte: Invitrogen (2010) com modificações.

3.2.5 Transfomação

A transformação de *P. pastoris* ocorre por meio da integração do vetor ou cassete de expressão no interior do genoma da levedura, o que garante maior estabilidade genética dos transformantes e evita perda do gene heterólogo (Sreekrishna et al., 1997; Chiruvolu et al., 1997; Cereghino & Cregg, 2000). Os mecanismos pelos quais essa integração pode ocorrer são por adição ou substituição gênica (Cregg et al., 1993). No caso da adição gênica, para garantir maior eficiência na transformação, o vetor circular com o gene de interesse deve ser linearizado por clivagem enzimática em um dos sítios de restrição nas regiões HIS4 ou 5'AOX1 existentes nos vetores de expressão. A linearização nesses sítios estimula a ocorrência de adição gênica por simples *crossover* (recombinação) entre as regiões HIS4 ou AOX1 do vetor e os respectivos *loci* homólogos existentes no genoma da levedura. Nesses casos, após a transformação, os genes *aox1* e *aox2* continuam funcionais no genoma da

levedura e os transformantes gerados apresentam fenótipo Mut⁺ (*methanol utilization plus*), cuja característica é a máxima habilidade celular de metabolizar o metanol ($\mu = 0,14 \text{ h}^{-1}$), exibindo um rápido crescimento em meio contendo metanol como única fonte de carbono (Brierley et al., 1990; Cregg et al., 1993; 2000). Esse é o fenótipo encontrado na levedura selvagem. As Figuras 6 e 7 mostram a integração por adição do vetor ao genoma de *P. pastoris* por meio de recombinação homóloga nas regiões HIS4 e AOX1, respectivamente, existentes nos vetores de expressão.

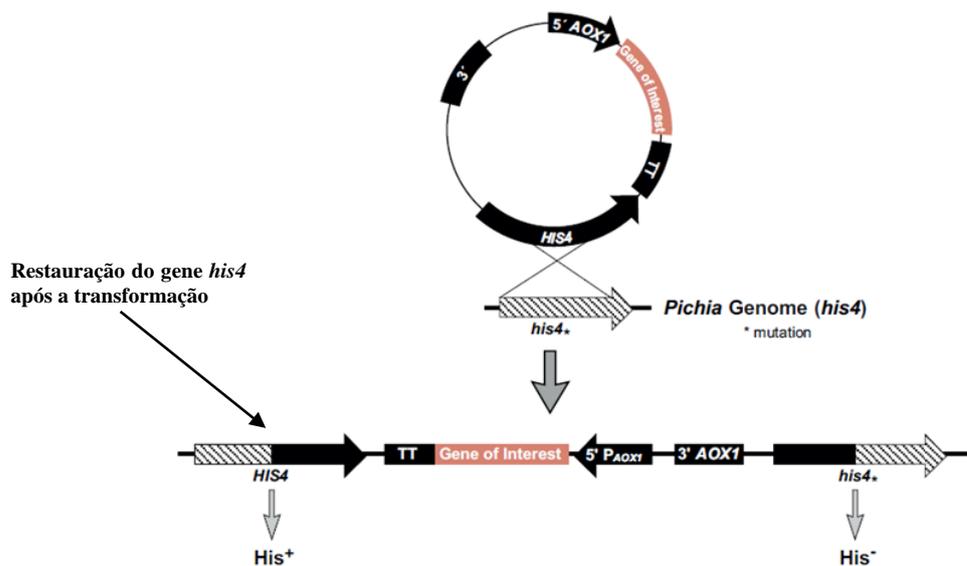


Figura 6. Integração por adição do vetor ao genoma de *P. pastoris*. A integração ocorre por recombinação simples entre a região HIS4 do vetor com a região homóloga no genoma da levedura. O gene *his4* mutado no genoma é restaurado durante a recombinação com a região HIS4 não mutada do vetor.

Fonte: Invitrogen (2010) com modificações.

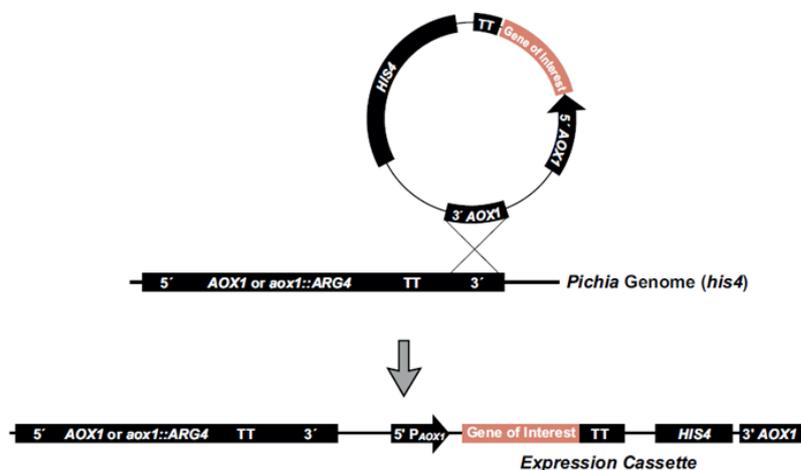


Figura 7. Integração por adição do vetor ao genoma de *P. pastoris*. A integração ocorre por recombinação simples entre a região 3' AOX1 do vetor com a região homóloga no genoma da levedura. O gene *his4* mutado no genoma é restaurado durante a recombinação com a região

HIS4 não mutada do vetor.

Fonte: Invitrogen (2010) com modificações.

Na transformação por substituição gênica, o vetor de expressão deve ser clivado no sítio da endonuclease *Bgl*II para liberação do cassete de expressão, o qual é flanqueado com as regiões 5'AOX1 (promotor) e 3'AOX1 (ver Figura 8). Durante a transformação, essas regiões interagem com as respectivas regiões homólogas existentes no genoma da levedura, estimulando a ocorrência de um duplo *crossover* (fenômeno menos frequente que o simples *crossover*), com eventos de substituição gênica: o cassete de expressão substitui o *locus* do gene *aox1* no genoma da levedura (Cregg et al., 1993; 2000). Dessa forma, o gene *aox1* sofre um *knockout* (silenciamento) e o metabolismo do metanol passa a ser realizado apenas pela enzima AO produzida pelo gene *aox2*, gerando transformantes com fenótipo Mut^s (*methanol utilization slow*), cuja característica é a habilidade reduzida da célula de metabolizar o metanol ($\mu = 0,01-0,04 \text{ h}^{-1}$), exibindo um lento crescimento em meio contendo metanol como única fonte de carbono (Brierley et al., 1990). Algumas proteínas são expressadas em níveis mais elevados nesse fenótipo do que no fenótipo Mut⁺, especialmente em culturas de frascos agitados (Higgins & Cregg, 1998; Cregg et al., 1993, 2000; Daly & Hearn, 2005).

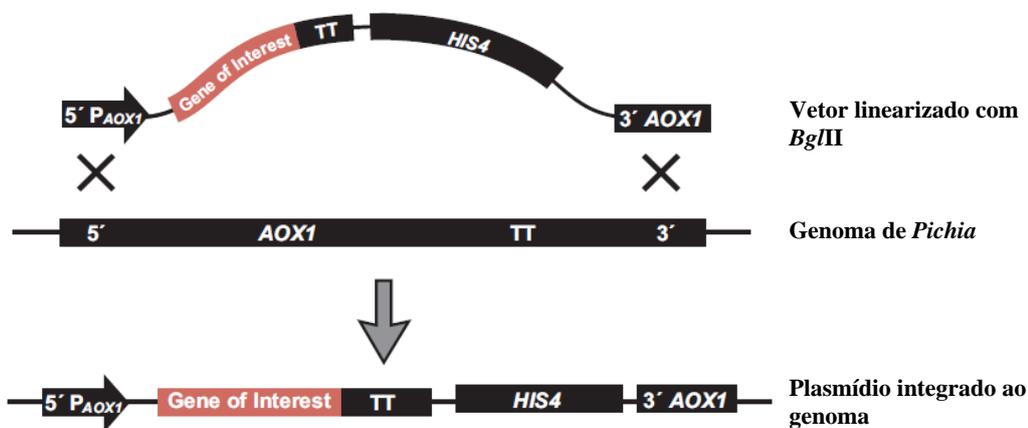


Figura 8. Integração por substituição gênica do vetor com o genoma de *P. pastoris*. A substituição ocorre por recombinação dupla entre as regiões 5'AOX1 e 3'AOX1 (ambas no promotor) com as respectivas regiões homólogas no genoma da levedura. Esse tipo de integração resulta em transformantes de fenótipo Mut^s.

Fonte: Invitrogen (2010) com modificações.

Tanto na transformação por adição quanto na substituição gênica, uma porcentagem significativa dos transformantes His⁺ poderá não conter o vetor de expressão. Isso ocorre devido a um evento de conversão entre o gene HIS4 do vetor e o *locus his4* da levedura, de modo que o gene tipo selvagem HIS4 entra no genoma sem qualquer outra sequência

adicional do vetor. Esse evento pode ocorrer em 10 a 50 % das colônias transformantes His⁺ (Romanos, 1995; Cregg et al., 2000). Apenas 5 % a 35 % dos transformantes são oriundos de substituição gênica (Mut^s), os demais são originados das integrações por adição em HIS4 ou AOX1 e são Mut⁺ (Romanos, 1995).

Desta forma, após a transformação de *P. pastoris* com o gene de interesse, o passo seguinte será a determinação fenotípica e a seleção dos clones capazes de expressar os melhores níveis da proteína recombinante. Feito isso, a etapa seguinte será a realização de experimentos de melhoramento da produção da proteína recombinante levando em consideração os fatores relacionados à expressão heteróloga em *P. pastoris*.

3.3 Fatores relacionados à expressão heteróloga em *P. pastoris*

Estudos que buscam o estabelecimento de bioprocessos otimizados para produção de proteínas recombinantes em *P. pastoris* têm demonstrado que a produção heteróloga nesta levedura pode ser afetada por numerosos parâmetros relacionados à biologia e ao bioprocessamento. Os parâmetros biológicos mais importantes são: (a) seleção da linhagem hospedeira; (b) vetor de expressão; (c) promotor para transcrição do gene alvo; (d) peptídeo sinal para secreção da proteína recombinante; e (e) seleção dos clones transformantes, sendo necessário um número significativo de transformantes, devido às diferentes possibilidades de integração gênica no genoma da hospedeira, variação no número de cópias do gene ou a orientação dos múltiplos cassetes de expressão (Zhu et al., 2009; Barnard et al., 2010; Brooks et al., 2013; Ahmad et al., 2014; Schwarzshans et al., 2016; Eck et al., 2018). Além desses parâmetros, a sequência nativa do cDNA a ser expresso e os códons preferenciais mais utilizados na maquinaria celular da levedura também exercem influência sobre o nível de expressão heteróloga (Damasceno et al., 2004; Khatri, 2011; Rothan et al., 2014).

Dentre os parâmetros relacionados ao bioprocessamento, os mais importantes são: (a) composição do meio de cultivo (Ghosalkar et al., 2008; Liu et al., 2011); (b) seleção da fonte de carbono (Varnai et al., 2014); (c) temperatura (Dragosits et al., 2009); (d) valor do pH (Holmes et al., 2009); e (e) oxigênio dissolvido no sistema (Charoenrat et al., 2005; Baumann et al., 2008). Além desses parâmetros, o tempo de indução e a concentração do indutor também exercem influência sobre o nível de expressão heteróloga (Cregg et al., 1993; D'Anjou & Daugulis, 2000; Damasceno et al., 2004; Khatri, 2011).

A expressão heteróloga em *P. pastoris* pode ser realizada tanto em nível de bancada,

em sistemas de microplacas ou frascos agitados, como em nível de produção industrial em biorreatores. Os sistemas de microplacas e frascos agitados são, no geral, empregados nos experimentos de triagens das linhagens mais produtivas e nas fases iniciais de desenvolvimento e otimização de bioprocessos (Eck et al., 2018). Nesses sistemas, a introdução de metanol na cultura geralmente ocorre por pulsos padronizados, o que ao contrário de uma alimentação contínua, pode levar a longos períodos de exaustão do metanol e baixa atividade do promotor AOX1 (Potvin et al., 2012). Além disso, os severos efeitos da limitação de oxigênio sobre o metabolismo celular resultante das baixas taxas de transferência de oxigênio nesses sistemas podem comprometer, nos experimentos de triagem, o sucesso da seleção das linhagens mais produtivas (Büchs, 2001; Eck et al., 2018).

Para superar tais dificuldades, nos últimos anos têm sido desenvolvidos sistemas de mini e microbiorreatores capazes de fornecer condições, tanto na triagem quanto nos estágios iniciais de desenvolvimento do bioprocessos, mais semelhantes ao processo de produção final adotado na indústria. Dentre as vantagens destes sistemas, estão a possibilidade de realização de cultivos paralelos em volumes menores de 1 mL a 100 mL, bem como maior eficiência na taxa de transferência de oxigênio e adoção de monitoramento óptico e fluorescente não invasivos, permitindo a medição paralela de parâmetros como formação de biomassa, pH e oxigênio dissolvido (Kirk & Szita, 2013; Wewetzer et al., 2015). A realização de bioprocessos conduzidos em batelada alimentada em sistemas de micro-escala ainda está em estágio inicial de desenvolvimento (Hemmerich et al., 2014; Lattermann & Büchs, 2015), sendo predominantemente utilizado para a triagem clonal (Wilmington et al., 2014; Eck et al., 2018).

De modo geral, os cultivos realizados em frascos agitados são tipicamente conduzidos no modo batelada, caracterizados por altas concentrações iniciais de substrato e tampão (Kennedy et al., 1994; Weuster-Botz et al., 2001; Kumar et al., 2004), enquanto os cultivos realizados em biorreatores são conduzidos no modo batelada alimentada ou contínua, caracterizados pelo fornecimento de substratos de acordo com a taxa de consumo e metabolismo do micro-organismo, implicando, assim, maior produtividade, o que justifica o fato destas últimas estratégias serem utilizadas na maioria dos bioprocessos industriais (Jeude et al., 2006).

A alta demanda por oxigênio no metabolismo do metanol faz do fornecimento de oxigênio o mais importante parâmetro no cultivo de *P. pastoris* com produção heteróloga baseada no promotor AOX1. Em frascos agitados, as baixas taxas de transferência de oxigênio são bem documentadas (Büchs, 2001; Eck et al., 2018), dependentes basicamente da

agitação do líquido no interior do frasco. Em biorreatores, a concentração ideal de oxigênio dissolvido no meio deve ser mantida por meio do fornecimento de ar e/ou oxigênio puro ao sistema (Khatri, 2011). De acordo com a literatura, a concentração ideal pode variar entre 20% a 30 % de saturação na fase líquida (Invitrogen, 1996; Stratton et al., 1998).

Por causa das limitações na transferência de oxigênio, o nível de expressão heteróloga obtido a partir de culturas em frascos agitados pode não refletir com precisão o nível observado em culturas de biorreatores (Cregg et al., 1993). Em frascos agitados, o cultivo de *P. pastoris* induzido por metanol pode alcançar um nível de produção de aproximadamente 5% do total de proteínas solúveis, ao passo que em biorreatores este nível pode chegar a valores superiores a 30 % (Burrowes et al., 2005; Randone, 2014).

Em biorreator, o cultivo de *P. pastoris* expressando um produto sob o controle do promotor AOX1 pode ser conduzido em três, ou em alguns casos, quatro fases: (a) batelada simples de glicerol; (b) batelada alimentada de glicerol; (c) batelada alimentada de metanol; e (d) uma fase de transição opcional entre as fases “b” e “c”. O objetivo das duas primeiras fases é a produção de biomassa, já que a produção heteróloga está associada à formação de biomassa e a taxa de crescimento específico de *P. pastoris* é maior em glicerol ($\mu = 0,24 \text{ h}^{-1}$) do que em metanol ($\mu = 0,14 \text{ h}^{-1}$) (Brierley et al., 1990; Jungo et al., 2006). O objetivo da terceira fase é a expressão da proteína heteróloga, pois é iniciada a indução do promotor AOX1 por metanol como única fonte de carbono. A quantidade de metanol introduzida ao sistema e a estratégia de controle utilizada no biorreator terá influência sobre a concentração de metanol residual, bem como sobre a taxa específica de crescimento da cultura e os níveis de expressão da proteína heteróloga (Khatri, 2011; Potvin et al., 2012).

Apesar de *P. pastoris* utilizar o metanol como fonte de carbono, altas concentrações deste substrato são tóxicas à célula devido ao acúmulo de formaldeído e peróxido de hidrogênio resultantes da oxidação do metanol pela enzima álcool oxidase (Couderc & Baratti, 1980; Cregg & Madden 1988; Randone, 2014; López-Pérez & Viniestra-González, 2017). Portanto, um bom monitoramento de metanol no sistema é fundamental para evitar o acúmulo de metanol residual e de metabólitos, assegurando o sucesso do bioprocesso (Randone, 2014).

A fase transicional (opcional) é caracterizada por uma coalimentação de glicerol e metanol, durante o tempo em que a alimentação de glicerol é diminuída lentamente e a alimentação de metanol é aumentada. Nas estratégias em que esta fase de transição é incluída, o objetivo é melhorar a adaptação das células ao metanol e, conseqüentemente, melhorar a

expressão da proteína heteróloga (Zhang et al., 2000; Minning et al., 2001; Khatri, 2011).

Além das fases acima, é recomendado um tempo de inanição entre as fases de produção de biomassa em glicerol (“a” e “b”) e a fase de indução em metanol (“c”) para consumo pela célula de substâncias com potencial inibitório da expressão como glicerol residual e subprodutos residuais como etanol, por exemplo (Inan & Meagher, 2001; Randone, 2014).

Durante a revisão literária, pôde-se observar a existência de notável variação nos níveis de produção de GHs heterólogos no sistema *P. pastoris*. De modo geral, essa variação depende dos diversos parâmetros mencionados anteriormente e também da estratégia de produção adotada, seja em frascos agitados ou em biorreator. Em sistema de frascos agitados, tomando o rGH humano como ponto de referência, Ecamilla-Treviño e colaboradores (2000) obtiveram níveis de expressão de 3-11 mg/L de rGH humano, enquanto Apte-Deshpande e colaboradores (2009), combinando diferentes meios de cultivos com surfactantes (Tween 20 e Tween 80), obtiveram de 8-240 mg/L, sendo este o valor máximo obtido para a produção de rGH humano em frascos agitados até o presente. Para rGHs de peixes, o maior nível de expressão relatado foi para o GH de *C. carpio*, com 300-400 mg/L (Li et al., 2003), uma superexpressão, considerando-se o sistema utilizado caracterizado, como já mencionado anteriormente, por limitações no fornecimento de oxigênio.

Em biorreatores, os níveis de produção relatados (em *P. pastoris*) para o rGH humano variam de 49 mg/L (Ecamilla-Treviño et al., 2000) a ~500 mg/L, enquanto em bactérias são reportados níveis de expressão significativamente superiores na faixa de 0,5-2 g/L (Apte-Deshpande et al., 2009), o que nos permite inferir, além da acentuada variação, uma expressão heteróloga relativamente baixa quando comparada ao sistema de expressão procarioto. Para rGHs de peixes, o maior nível relatado até o presente é para o rGH de tilápia, com 1,5-2 g/L (Acosta et al., 2007), nível este considerado excepcional para a expressão de GHs no sistema *P. pastoris*.

Considerando as vantagens do sistema de expressão *P. pastoris*, essa levedura foi o organismo hospedeiro escolhido para a realização da presente tese, que se propôs a investigar o potencial de expressão do rGH nesta hospedeira em sistema de frascos agitados e biorreator, buscando também encontrar as condições ótimas dos parâmetros relacionados ao meio de cultivo para expressão otimizada em frascos agitados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estratégia utilizada

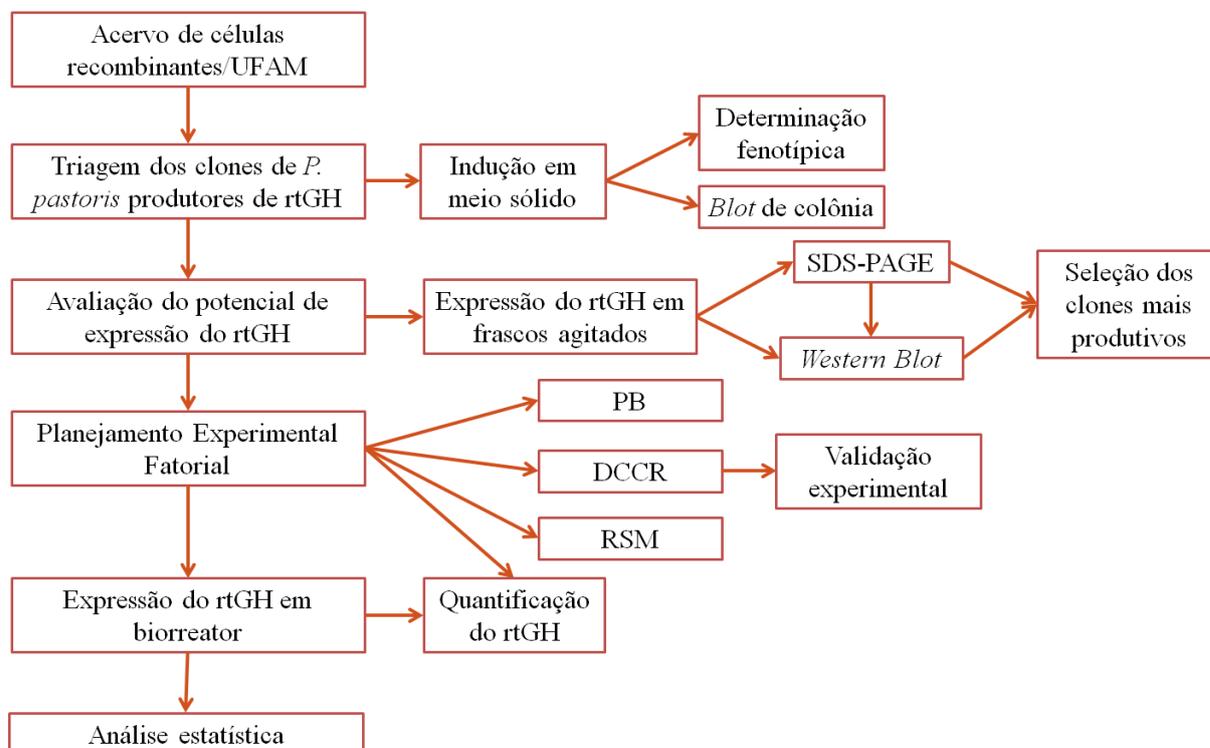


Figura 9. Fluxograma das etapas e experimentos que foram realizados ao longo da pesquisa. Abreviações: rtGH – Hormônio de crescimento recombinante de tabaqui; PB – Delineamento Plackett & Burman; DCCR – Delineamento composto central rotacional; RSM – Metodologia de superfície de resposta.

4.2 Linhagens de hospedeiras

- *Pichia pastoris* GS115: linhagem comercial de fenótipo Mut⁺ e com mutação no gene *his4* codificador da enzima histidinol desidrogenase, o que conferi incapacidade de sintetizar o aminoácido histidina (His⁻), não crescendo em meio auxotrófico para esse aminoácido. Os transformantes são selecionados por sua habilidade de crescer em meio sem histidina (Invitrogen, 2010). Essa linhagem foi utilizada como controle negativo nos experimentos de transformação gênica da levedura.

- *Pichia pastoris* GS115/pPIC-tGH/Mut⁺: linhagem recombinante obtida no Laboratório de Tecnologias do DNA Recombinante da UFAM portadora do cDNA

codificador para rtGH. Esta linhagem possui fenótipo Mut⁺ e foi utilizada para avaliação do potencial de expressão do rtGH (Sadalla-Pinto, 2012).

- *Pichia pastoris* **GS115/pPIC-tGH/Mut^s**: linhagem recombinante obtida no Laboratório de Tecnologias do DNA Recombinante da UFAM portadora do cDNA codificador para rtGH. Esta linhagem possui fenótipo Mut^s e foi utilizada para avaliação do potencial de expressão do rtGH (Sadalla-Pinto, 2012).

- *Pichia pastoris* **GS115/pPIC-GLA/Mut⁺**: linhagem recombinante obtida no Laboratório de Tecnologias do DNA Recombinante da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) portadora do cDNA codificador para enzima glicoamilase (Carmo, 2010). Esta linhagem possui fenótipo Mut⁺ e foi utilizada como controle nos experimentos de determinação fenotípica e de indução do rtGH.

- *Pichia pastoris* **GS115/pPIC-GLA/Mut^s**: linhagem recombinante obtida no Laboratório de Tecnologias do DNA Recombinante da UFAM portadora do cDNA codificador para enzima glicoamilase (Carmo, 2010). Esta linhagem possui fenótipo Mut⁺ e foi utilizada como controle nos experimentos de determinação fenotípica e de indução do rtGH.

- *Pichia pastoris* **GS115/pPIC-TPP 61/Mut⁺**: linhagem recombinante obtida no Laboratório de Tecnologias do DNA Recombinante da UFAM portadora do gene codificador para a enzima trealose-6-fosfato fosfatase (Pessoa, 2014). Esta linhagem possui fenótipo Mut⁺ e foi utilizada como controle nos experimentos de validação do DCCR.

4.3 Triagem dos clones de *Pichia pastoris* GS115/pPIC-tGH/Mut⁺ e Mut^s produtores de rtGH

4.3.1 Determinação fenotípica

Para determinação dos fenótipos Mut⁺ e Mut^s foram aleatoriamente selecionados 136 clones transformantes de *P. pastoris* GS115/pPIC-tGH e os controles de fenótipo previamente determinados (GS115/pPIC-GLA/Mut⁺ e GS115/pPIC-GLA/Mut^s) para serem semeados no sistema de *replica-plating* nos meios MD e MM e, em seguida, incubados a 30 °C por três dias. Nas placas com meio MM foi adicionado cerca de 0,5 mL de metanol absoluto a cada 24 h. A diferença na velocidade de crescimento dos clones no meio MM revelou seus respectivos fenótipos: as células com crescimento mais rápido foram determinadas como Mut⁺ e as que cresceram mais lentamente como Mut^s.

4.3.2 Blot de colônia

Nesse experimento 136 clones de *P. pastoris* GS115/pPIC-tGH (128 Mut⁺ e 8 Mut^s) foram separadamente repicados com auxílio de palitos estéreis em quatro placas de Petri (34 clones cada) contendo meio de crescimento BMGU e incubados a 30 °C por 2 dias. Em seguida, os clones revigorados foram repicados para nova placa de Petri contendo meio de indução BMMU e incubados a 30 °C por 3 dias. Durante esse período foi adicionado 0,5 mL de metanol a cada 24 h para indução do rtGH. Após esse período, uma membrana de nitrocelulose com o mesmo tamanho das placas de Petri, foi posta sobre a cultura celular, seguida da sobreposição de várias camadas de papel de filtro e papel-toalha. A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose ocorreu por capilaridade em intervalo de quatro horas. Após esse período, foram retiradas as camadas de papel de filtro e papel-toalha e a membrana de nitrocelulose foi transferida para uma placa estéril com a superfície das colônias voltada para cima, onde foi lavada com tampão fosfato-salino tween – PBST (NaCl 150 mM; Na₂HPO₄ pH 7,2 10 mM; Tween 20 0,1%) para retirada do excesso de células e de meio de cultura. Após a lavagem, a membrana foi saturada por incubação de 30 minutos em solução bloqueadora do kit comercial *WesternBreeze*[®] *Chromogenic Immunodetection System* (*Life Technologies*). Em seguida, a membrana saturada foi tratada por 1 hora com o anticorpo primário Anti-His-Tag C-terminal (*Life Technologies*) na diluição de 1:5000 (v/v) em solução bloqueadora do mesmo kit. O anticorpo secundário e os demais reagentes utilizados também foram do kit *WesternBreeze*[®] *Chromogenic Immunodetection System*, cujos procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações técnicas do fabricante (Invitrogen, 2003). Após a revelação das amostras na membrana, a imagem foi documentada por digitalização em *scanner* (HP LaserJet M1212nf MFP). As manchas reveladas na membrana retratam as colônias de *P. pastoris* produtoras de rtGH.

4.4 Avaliação do potencial de expressão do rtGH em frascos agitados

4.4.1 Considerações iniciais

Após a revelação dos clones produtores de rtGH no experimento anterior, um número de dezessete clones (nove clones Mut⁺ e oito clones Mut^s) foram selecionados para o experimento de indução da expressão do rtGH em sistema de frascos agitados nas condições

padronizadas do manual técnico de expressão gênica em *P. pastoris* (Invitrogen, 2010), com algumas modificações, entre as quais a substituição da fonte de nitrogênio YNB por Ureia, que é um ingrediente mais barato, o qual foi utilizada em todos os experimentos de indução da expressão em frascos agitados, conforme mostrado na tabela abaixo.

Tabela 1. Parâmetros físicos, químicos e físico-químicos utilizados na expressão heteróloga em *P. pastoris* em frascos agitados.

| Parâmetro | Concentração sugerida |
|---------------------------------------|------------------------------|
| Temperatura (°C) | 30 |
| Agitação (rpm) | 250 |
| Extrato de Levedura (%) | 1,0 |
| Peptona (%) | 2,0 |
| Ureia ou YNB (%) | 1,34 |
| Tampão Fosfato (mM)* | 100 |
| Biotina (%) | 4 x 10⁻⁵ |
| Metanol (%) | 0,5 |
| Inóculo (D.O.₆₀₀)** | 1 |
| pH | 6,0 |

*Milimolar; **Densidade Ótica a 600 nanômetros.

4.4.2 Expressão do rtGH em *Pichia pastoris* em frascos agitados

Os procedimentos de indução da expressão do rtGH foram realizados conforme descrito a seguir: a expressão do rtGH foi dividida em dois momentos, uma fase de crescimento do pré-inóculo em glicerol, e outra fase de indução em metanol. Para aumento de massa celular, os clones selecionados foram inoculados em 25 mL de meio de cultura BMGU em erlenmeyer de 250 mL e incubados a 30 °C sob agitação de 250 rpm até a cultura alcançar D.O.₆₀₀ entre 2-6, em tempo aproximado de 18 a 24 horas. Ao atingir a D.O.₆₀₀ necessária, as culturas foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos a 4 °C, e as células precipitadas foram inoculadas em volume de 30 mL de meio BMMU em erlenmeyer de 250 mL com D.O.₆₀₀ inicial igual a 1,0. A indução do promotor AOX1 foi realizada por introdução de metanol absoluto a cada 24 horas às culturas celulares, mantendo uma concentração final de 0,5 % (v/v). A indução da expressão gênica foi realizada até 120 h a 30 °C sob agitação constante de 250 rpm. Após esse período, foram realizadas coletas das culturas induzidas e as mesmas foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos e os sobrenadantes imediatamente conservados a -80 °C para análises posteriores. A biomassa celular nos tempos de 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h de indução foi mensurada por meio da fórmula [Massa Celular (g/L) = 0,22 X D.O.₆₀₀] (Nakano et al., 2006). Os níveis de rtGH produzido por cada clone foram

comparados entre si em gel de proteínas SDS-PAGE e Western Blot. Por meio desta análise comparativa foi possível selecionar os clones mais produtivos em relação aos respectivos fenótipos Mut⁺ e Mut^s.

4.4.3 Análise do produto expresso em gel desnaturante SDS-PAGE

O sobrenadante das culturas após indução foi analisado em gel SDS-PAGE, conforme modificações da metodologia descrita por Sambrook e colaboradores (1989). Volumes de 1350 µL dos sobrenadantes foram precipitados com ácido tricloroacético (TCA) à concentração final de 10 % (v/v). Este sistema foi incubado por 15 minutos em banho de gelo e em seguida centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Os precipitados das proteínas foram lavados com acetona PA gelada e em seguida ressuspensos em 30 µL de tampão de amostra 2X SDS-PAGE [200 mM Tris pH 6,8; 0,1 % azul de bromofenol (p/v); 4 % SDS (v/v); 4 % β-mercaptoetanol; 20 % glicerol (v/v)]. As amostras foram fervidas em banho-maria por 5 minutos e prontamente incubadas em gelo até a aplicação no gel SDS-PAGE. A eletroforese foi realizada em tempo aproximado de duas horas nas seguintes condições: tensão 200 volts, corrente 25 mA e potência 30W. Após a corrida eletroforética, o gel com as proteínas separadas foi submerso por 30 minutos em solução fixadora [10 % ácido acético (v/v), 40 % metanol (v/v)] e em seguida corado com azul brilhante de *Coomassie* [0,1 % de *Coomassie* G-250 (p/v), ácido fosfórico 2 % (v/v), sulfato de amônio 10 % (p/v), metanol 20 % (v/v)] com incubação por uma noite. Após esse período, o gel foi submerso em solução descorante [10 % ácido acético (v/v), 40 % metanol (v/v)] e posteriormente teve sua imagem documentada por digitalização em *scanner* (UTA-1100) com software acoplado (LabScan 5.0 - *GE Healthcare*).

4.4.4 Análise do produto expresso em Western blotting

Em complementação às análises de proteínas em gel SDS-PAGE foi realizada Western blot para imunodeteção do rtGH no sobrenadante das culturas de *P. pastoris* GS115/pPIC-tGH Mut⁺ e Mut^s induzidas por metanol. Após a corrida eletroforética em gel SDS-PAGE, as proteínas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema de transferência semisseco Novex[®] Semi-Dry Blotter (Invitrogen) por aproximadamente 2 h nas

seguintes condições: 20 volts, 0,13 A, 1 W. A membrana de nitrocelulose com as proteínas imobilizadas foi tratada de acordo com os procedimentos realizados no item 4.3.2.

4.5 Otimização da expressão do rtGH em frascos agitados

4.5.1 Planejamento experimental

Nesta pesquisa, a otimização da expressão do rtGH em frascos agitados foi realizada sobre a composição do meio de cultivo, o qual teve os componentes modulados à produtividade da célula. Os parâmetros não relacionados ao meio de cultivo, que também podem influenciar a expressão heteróloga, como a temperatura e agitação, foram utilizados nas condições sugeridas pelo manual técnico de expressão gênica em *P. pastoris* (Invitrogen, 2010), conforme a tabela 1.

O planejamento experimental adotado foi baseado em estratégia sequencial constituída de dois delineamentos estatísticos. No primeiro lote experimental, foi utilizado o delineamento Plackett & Burman (PB) com objetivo de realizar uma triagem prévia (*screening design*) dos parâmetros que, de acordo com o conhecimento preliminar sobre o assunto, poderiam influenciar as respostas desejadas. Neste delineamento foram selecionados oito parâmetros (variáveis independentes), todos relacionados ao meio de cultivo, para serem avaliados: (X1) extrato de levedura, (X2) peptona, (X3) ureia, (X4) tampão fosfato, (X5) biotina, (X6) metanol, (X7) inóculo e (X8) pH.

Num segundo delineamento, os parâmetros selecionados pelo PB foram avaliados em um planejamento fatorial completo, utilizando-se o delineamento composto central rotacional (DCCR) ajustado para dois fatores, totalizando onze ensaios. Para validação dos resultados obtidos no DCCR, os mesmos foram submetidos à análise por Metodologia de Superfície Resposta (RSM) utilizando o programa STATISTICA 10. Na figura 10 está mostrado o cenário geral da estratégia sequencial utilizada, bem como o número de parâmetros e de ensaios para cada delineamento experimental.

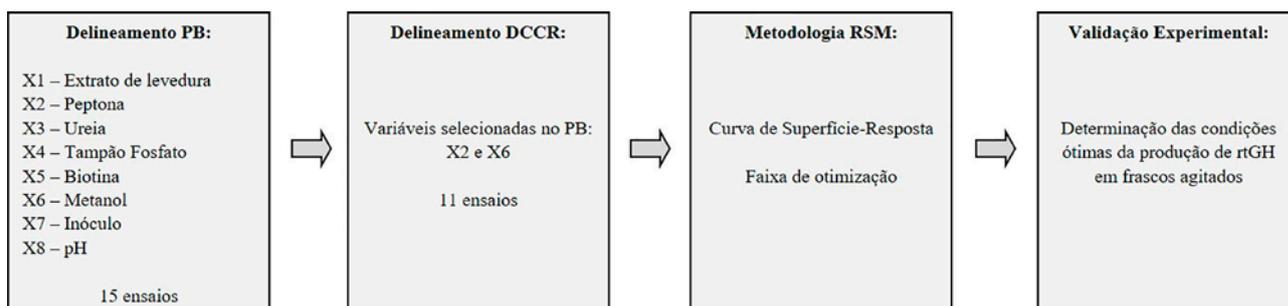


Figura 10. Estratégia experimental utilizada.

A seguir é apresentado um detalhamento dos delineamentos experimentais utilizados nesta pesquisa, objetivando a otimização da expressão do rtGH em frascos agitados.

4.5.2 Delineamento Plackett & Burman (PB)

Para definir os parâmetros mais significativos sobre a produção do rtGH foi utilizado o delineamento PB. Os parâmetros selecionados, como extrato de levedura, peptona, ureia, tampão fosfato, biotina, metanol, inóculo e pH, constituem as variáveis independentes. A produção de rtGH (mg/L) e formação de biomassa (g/L) constituem as variáveis dependentes (ou de resposta). Os níveis dos oito parâmetros selecionados estão mostrados na tabela 2. Os valores dos parâmetros no ponto central (nível 0) do PB foram os mesmos sugeridos pelo manual técnico de expressão gênica em *P. pastoris* (Invitrogen, 2010) – ver tabela 1 –, e a faixa de variação da região experimental foi baseada com base em informações da literatura (Cregg, 2007; Li et al., 2007; Weidner et al., 2010; Terrazas, 2012). Ao inserir estes níveis no programa STATISTICA 10.0 foi obtida a matriz do delineamento PB apresentados na tabela 3. Os ensaios de um a doze dessa matriz são ditos fatoriais devido ao fato de serem constituídos da combinação entre os níveis (+1 e -1) dos oito parâmetros, importante para determinação dos efeitos de cada parâmetro sobre as variáveis de resposta, viabilizando assim a seleção dos parâmetros mais significativos para serem avaliados no DCCR. Os ensaios de 13 a 15 são repetições do ponto central, importantes para dar robustez estatística ao delineamento (Rodrigues & Iemma, 2014).

Tabela 2. Valores utilizados no delineamento Plackett & Burman (PB) constituído por oito parâmetros.

| Parâmetros | Intervalo de variação | Nível | | |
|-------------------------|-----------------------|-------|-----|-----|
| | | -1 | 0 | +1 |
| Extrato de Levedura (%) | 0,5 | 0,5 | 1,0 | 1,5 |

| | | | | |
|---------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------------------------|--------------------|
| Peptona (%) | 1 | 1 | 2,0 | 3 |
| Ureia (%) | 0,67 | 0,67 | 1,34 | 2,01 |
| Tampão Fosfato (mM)* | 50 | 50 | 100 | 150 |
| Biotina (%) | 2×10^{-5} | 2×10^{-5} | 4×10^{-5} | 6×10^{-5} |
| Metanol (%) | 0,4 | 0,1 | 0,5 | 0,9 |
| Inóculo (D.O.₆₀₀)** | 0,5 | 0,5 | 1 | 1,5 |
| pH | 0,5 | 5,5 | 6,0 | 6,5 |

*Milimolar; **Densidade Ótica a 600 nanômetros.

Tabela 3. Matriz de dados codificados com as variáveis estudadas no delineamento Plackett & Burman (PB) para oito parâmetros e duas variáveis de resposta.

| <i>Ensaio</i> | <i>Parâmetros</i> | | | | | | | | <i>Variáveis de resposta</i> | |
|---------------|-------------------|----------------|--------------|-----------------------|----------------|----------------|----------------|-----------|--------------------------------|-----------------------------------|
| | <i>EL*</i> | <i>Peptona</i> | <i>Ureia</i> | <i>Tampão Fosfato</i> | <i>Biotina</i> | <i>Metanol</i> | <i>Inóculo</i> | <i>pH</i> | <i>Produção de rtGH (mg/L)</i> | <i>Formação de Biomassa (g/L)</i> |
| 1 | +1 | -1 | +1 | -1 | -1 | -1 | +1 | +1 | y1 ₁ | y2 ₁ |
| 2 | +1 | +1 | -1 | +1 | -1 | -1 | -1 | +1 | y1 ₂ | y2 ₂ |
| 3 | -1 | +1 | +1 | -1 | +1 | -1 | -1 | -1 | y1 ₃ | y2 ₃ |
| 4 | +1 | -1 | +1 | +1 | -1 | +1 | -1 | -1 | y1 ₄ | y2 ₄ |
| 5 | +1 | +1 | -1 | +1 | +1 | -1 | +1 | -1 | y1 ₅ | y2 ₅ |
| 6 | +1 | +1 | +1 | -1 | +1 | +1 | -1 | +1 | y1 ₆ | y2 ₆ |
| 7 | -1 | +1 | +1 | +1 | -1 | +1 | +1 | -1 | y1 ₇ | y2 ₇ |
| 8 | -1 | -1 | +1 | +1 | +1 | -1 | +1 | +1 | y1 ₈ | y2 ₈ |
| 9 | -1 | -1 | -1 | +1 | +1 | +1 | -1 | +1 | y1 ₉ | y2 ₉ |
| 10 | +1 | -1 | -1 | -1 | +1 | +1 | +1 | -1 | y1 ₁₀ | y2 ₁₀ |
| 11 | -1 | +1 | -1 | -1 | -1 | +1 | +1 | +1 | y1 ₁₁ | y2 ₁₁ |
| 12 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | y1 ₁₂ | y2 ₁₂ |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | y1 ₁₃ | y2 ₁₃ |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | y1 ₁₄ | y2 ₁₄ |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | y1 ₁₅ | y2 ₁₅ |

*Extrato de levedura.

4.5.3 DCCR

Nesta pesquisa a matriz do DCCR foi construída a partir dos parâmetros previamente selecionados no delineamento PB: metanol e peptona. A faixa de variação da região experimental do DCCR (tabela 4) foi definida com base em informações da literatura, considerando os limites de toxicidade de *P. pastoris* em relação às concentrações de metanol e peptona. A fórmula geral do DCCR executado foi: 2k (ensaios fatoriais) + 2 x k (ensaios axiais) + 3 (repetições do ponto central), onde k = número de níveis originais, nesse caso k = 2. Os ensaios axiais são aqueles em que ocorrem as combinações dos níveis $-\alpha$ e $+\alpha$. Utilizando o

programa STATISTICA 10 foi obtida a matriz com os dados codificados e as combinações possíveis entre os níveis dos parâmetros metanol e peptona. Portanto, este DCCR foi composto por duas variáveis independentes, combinadas em quatro ensaios fatoriais (ensaios de 1 a 4), quatro ensaios axiais (ensaios de 5 a 8) e três repetições do ponto central (ensaios de 9 a 11), com um total de 11 ensaios. As variáveis de resposta foram as mesmas do PB, produção de rtGH e a formação de biomassa (tabela 5).

Tabela 4. Faixa de variação da região experimental do DCCR executado.

| Parâmetros | Delta | Nível | | | | |
|-------------|-------|------------|-----|-----|-----|------------|
| | | - α | -1 | 0 | +1 | + α |
| Metanol (%) | 0,5 | 0,293 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 1,710 |
| Peptona (%) | 1,2 | 0,303 | 0,8 | 2,0 | 3,2 | 3,700 |

Tabela 5. Matriz de dados codificados e respostas avaliadas no DCCR executado.

| Ensaio | Variáveis independentes | | Variáveis de resposta | |
|--------|-------------------------|------------|-------------------------|----------------------------|
| | Metanol | Peptona | Produção de rtGH (mg/L) | Formação de Biomassa (g/L) |
| 1 | -1 | -1 | y1 ₁ | y2 ₁ |
| 2 | -1 | +1 | y1 ₂ | y2 ₂ |
| 3 | +1 | -1 | y1 ₃ | y2 ₃ |
| 4 | +1 | +1 | y1 ₄ | y2 ₄ |
| 5 | - α | 0 | y1 ₅ | y2 ₅ |
| 6 | + α | 0 | y1 ₆ | y2 ₆ |
| 7 | 0 | - α | y1 ₇ | y2 ₇ |
| 8 | 0 | + α | y1 ₈ | y2 ₈ |
| 9 | 0 | 0 | y1 ₉ | y2 ₉ |
| 10 | 0 | 0 | y1 ₁₀ | y2 ₁₀ |
| 11 | 0 | 0 | y1 ₁₁ | y2 ₁₁ |

No DCCR executado, os demais parâmetros como o extrato de levedura, ureia, tampão fosfato, biotina e inóculo foram ajustados de acordo com as concentrações sugeridas na tabela 1. O parâmetro pH, levando em consideração seu efeito negativo sobre a produção de rtGH no delineamento PB, foi ajustado de 6,0 para 5,0. Este ajuste também levou em consideração os trabalhos de Çalik e colaboradores (2010) e de Bayraktar (2009), que investigaram o efeito do pH sobre a produção do rGH humano na levedura *P. pastoris*, e concluíram que o pH 5,0 está mais relacionado à elevação da produção heteróloga, à redução da atividade de proteases e à maior estabilidade da molécula em temperatura ambiente.

4.5.4 RSM

Levando em consideração o objetivo de otimizar a produção do rtGH a partir da análise estatística da relação existente entre os componentes do meio de cultivo, somente os resultados obtidos para a variável de resposta produção do rtGH foram utilizados na análise da metodologia de superfície de resposta (RSM). Esta análise foi realizada com auxílio do programa STATISTICA 10.0.

4.6 Expressão do rtGH em biorreator

Os experimentos de expressão do rtGH em biorreator foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos (LADEBIO) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), supervisionados pelo Prof. Emérito Dr. Nei Pereira Jr. e sua equipe.

4.6.1 Condução do bioprocesso

Para a produção do rtGH em biorreator foi inicialmente preparado um inóculo a partir de uma colônia de *P. pastoris* GS115/pPIC-tGH/Mut⁺, previamente selecionada como a mais produtiva nos experimentos em frascos agitados. Frascos erlenmeyer de 1 L contendo de 200 – 300 mL de meio BMGU foram incubados a 30 °C e 250 rpm por 18 a 24 h até D.O.₆₀₀ = 2-6. Após esse período de incubação a cultura foi transferida para um biorreator instrumentado (BIOSTAT B, B. Braun Biotech International), com sensores de monitoramentos *online* de pH, oxigênio dissolvido e temperatura, acoplado a um vaso de capacidade para 4 L, sendo o volume de trabalho utilizado de 3 L. O meio de cultivo teve o pH previamente ajustado para 5,0, o qual foi mantido durante o bioprocesso com solução de hidróxido de amônio 28 %. A temperatura e aeração foram programadas para 30 °C e 5 – 18 L/min de ar filtrado, respectivamente. O oxigênio dissolvido foi programado para manter-se acima de 20 % de saturação e a agitação, ajustada de acordo com a demanda por oxigênio, entre 50 a 1000 rpm. Quando necessário, antiespumante (óxido de polipropileno) foi adicionado para eliminar o excesso de espuma. A fermentação teve duração de 80 h e foi dividida em duas fases: a primeira de formação de biomassa a partir de glicerol como única fonte de carbono, com duração de 28 h, e a segunda de indução da expressão heteróloga tendo o metanol como fonte de carbono e indutor, com duração de 52 h. O cultivo foi desenvolvido em meio FM22 com

concentração inicial de glicerol de 60 - 80 g/L. O biorreator foi operado em modo batelada até o glicerol ser totalmente consumido, em cerca de 26 h, seguido por um período de inanição de 60 – 90 min para consumo de eventuais resíduos de glicerol e inibidores da expressão heteróloga. Após esse período, a fase de indução foi iniciada com um pulso de 7,5 g/L de metanol contendo PTM4 na concentração de 4 mL/L. Após adaptação celular, no primeiro pulso, o metanol foi novamente adicionado na concentração de 15g/L, tal concentração foi baseada no trabalho de Orman e colaboradores (2009). O momento de exaustão do metanol foi acompanhado por meio do monitoramento do oxigênio dissolvido no sistema: o aumento repentino no nível de saturação do oxigênio dissolvido no meio indica uma diminuição do metabolismo celular em decorrência do consumo total do metanol, o que ocorreu em intervalos aproximados de 3 h. Ao longo do bioprocessamento, foram realizadas coletas das culturas e as mesmas centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos, sendo os sobrenadantes recuperados e imediatamente conservados a -80 °C para análises posteriores. A biomassa celular ao longo dos tempos de 0 h a 80 h de fermentação foi mensurada por meio da fórmula [Massa Celular (g/L) = 0,27 X D.O.₆₀₀] obtida na curva padrão de crescimento celular usando o espectrofotômetro Shimadzu UV 1601.

4.6.2 Quantificações de glicerol e metanol durante a fermentação

A determinação de glicerol e metanol foi efetuada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), usando o cromatógrafo líquido Shimadzu (Shimadzu), equipado com coluna Hi-Plex H (100 mm x 7,7 mm) e detector de índice de refração (RID). A temperatura foi mantida em 60°C, utilizando como fase móvel uma solução de ácido sulfúrico 5mM. O volume de amostra injetado foi de 0,5 mL.

4.7 Quantificação do rtGH

A quantidade de rtGH no sobrenadante das culturas induzidas foi realizada utilizando-se dois métodos descritos a seguir. Nas amostras oriundas da indução em frascos agitados foi utilizado o método de densitometria de bandas a partir da imagem obtida por digitalização do gel SDS-PAGE. Neste método, os volumes das bandas correspondentes ao rtGH foram calculados pelo programa ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare), sendo a concentração do rtGH calculada por meio de uma curva padrão e equação da reta obtidos a

partir dos volumes das bandas de um gradiente de massa conhecida, o BSA, aplicado no gel SDS-PAGE juntamente com as amostras do sobrenadante das culturas induzidas. Nas amostras oriundas da indução em biorreator, o rtGH foi quantificado pelo método de imunodeteção utilizando-se o His-Tag Protein ELISA Kit (*Cell Biolabs, Inc.*), conforme recomendações do fabricante.

4.8 Análise estatística

Com base nos resultados obtidos por meio da execução dos delineamentos baseados no método de Plackett-Burman (PB) e delineamento composto central rotacional (DCCR) foi realizada a análise da influência dos parâmetros do meio de cultivo sobre a produção de rtGH e formação de biomassa, por meio do diagrama de Pareto e RSM. O nível de confiança foi de 95%. As matrizes de dados codificados, os cálculos matemáticos para representação dos dados experimentais e análise de variância foram obtidos utilizando o programa STATISTICA 10.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Triagem dos clones de *Pichia pastoris* GS115/pPIC-tGH/Mut⁺ e Mut^s produtores de rtGH

Inicialmente foi realizada uma triagem dos clones de *P. pastoris* GS115/pPIC-tGH, de ambos os fenótipos, capazes de produzir altos níveis de rtGH. De um universo de 1812 transformantes, 136 foram tomados para o experimento blot de colônia. O resultado desse experimento revelou 135 transformantes positivos para a produção do rtGH. Na figura 11 é mostrado o resultado obtido nas placas “A”, “B”, “C” e “D”, onde as manchas correspondem aos clones de *P. pastoris* produtores de rtGH em diferentes níveis.

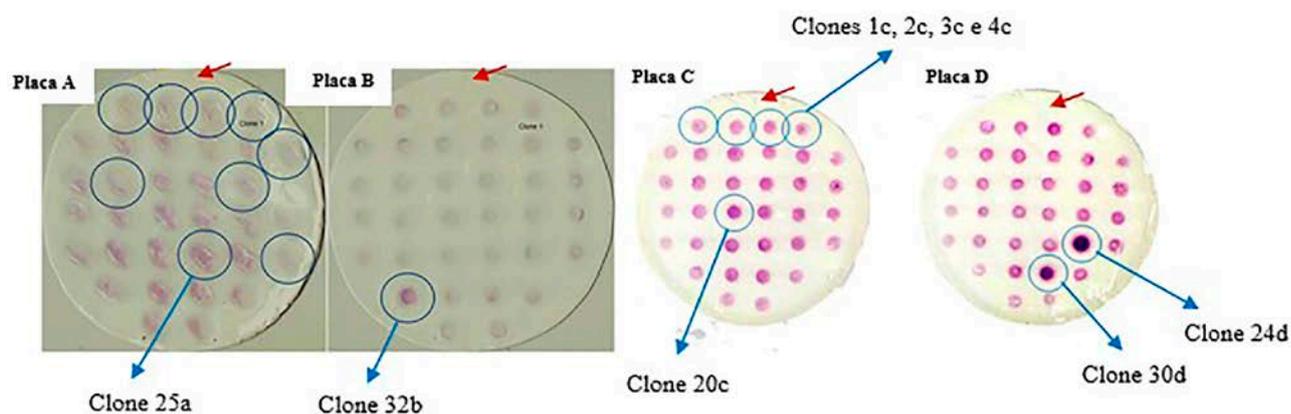


Figura 11. Blot de colônia dos clones de *P. pastoris* GS115/pPIC-tGH. As manchas indicam os clones que expressam o rtGH. Os controles negativos estão indicados por setas vermelhas na parte superior central de todas as imagens. Nos círculos estão os clones selecionados para os experimentos de indução em sistema de frascos agitados, e os círculos com seta indicam os clones com os melhores níveis de expressão obtidos neste trabalho.

A intensidade e o tamanho do sinal ao redor de cada colônia refletem aproximadamente o nível de secreção do produto recombinante pelos diferentes clones. No entanto, nem sempre essa correlação é linear (Cregg et al., 2009), por isso foi adotado o princípio da aleatoriedade na seleção dos clones para avaliação do potencial de expressão do rtGH em frascos agitados.

5.2 Avaliação do potencial de expressão heteróloga dos clones produtores de rtGH em frascos agitados

Após a indução em frascos agitados dos clones produtores de rtGH, os sobrenadantes das culturas induzidas foram analisados em gel de proteínas e por Western blot. Os resultados desses experimentos revelaram os transformantes capazes de produzir os melhores níveis de rtGH. Dos dezessete clones positivos no blot de colônia selecionados na figura 11, com intensidades de manchas variadas, cinco clones Mut⁺ e quatro clones Mut^s se destacaram como os melhores produtores de rtGH, nas induções em frascos agitados.

5.2.1 Fenótipo Mut⁺

Adiante estão os resultados obtidos no gel SDS-PAGE e Western blot dos clones produtores de rtGH do fenótipo Mut⁺. Na figura 12 são mostrados os perfis eletroforéticos em gel SDS-PAGE das proteínas obtidas dos sobrenadantes das culturas induzidas a partir dos melhores clones Mut⁺ produtores de rtGH.

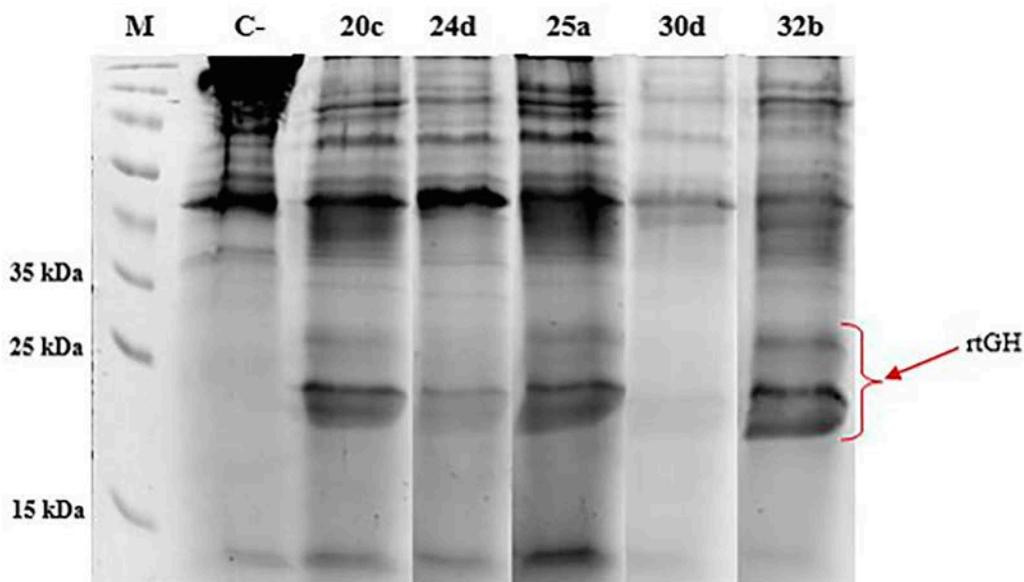


Figura 12. Perfil eletroforético de proteínas em gel SDS-PAGE 15 % corado em *Coomassie* do sobrenadante da cultura de diferentes clones *P. pastoris* GS115/pPIC-tGH/Mut⁺. Canaletas: M – marcador de massa molecular de proteínas (*Thermo Scientific Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder*); C-: controle negativo (GS115/pPIC-GLA/Mut⁺); 20c, 24d, 25a, 30d e 32b: clones produtores de rtGH em diferentes níveis.

Os resultados obtidos nos géis SDS-PAGE foram confirmados por Western blot (figura 13), indicando que os clones 20c, 25a e 32b apresentaram melhores níveis de produção do rtGH entre os clones de fenótipo Mut⁺ avaliados.

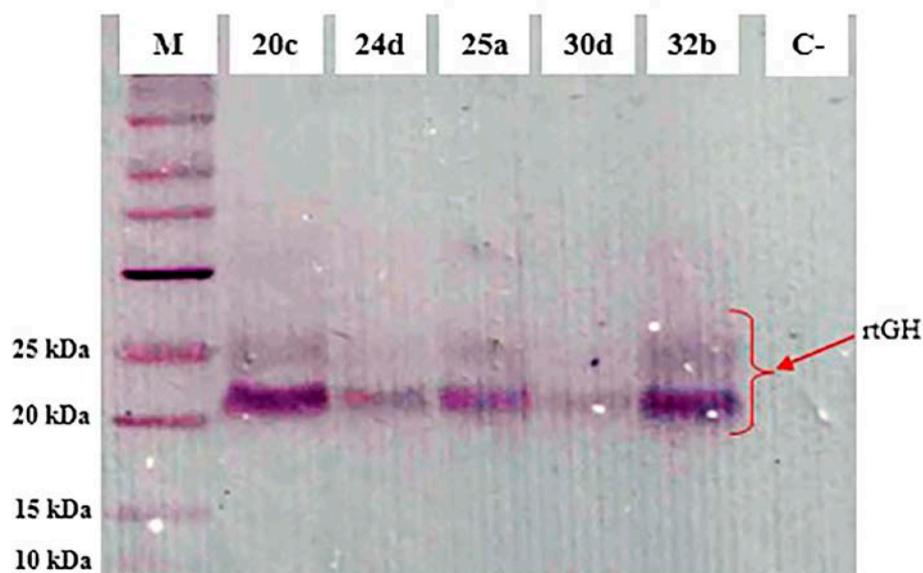


Figura 13. Western blot do sobrenadante da cultura de diferentes clones de *P. pastoris* GS115/pPIC-tGH/Mut⁺. Canaletas: M – marcador de massa molecular de proteínas (*InVision BenchMark His-tagged Protein Standard, Life Technologies*); 20c, 24d, 25a, 30d e 32b: clones produtores de rtGH; C-: controle negativo (GS115/pPIC-GLA/Mut⁺).

A análise comparativa da densidade das bandas, correspondentes ao rtGH dos clones de fenótipo Mut⁺ avaliados, revelou que o clone 32b foi o que apresentou maior nível de produção do rtGH, sendo, por isso, selecionado como o clone mais produtivo dentre os clones de fenótipo Mut⁺.

5.2.2 Fenótipo Mut^s

Adiante estão apresentados os resultados obtidos na triagem dos clones produtores de rtGH do fenótipo Mut^s. Dentre os oito transformantes Mut^s tomados para análise quatro se destacaram como melhores produtores de rtGH. Nas figuras 14 e 15 são, respectivamente, mostrados os perfis eletroforéticos em gel SDS-PAGE e Western blot das proteínas obtidas dos sobrenadantes das culturas desses quatro clones produtores de rtGH.

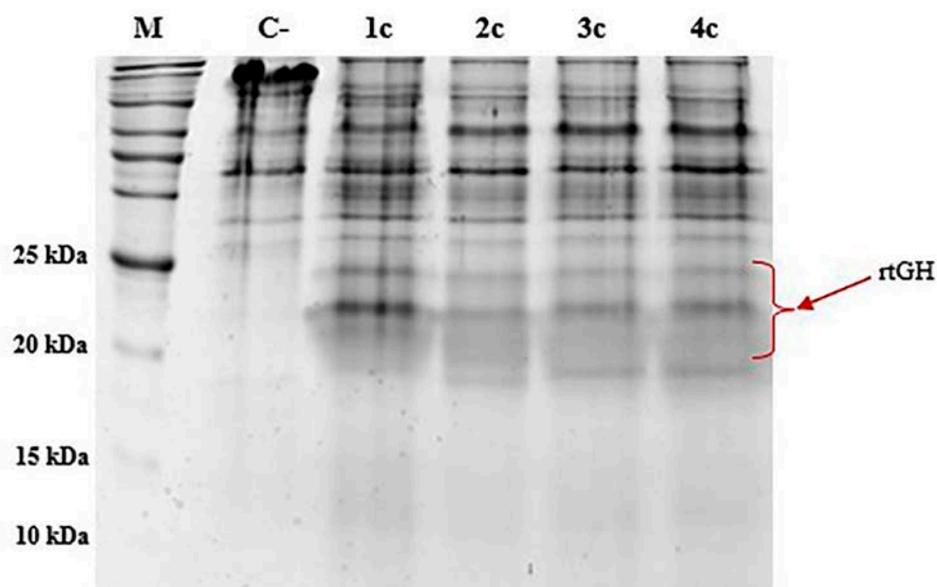


Figura 14. Perfil eletroforético de proteínas em gel SDS-PAGE 15 % do sobrenadante da cultura de diferentes clones de *P. pastoris* GS115/pPIC-tGH/Mut^s. Canaletas: M – marcador de massa molecular de proteínas (*InVision BenchMark His-tagged Protein Standard, Life Technologies*); C-: controle negativo (GS115/pPIC-GLA/Mut^s); 1c, 2c, 3c e 4c: clones produtores de rtGH em diferentes níveis.

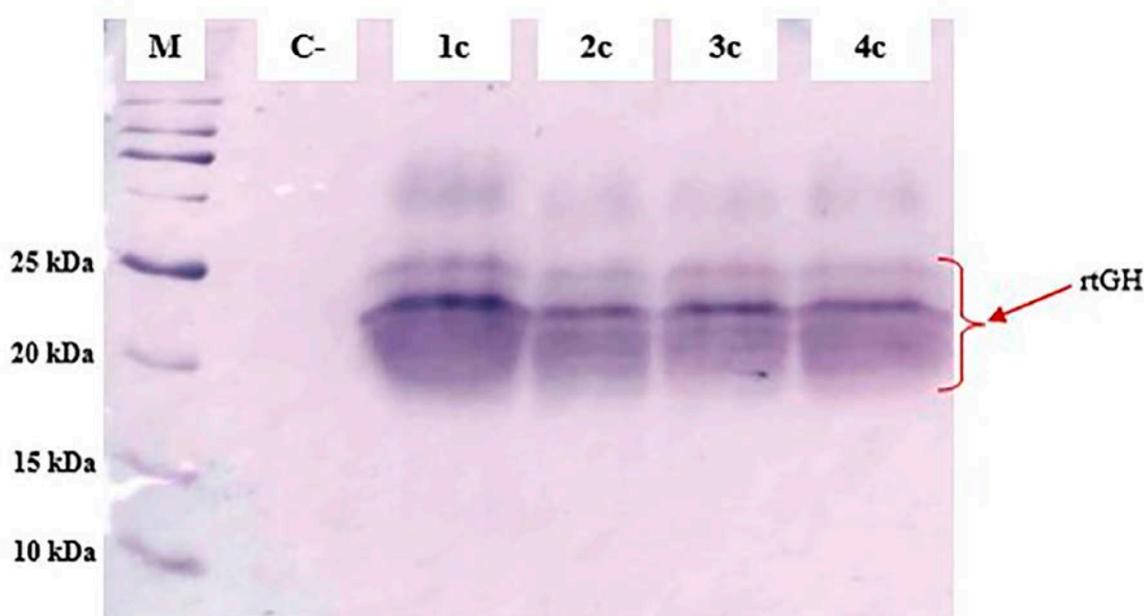


Figura 15. Western blot do sobrenadante da cultura de diferentes clones de *P. pastoris* GS115/pPIC-tGH/Mut^s. Canaletas: M – marcador de massa molecular de proteínas (*InVision BenchMark His-tagged Protein Standard, Life Technologies*); C-: controle negativo (GS115/pPIC-GLA/Mut^s); 1c, 2c, 3c e 4c: clones produtores de rtGH em diferentes níveis de expressão.

A análise comparativa da densidade das bandas, correspondentes ao rtGH dos clones de fenótipo Mut^s avaliados, revelou que o clone 1c foi o que apresentou maior nível de

produção do rtGH, sendo, por isso, selecionado como o clone mais produtivo dentre os clones de fenótipo Mut^s.

Como mencionado anteriormente, existem vários fatores que podem influenciar o nível de expressão heteróloga em *P. pastoris*. Nos experimentos de triagem clonal realizados neste trabalho, os fatores como composição do meio de cultivo, agitação, pH, temperatura, inóculo, concentração de indutor (metanol) e volume de meio/frascos utilizados foram homogeneizados para todos os experimentos de indução, com o objetivo de possibilitar uma análise comparativa do potencial de expressão do rtGH de cada clone avaliado, levando em consideração a influência de fatores biológicos, como o fenótipo e a existência de multicópias da sequência do *tgh* integrada ao genoma, os quais podem atuar sobre a capacidade da célula em produzir diferentes níveis de rtGH.

Os transformantes multicópias - aqueles com mais de uma cópia do cassete de expressão integrado ao genoma da levedura - ocorrem na proporção de 1 a 10% dos transformantes. Vários trabalhos (Brierley et al., 1994; Clare et al., 1991a; Romanos et al., 1991; Scorer et al., 1993; Scorer et al., 1994) têm demonstrado que múltiplos eventos de integração podem aumentar os níveis de expressão da proteína heteróloga. No entanto, como a determinação dos transformantes multicópias não fornece garantias quanto ao aumento dos níveis de expressão heteróloga, a avaliação do potencial de expressão clonal tem sido realizada diretamente na quantificação da proteína recombinante, sendo essa análise geralmente realizada por gel SDS-PAGE (Invitrogen, 2010).

Neste trabalho, embora não tenha sido realizado nenhum método de detecção de multicópias (análise quantitativa de dot blot e Southern blot), ficou evidenciado que, em frascos agitados, os clones 32b/Mut⁺ e 1c/Mut^s demonstraram um desempenho superior de produção do rtGH em relação aos demais clones avaliados.

Considerando que um dos objetivos desta pesquisa foi otimizar a expressão do rtGH em *P. pastoris* em sistema de frascos agitados, uma triagem para busca dos clones transformantes mais produtivos se fez necessária, o qual foi realizado por meio da análise comparativa da densitometria de bandas em gel SDS-PAGE e os resultados acima demonstram o sucesso dessa etapa.

5.2.3 Seleção do fenótipo Mut⁺ para otimização da expressão do rtGH

Conforme discutido anteriormente, o fenótipo é um dos fatores biológicos

responsáveis por variações nos níveis de expressão heteróloga em *P. pastoris*. Para uma comparação global dos níveis de expressão heteróloga de qualquer proteína recombinante entre os fenótipos Mut⁺ e Mut^s se faz necessário primeiro otimizar as condições de indução específicas para cada fenótipo, levando em consideração as demandas intrínsecas por metanol, bem como pelos diferentes ingredientes do meio e dos fatores associados ao crescimento celular.

Ao longo dessa pesquisa, as condições otimizadas de expressão do rtGH para ambos fenótipos Mut⁺ e Mut^s não foram determinadas, impossibilitando, neste momento, indicar com segurança o fenótipo de *P. pastoris* mais produtivo de rtGH. No entanto, considerando a necessidade de prosseguimento da pesquisa, o fenótipo Mut⁺ foi selecionado para os experimentos seguintes de otimização da expressão do rtGH em sistema de frascos agitados e produção em biorreator.

5.3 Otimização da expressão do rtGH em frascos agitados

5.3.1 Delineamento Plackett & Burman (PB)

Na Tabela 6 é apresentada a matriz com os valores dos oito parâmetros avaliados no delineamento PB, e os resultados obtidos para as variáveis de resposta (produção de rtGH e formação de biomassa) após 72 h de indução do clone 32b/Mut⁺, nas diferentes condições ensaiadas.

Tabela 6. Matriz com os parâmetros avaliados no delineamento Plackett & Burman (PB) constituído por doze ensaios fatoriais e três repetições do ponto central. Nas duas colunas da direita estão mostrados os resultados obtidos para as duas variáveis de resposta (produção de rtGH e formação de biomassa) após 72 horas de indução do clone 32b/Mut⁺.

| <i>Ensaios</i> | <i>EL (%)</i> | <i>Peptona (%)</i> | <i>Ureia (%)</i> | <i>T.Fosfato (mM)</i> | <i>Biotina (%)</i> | <i>Metanol (%)</i> | <i>Inóculo (D.O.)</i> | <i>pH</i> | <i>Produção de rtGH (mg/L)</i> | <i>Formação Biomassa (g/L)</i> |
|----------------|---------------|--------------------|------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|-----------------------|-----------|--------------------------------|--------------------------------|
| 1 | 1,5 | 1 | 2,01 | 50 | 2 x 10 ⁻⁵ | 0,1 | 1,5 | 6,5 | 0,22 | 1,13 |
| 2 | 1,5 | 3 | 0,67 | 150 | 2 x 10 ⁻⁵ | 0,1 | 0,5 | 6,5 | 0,29 | 1,56 |
| 3 | 0,5 | 3 | 2,01 | 50 | 6 x 10 ⁻⁵ | 0,1 | 0,5 | 5,5 | 0,24 | 0,77 |
| 4 | 1,5 | 1 | 2,01 | 150 | 2 x 10 ⁻⁵ | 0,9 | 0,5 | 5,5 | 0,51 | 3,00 |
| 5 | 1,5 | 3 | 0,67 | 150 | 6 x 10 ⁻⁵ | 0,1 | 1,5 | 5,5 | 0,40 | 1,51 |
| 6 | 1,5 | 3 | 2,01 | 50 | 6 x 10 ⁻⁵ | 0,9 | 0,5 | 6,5 | 0,72 | 2,62 |
| 7 | 0,5 | 3 | 2,01 | 150 | 2 x 10 ⁻⁵ | 0,9 | 1,5 | 5,5 | 1,35 | 2,57 |
| 8 | 0,5 | 1 | 2,01 | 150 | 6 x 10 ⁻⁵ | 0,1 | 1,5 | 6,5 | 0 | 0,93 |
| 9 | 0,5 | 1 | 0,67 | 150 | 6 x 10 ⁻⁵ | 0,9 | 0,5 | 6,5 | 0,36 | 2,37 |
| 10 | 1,5 | 1 | 0,67 | 50 | 6 x 10 ⁻⁵ | 0,9 | 1,5 | 5,5 | 0,48 | 2,66 |
| 11 | 0,5 | 3 | 0,67 | 50 | 2 x 10 ⁻⁵ | 0,9 | 1,5 | 6,5 | 1,01 | 2,40 |

| | | | | | | | | | | |
|-----------|----------|----------|-------------|------------|--------------------------------------|------------|----------|----------|-------------|-------------|
| 12 | 0,5 | 1 | 0,67 | 50 | 2×10^{-5} | 0,1 | 0,5 | 5,5 | 0,15 | 0,86 |
| 13 | 1 | 2 | 1,34 | 100 | 4×10^{-5} | 0,5 | 1 | 6 | 0,49 | 2,10 |
| 14 | 1 | 2 | 1,34 | 100 | 4×10^{-5} | 0,5 | 1 | 6 | 0,64 | 2,10 |
| 15 | 1 | 2 | 1,34 | 100 | 4×10^{-5} | 0,5 | 1 | 6 | 0,48 | 2,19 |

Pode-se afirmar que a execução do delineamento PB acima foi de boa qualidade, visto que os valores das respostas obtidas nas tréplicas do ponto central (ensaios 13, 14 e 15) foram aproximados e sem diferenças significativas. A discussão deste resultado será realizada em dois momentos levando em consideração as variáveis de resposta: inicialmente para a produção de rtGH e, posteriormente, para a formação de biomassa.

No delineamento PB executado, a variação na produção do rtGH, nas condições ensaiadas, foi de 0 a 1,35 mg/L. Os maiores níveis de produção foram observados nos ensaios 7 e 11, com 1,35 mg/L e 1,01 mg/L de rtGH, respectivamente. Em comparação com o ponto central, onde a produção média de rtGH foi de 0,54 mg/L, esses valores representam um aumento de 2,6 vezes e 1,9 vez superiores, respectivamente. Mas o que esses ensaios têm em comum para influenciar positivamente a produção do rtGH? Tais ensaios têm em comum a presença de níveis superiores (+1) dos parâmetros metanol, peptona e inóculo, bem como níveis inferiores (-1) dos parâmetros biotina e extrato de levedura (ver tabela 3). As variações dos demais parâmetros – concentração de ureia, tampão fosfato e pH – foram independentes das respostas obtidas, o que pode ser interpretado como parâmetros de baixa influência sobre a produção de rtGH.

Por outro lado, os ensaios 8 e 12 foram os que apresentaram os menores níveis de produção de rtGH. Na condição 8 não foi detectada a presença de rtGH no sobrenadante da cultura, e na condição 12 a produção de rtGH foi cerca de 3,5 vezes inferior à do ponto central. Ao analisar a influência dos parâmetros, observa-se que os baixos níveis de produção do rtGH estão relacionados, principalmente, à presença de níveis inferiores (-1) de metanol e peptona, sendo os demais parâmetros de menor importância sobre a produção heteróloga. Logo, em análise inicial, utilizando o delineamento PB, da influência dos parâmetros do meio de cultivo sobre a expressão heteróloga do rtGH, é possível identificar a importância e o efeito positivo dos parâmetros metanol e peptona. Sabe-se que um efeito positivo ou negativo de um fator sobre a resposta desejada significa que um aumento nos valores desse fator é acompanhado de um aumento ou uma diminuição da resposta, respectivamente (Rodrigues & Iemma, 2014).

Com a análise estatística dos dados obtidos para as variáveis de resposta foi possível obter informações sobre a importância de cada parâmetro em relação à produção de rtGH. Os

valores gerados no delineamento PB estão representados na forma de diagrama de Pareto. Por meio desse diagrama, pode-se verificar o efeito de cada parâmetro sobre as respostas desejadas.

Em relação à variável de resposta produção de rtGH, de acordo com o diagrama de Pareto na figura 16, foi observado que o metanol é o parâmetro com efeito mais significativo, seguido da peptona, biotina e inóculo. O diagrama mostra ainda que o metanol, a peptona e o inóculo possuem um efeito positivo, o que significa dizer que o aumento da concentração desses parâmetros é acompanhado de um aumento da produção de rtGH. Por outro lado, a biotina, a qual desempenha um papel essencial como cofator para realização de reações de carboxilação e descarboxilação em importantes vias metabólicas (como, por exemplo, biossíntese de ácidos graxos, gliconeogênese e metabolismo de aminoácidos) (Streit & Entcheva, 2003; Gasser et al., 2010), possui um efeito negativo, demonstrando que este componente, embora essencial para o cultivo de *P. pastoris*, deve ser utilizado em baixas concentrações para a produção do rtGH nesta linhagem. Os demais parâmetros, tais como pH, extrato de levedura, ureia e tampão fosfato não apresentaram efeito significativo sobre a produção de rtGH.

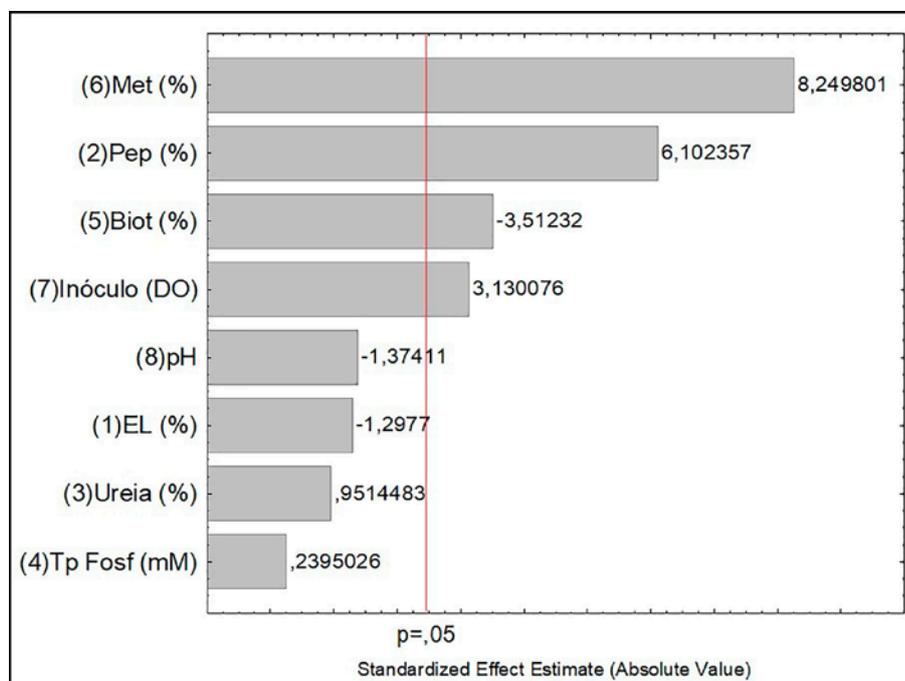


Figura 16. Diagrama de Pareto obtido a partir do delineamento Plackett & Burman, de oito parâmetros avaliados, tendo como variável de resposta a produção do rtGH. Abreviações: Met: metanol; Pep: peptona; Biot: biotina; EL: extrato de levedura e Tp Fosf: tampão fosfato.

Em relação à variável de resposta formação de biomassa, durante a indução da

expressão do rtGH, no delineamento PB, as maiores respostas foram obtidas nos ensaios 4, 6 e 10, os quais não apresentam diferenças significativas entre si e compartilham do fato de apresentarem níveis superiores (+) dos parâmetros extrato de levedura e metanol. Contrariamente, os ensaios 3, 8 e 12 apresentaram as menores respostas para a formação de biomassa, os quais se caracterizam por apresentarem níveis inferiores (-) de extrato de levedura e metanol. Assim, é possível perceber a importância e o efeito positivo dos parâmetros metanol e extrato de levedura sobre a formação de biomassa durante a produção do rtGH, sendo os demais parâmetros de baixa significância sobre esta variável de resposta. Este resultado está descrito no diagrama de Pareto a seguir (figura 17).

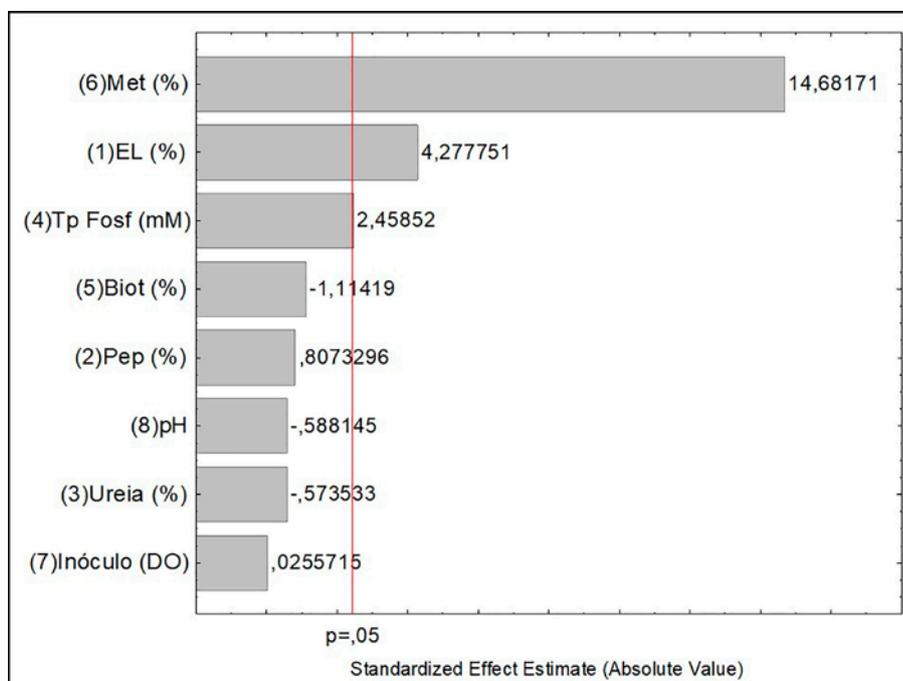


Figura 17. Diagrama de Pareto obtido a partir do delineamento Plackett & Burman, de oito parâmetros avaliados, tendo como variável de resposta a formação de biomassa. Abreviações: Met: metanol; Pep: peptona; Biot: biotina; EL: extrato de levedura e Tp Fosf: tampão fosfato.

Portanto, de acordo com o diagrama de Pareto na figura 17 foi observado que, em relação à formação de biomassa, o parâmetro metanol e o extrato de levedura foram os parâmetros mais significativos, seguidos de tampão fosfato, no limiar da significância, todos com efeito positivo, o que significa dizer que o aumento da concentração desses parâmetros é acompanhado por um incremento na formação de biomassa.

Em ambos delineamentos PB ficou evidenciada a importância do metanol como o parâmetro mais influente para as duas respostas desejadas, tanto para a produção heteróloga

do rtGH quanto para a formação de biomassa, o que pode ser justificado pelo seu duplo papel no sistema *P. pastoris*, atuando não só como fonte de carbono e energia para a formação de biomassa, mas também como indutor da transcrição dos genes associados ao promotor AOX, sob o qual o gene do rtGH está regulado.

Entretanto, conforme observado nos diagramas de Pareto apresentados (figuras 16 e 17), o segundo parâmetro mais significativo, depois do metanol, divergiu em função da resposta considerada: a peptona (produção do rtGH) e o extrato de levedura (formação de biomassa). Em análise comparativa desses diagramas, observa-se também que a peptona é mais significativa para a produção de rtGH (nível de significância de 6,10) do que o extrato de levedura o é para a formação de biomassa (nível 4,27). Ou seja, a melhor condição obtida para a variável de resposta “produção de rtGH” (ensaio 7) alcançou uma biomassa (2,57 g/L) próxima à alcançada pela melhor condição obtida para a variável de resposta “formação de biomassa” (ensaio 4 – biomassa igual a 3,0 g/L).

Seguindo este mesmo raciocínio, quando considerado somente a variável de resposta produção de rtGH, observa-se uma diferença acentuada, de 0,51 mg/L e 1,35 mg/L, entre os valores dos ensaios 4 e 7, respectivamente. Assim, pode-se afirmar que tanto a peptona quanto o extrato de levedura são parâmetros importantes para a formação de biomassa. No entanto, em relação à produção de rtGH, entre estes dois parâmetros, a peptona está significativamente associada à maior produtividade do que o extrato de levedura. A análise dos parâmetros que influenciam a formação de biomassa é um passo importante para se alcançar a otimização da produção heteróloga nesta levedura, visto que a produção de proteínas heterólogas em *P. pastoris* está associada à formação de biomassa (Li et al., 2007).

A importância da peptona, tanto para a produção do rtGH como para a formação de biomassa, deve-se ao fato de este componente ser fundamental na composição de meios de cultivo, destacando-se como complexa fonte de nitrogênio, aminoácidos e vitaminas, dependendo do tipo de material proteico digerido (carne, caseína, gelatina, entre outros).

Em relação à biotina, por ter demonstrado efeito negativo sobre a produção do rtGH no delineamento PB, pode-se inferir que, para obtenção dos melhores níveis de expressão do rtGH, deve-se utilizar baixas concentrações deste componente.

Os parâmetros escolhidos neste primeiro delineamento experimental, utilizando-se frascos agitados, foram aqueles mais associados à composição dos meios de cultivo padronizados para esta levedura. Outros parâmetros importantes, como a temperatura e agitação, foram mantidos de acordo com o considerado ótimo pela literatura (Cregg, 2007;

Cregg et al., 2009; Li et al., 2007; Weidner et al., 2010). No entanto, é sabido que, em sistemas de frascos agitados, mesmo com todas as condições na faixa ótima, a formação de biomassa e a produção heteróloga continuam sendo limitadas pela disponibilidade de oxigênio, o que torna praticamente impossível a obtenção de concentrações celulares superiores a 13,3 g/L (Ramchuran et al., 2005; Randone, 2014) e altos níveis de produção heteróloga em *P. pastoris* neste sistema.

Visto que no presente trabalho foi adotada uma estratégia sequencial no planejamento experimental fatorial, objetivando a otimização da produção do rtGH em *P. pastoris*, no sistema de frascos agitados, os parâmetros considerados como mais significativos no delineamento PB – metanol e peptona – foram analisados no delineamento subsequente, o DCCR. Portanto, este resultado inicial fornece uma primeira impressão sobre a influência de cada parâmetro avaliado no *screening design*, ficando evidentes aqueles parâmetros que possuem efeito significativo e não significativo, seja na produção de rtGH, seja na formação de biomassa.

5.3.2 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Na tabela abaixo é apresentada a matriz do DCCR com os valores das concentrações das variáveis independentes avaliadas (metanol e peptona), bem como os resultados obtidos para as variáveis de resposta (produção de rtGH e formação de biomassa) após 72 h de indução em sistema de frascos agitados.

Tabela 7. Matriz de dados e respostas obtidas no DCCR executado por 72 h de indução em sistema de frascos agitados.

| <i>Ensaios (DCCR)</i> | <i>Metanol (%)</i> | <i>Peptona (%)</i> | <i>Produção de rtGH (mg/L)</i> | <i>Biomassa (g/L)</i> |
|-----------------------|--------------------|--------------------|--------------------------------|-----------------------|
| 1 | 0,5 | 0,8 | 0 | 2,00 |
| 2 | 0,5 | 3,2 | 0,30 | 2,12 |
| 3 | 1,5 | 0,8 | 0,15 | 2,50 |
| 4 | 1,5 | 3,2 | 0,45 | 2,66 |
| 5 | 0,29 | 2,0 | 0 | 1,55 |
| 6 | 1,71 | 2,0 | 0,42 | 2,67 |
| 7 | 1,0 | 0,30 | 0 | 2,12 |
| 8 | 1,0 | 3,70 | 0,38 | 2,66 |
| 9 | 1,0 | 2,0 | 0,37 | 2,63 |
| 10 | 1,0 | 2,0 | 0,41 | 2,66 |
| 11 | 1,0 | 2,0 | 0,35 | 2,67 |

O DCCR foi bem executado, visto que os valores das respostas obtidas nos ensaios triplicados do ponto central (condições 9, 10 e 11) não apresentaram diferenças significativas para ambas as respostas avaliadas. Este DCCR foi realizado com o intuito de otimizar a produção heteróloga do rtGH em relação aos parâmetros metanol e peptona, assim a análise da metodologia de superfície de resposta foi realizada apenas em relação à variável de resposta “produção de rtGH”. Entretanto, sabendo-se que a produção de proteínas heterólogas em *P. pastoris* está associada à formação de biomassa, a variável de resposta “formação de biomassa” está apresentada na Tabela 7 com o intuito de fundamentar e dar razão a esta discussão.

No DCCR executado neste trabalho, a variação da concentração de rtGH produzido nas diferentes condições ensaiadas (tabela 7) foi de 0 a 0,45 mg/L. Com a aplicação deste resultado na metodologia de superfície de resposta (figura 18) foi possível obter informações sobre as interações entre os parâmetros avaliados e a faixa de otimização dos mesmos correlacionada às melhores respostas de produção do rtGH.

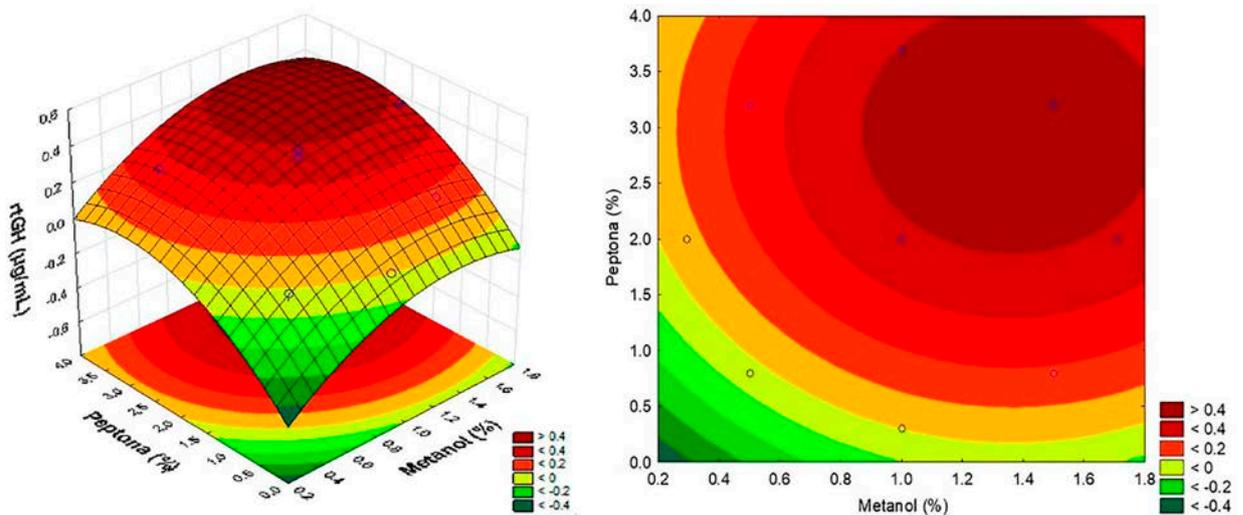


Figura 18. Gráfico de superfície de resposta e superfície de contorno do DCCR tendo como fatores o metanol e a peptona. À esquerda: gráfico de superfície de resposta. À direita: gráfico de superfície de contorno. A variável de resposta considerada foi a produção de rtGH (mg/L).

Analisando a superfície de resposta e a curva de contornos, pode-se verificar a existência de uma região ótima para a produção do rtGH. Esta região se encontra entre a faixa de metanol de 1 % a 1,8 % e a faixa de peptona de 2 % a 4 %. Em razão do modelo utilizado, foi gerada a equação $z = -0,63401628164413 + 0,84016029304694 * x - 0,30833374515366 *$

$x^2 + 0,36037702166814 * y - 0,060474438541191 * y^2 + 0,0000000000000000395 * x * y + 0,0$. De acordo com a equação gerada, os níveis reais considerados ótimos para o parâmetro metanol e peptona foram de 1,55 % e 2,80 %, respectivamente. Ainda, de acordo com este modelo, a concentração predita de rtGH nesses níveis considerados ótimos pode variar de 0,91 a 1,12 mg/L, levando-se em consideração uma margem de $\pm 95\%$ de confiança.

Utilizando os valores considerados ótimos sugeridos pelo modelo obtido no DCCR, foi realizada a validação experimental deste modelo. Os resultados da validação estão apresentados na figura 19, destacando-se o fato de que, embora a ureia tenha sido utilizada como um dos ingredientes fonte de nitrogênio durante os experimentos de planejamento experimental fatorial, no experimento de validação, além da ureia, foram testadas condições contendo YNB (tabela 1), a fim de verificar o grau de impacto advindo da substituição destas fontes de nitrogênio sobre a produção do rtGH.

De acordo com a figura 19, observa-se que nas condições 3 e 4, cujos parâmetros metanol e peptona foram utilizados de acordo com o modelo de otimização, obtiveram-se os melhores níveis de produção do rtGH, de $\sim 2,1$ e $2,4$ mg/L, respectivamente, superiores à concentração predita (0,91 a 1,12 mg/L). Em relação às condições 1 e 2, cujos parâmetros metanol e peptona não foram otimizados (estando de acordo com a tabela 1), os níveis de produção do rtGH foram de $\sim 0,3$ e $0,9$ mg/L de rtGH, respectivamente, inferiores às condições otimizadas. Observa-se também que entre a ureia e o YNB, quando usadas separadamente como fonte de nitrogênio, esta última resultou em maior nível de produção do rtGH. No entanto, em relação às condições otimizadas (3 e 4), essa diferença foi menos expressiva, provavelmente em decorrência do aumento na concentração de peptona de 2 % (condição não otimizada) para 2,8% (condição otimizada), a qual também pode ser utilizada como fonte de nitrogênio durante o metabolismo celular. Em suma, estes dados indicam que a ureia pode ser utilizada como fonte de nitrogênio, significativamente mais barata do que o YNB, para a expressão do rtGH nas condições otimizadas para o sistema de frascos agitados obtidas neste trabalho.

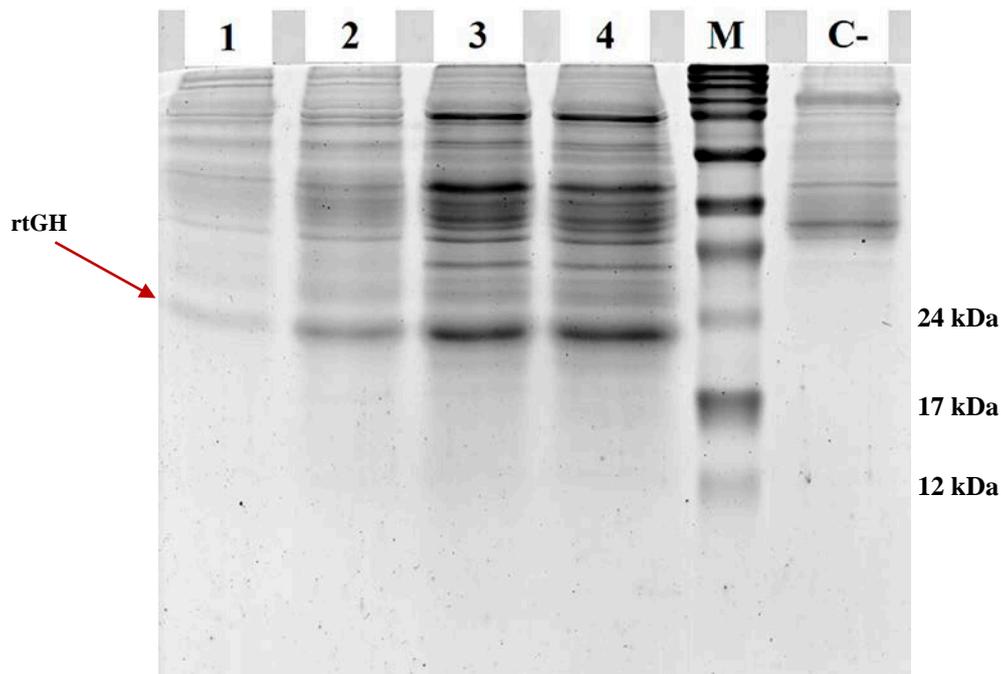


Figura 19. Perfil eletroforético de proteínas em gel SDS-PAGE 15 % do sobrenadante da cultura de *P. pastoris* GS115/pPIC-tGH/Mut⁺ induzida em condições não otimizadas e otimizadas. Canaletas: 1: condição não otimizada contendo ureia como fonte de nitrogênio; 2: condição não otimizada contendo YNB como fonte de nitrogênio; 3: condição otimizada contendo ureia como fonte de nitrogênio; 4: condição otimizada contendo YNB como fonte de nitrogênio; M – marcador de massa molecular de proteínas (*ECLTM RainbowTM Marker Full Range*); C-: controle negativo (*P. pastoris* GS115/pPIC-TPP 61).

Os resultados demonstram que o modelo estatístico foi validado com sucesso. Com a análise da densimetria das bandas foi possível estimar os níveis de rtGH no gel SDS-PAGE. A melhor concentração de rtGH obtida neste trabalho em sistema de frascos agitados com as condições otimizadas foi de ~2,4 mg/L.

De modo geral, além da existência de notável variação, a expressão heteróloga de GHs de vertebrados em leveduras tem sido caracterizada por baixos níveis de produção quando comparados com a expressão em sistemas procarióticos. No caso do hormônio de crescimento recombinante humano (rhGH), enquanto para bactérias tem sido reportada uma expressão na faixa de 0,5 a 2 g/L, em leveduras esta faixa tem sido de 0,5 a 500 mg/L (Apte-Deshpande et al., 2009). Em frascos agitados, Ecamilla-Treviño e colaboradores (2000) relataram níveis de expressão de 3 a 11 mg/L de rhGH, enquanto Apte-Deshpande e colaboradores (2009), combinando diferentes meios de cultivo com surfactantes (Tween 20 e Tween 80) relataram a produção de 8 mg/L a 240 mg/L, sendo este o valor máximo obtido para o rhGH em frascos agitados até o presente. Entretanto, com o uso de metodologias de otimização de bioprocessos, bem como com o uso de biorreatores, esses níveis podem ser aumentados em

dezenas de vezes, conforme será visto adiante.

5.4 Indução do rtGH em biorreator

Nesta etapa do trabalho foi realizada uma fermentação, objetivando melhorar os níveis de produção do rtGH obtidos em sistema de frascos agitados. No biorreator, modelo STR de aeração mecânica, a produção do rtGH alcançou níveis significativamente mais elevados, mesmo em tempo de cultivo menor que o utilizado em frascos agitados. A estratégia de condução do bioprocessamento foi a batelada alimentada, dividida em duas fases: a primeira, de formação de biomassa utilizando glicerol como fonte de carbono e, a segunda, de indução do rtGH utilizando pulsos de metanol como indutor e única fonte de carbono.

A fermentação foi conduzida com sucesso em tempo total de 80 h, das quais 28 h corresponderam à fase de formação de biomassa e, 52 h, à fase de indução. Durante a fase de formação de biomassa, após a fase lag, a taxa de crescimento específica em glicerol foi de $\mu = 0,216 \text{ h}^{-1}$, próximo ao valor máximo relatado na literatura, de $\mu = 0,24 \text{ h}^{-1}$ (Jungo et al., 2006). A biomassa alcançada após o consumo total do glicerol foi de 31,47 g/L.

Após o consumo total do glicerol, o metanol foi introduzido ao sistema por pulsos, o primeiro na concentração de 7,5 g/L, e os demais na concentração de 15 g/L, em intervalos aproximados de 3 h. Esses intervalos corresponderam aos picos de oxigênio no sistema, sinalizando a diminuição do metabolismo celular por conta do consumo total do metanol a cada intervalo. Durante a fase de indução, a taxa de crescimento específica em metanol foi $\mu = 0,0172 \text{ h}^{-1}$, inferior ao valor máximo relatado na literatura, de $\mu = 0,14 \text{ h}^{-1}$ (Jungo et al., 2006). A formação de biomassa em metanol manteve-se crescente até o final do bioprocessamento, chegando a 62,77 g/L de massa celular seca.

Em relação à produção de rtGH, o mesmo foi detectado no meio de cultivo a partir do tempo de 6 h de indução e teve sua concentração crescente seguindo uma tendência linear até o final do bioprocessamento. A concentração máxima de rtGH produzido foi de 250,69 mg/L, conforme apresentado na figura 20 (gráfico à esquerda).

Em relação à cinética dos parâmetros físicos, químicos e físico-químicos, os mais críticos, o oxigênio e pH, também estão mostrados na figura 20 (gráfico à direita). Observa-se uma baixa variação do pH, mantido na faixa pH = 5, devido a adição de hidróxido de amônio concentrado ao longo do bioprocessamento.

Contrariamente, em relação ao oxigênio dissolvido, houve uma acentuada variação no

nível de saturação – de zero a picos de ~ 94,9 %. A diminuição do nível de oxigênio, deveu-se inicialmente ao consumo de glicerol, e, posteriormente, aos momentos de intenso consumo de metanol durante os pulsos, ocorrendo a expressão do rtGH neste período. Ressalva-se que a temperatura foi mantida constante a 30 °C durante o bioprocessamento.

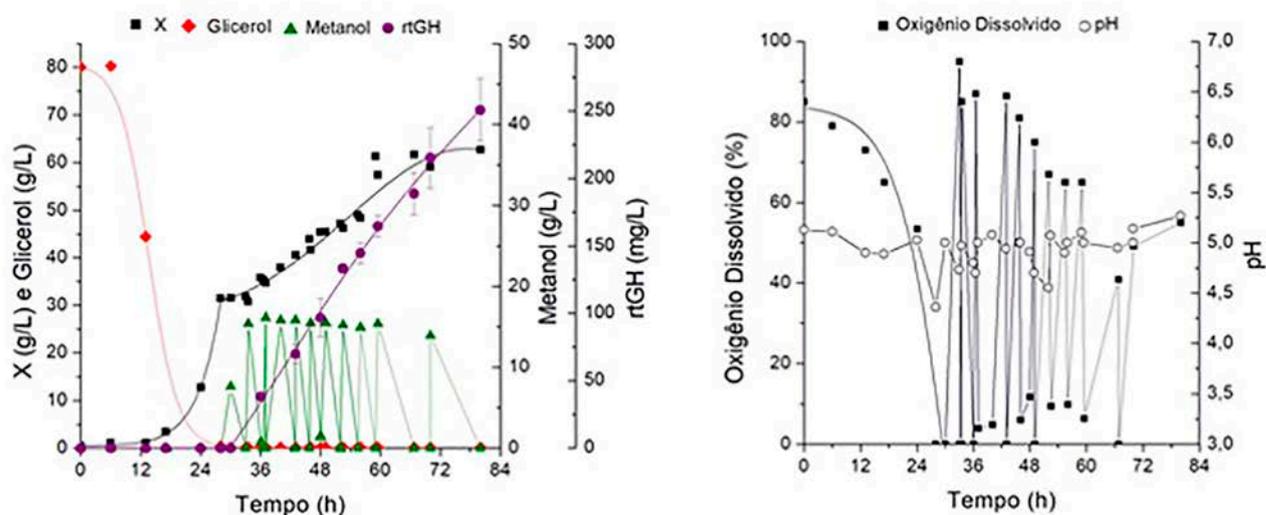


Figura 20. Perfil cinético da fermentação conduzida em meio de cultivo FM22 e biorreator modelo STR. A abreviação X significa concentração celular / formação de biomassa.

Apesar dos bons resultados obtidos na produção heteróloga na fermentação realizada neste trabalho, observa-se que ainda há possibilidade de implementação de melhorias. Por exemplo, conforme mencionado anteriormente, as taxas de crescimento específico, tanto em glicerol como em metanol, ficaram abaixo dos valores registrados na literatura, o que reflete a necessidade de mais ajustes no sistema, sobretudo no fornecimento de oxigênio.

Analisando o comportamento dos parâmetros na figura 20 observa-se que, em muitos momentos, o oxigênio dissolvido chegou a níveis críticos, abaixo de 5 % de saturação, em especial a partir das 28 h, quando a concentração celular (X) ultrapassou os 30 g/L. É fato que a medida que a concentração celular aumenta, maior será a demanda por oxigênio resultante do metabolismo de metanol. O atendimento a esta demanda significa maior produção heteróloga do rtGH. Uma alternativa para manter o nível de oxigênio acima dos 20 % de saturação recomendados pela literatura, seria o suprimento de oxigênio concentrado ao sistema nos momentos de maior metabolismo celular.

O nível de produção heteróloga obtido nesta fermentação, de 250,69 mg/L de rtGH, pode ser considerado satisfatório em relação aos relatos de trabalhos similares disponíveis na literatura. Por exemplo, para expressão do rhGH, o relato pioneiro foi o de Ecamilla-Treviño e

colaboradores (2000), que obteve o nível de expressão em biorreator de 49 mg/L de rhGH. Em seguida, Çalik e colaboradores (2010) obtiveram 150 mg/L de rhGH em 24 h de indução. Posteriormente, Apte-Deshpande e colaboradores (2009) relataram o maior nível de rhGH obtido até o momento, 500 mg/L, em tempo de 24 h, em condições otimizadas.

5.5 Comparação dos níveis de rtGH produzido em frascos agitados e biorreator

São significativas as diferenças observadas entre os níveis de produção do rtGH em frascos agitados e biorreatores. Esses resultados corroboram a importância do oxigênio para a produção de proteínas heterólogas em *P. pastoris*. Em biorreator, mesmo em meio definido, pobre em nutrientes em comparação ao meio complexo, e com menor tempo de cultivo, foi possível alcançar um nível de produção do rtGH cerca de 100 vezes superior ao obtido em frascos agitados. As condições de oxigênio limitante dos frascos agitados são um dos principais fatores responsáveis pela produção de baixíssimos níveis de rtGH nesse sistema.

Embora tenha sido direcionado um grande esforço para otimizar a produção do rtGH em frascos agitados, o baixíssimo nível de produção obtido demonstra a inviabilidade da utilização deste método numa concepção industrial. Além disso, as condições otimizadas obtidas no sistema de frascos agitados não se aplicam para a produção em biorreator. Nos bioprocessos conduzidos em reatores, os caros componentes utilizados no meio complexo, como peptona, extrato de levedura, YNB, por exemplo, são substituídos pelos componentes mais baratos dos meios de sais.

Além do mais, em biorreator, por meio dos conhecimentos prévios sobre a taxa de crescimento específica da levedura em metanol, bem como pelo monitoramento dos níveis de oxigênio, é possível definir estratégias de bateladas (simples, alimentada ou contínua) de fornecimento de metanol ao sistema. Portanto, a concentração ótima de metanol (1,79 %), encontrada no planejamento experimental fatorial executado neste trabalho para sistema de frascos agitados pouco se aplica ao nível de produção em biorreator.

Por outro lado, não se descarta a possibilidade do nível de rtGH produzido em frascos agitados ter sido subestimado, tendo em vista que a metodologia de quantificação por densimetria foi precedida por precipitação com TCA, e sabe-se que procedimentos de precipitação geralmente são acompanhados de perdas de 10 a 20 % da massa proteica.

Apesar de se encontrar relatos na literatura de extremos de expressão de proteínas secretadas, como no caso do fragmento C da toxina do tétano, que apresentou um rendimento

de 12 g/L (Clare et al., 1991b), tem-se em contraste a interleucina-17 humana, para a qual obteve-se apenas 0,35 mg/L (Murphy et al., 1998). As expressões realizadas em biorreatores apresentam tipicamente níveis muito mais altos de expressão do que aqueles alcançados em frascos agitados, devido a otimização das condições de temperatura, pH, fonte de carbono, aeração entre outros (Cereghino et al., 2002).

6. CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos nesta pesquisa é possível concluir que:

- ✓ O clone 32b, fenótipo Mut⁺, e 1c, fenótipo Mut^s, foram identificados como os mais produtivos em relação ao rtGH, considerando-se a expressão heteróloga em sistema de frascos agitados, o que foi verificado por análise comparativa de densitometria de bandas em SDS-PAGE;
- ✓ O planejamento experimental fatorial revelou que o metanol e a peptona são os parâmetros mais significativos na produção de rtGH em frascos agitados. De acordo com o modelo obtido a partir da execução do DCCR, o nível ótimo de metanol foi de 1,55%, e da peptona foi de 2,8 %;
- ✓ A validação experimental, utilizando estes parâmetros nos níveis ótimos, produziu 2,4 mg/L de rtGH, sendo oito vezes superior à condição não otimizada (0,3 mg/L). Nas condições otimizadas, a ureia pode ser utilizada em substituição ao YNB, sem diminuir significativamente o nível de produção do rtGH.
- ✓ A produção do rtGH foi realizada com sucesso em biorreator, com bioprocesso conduzido em batelada alimentada com pulsos de metanol;
- ✓ O nível máximo de rtGH produzido no biorreator foi de ~ 250 mg/L em 52 h de indução / 80 h de bioprocessamento. Este nível pode ser considerado satisfatório em relação aos níveis de produção de GHs de outros vertebrados relatados na literatura;
- ✓ O nível de rtGH produzido neste trabalho pode ser melhorado por meio da otimização dos parâmetros do bioprocessamento, notadamente do oxigênio, cuja variação alcançou níveis críticos abaixo dos 20-30 % de saturação recomendados pela literatura;
- ✓ Este trabalho é pioneiro quanto à otimização da produção do rtGH em frascos agitados e produção em biorreator.

7. PERSPECTIVAS

- ✓ Realizar a otimização da produção do rtGH em biorreator;
- ✓ Realizar o ensaio de avaliação do efeito do rtGH *in vivo* sobre o desempenho zootécnico de juvenis de tambaqui;
- ✓ Investigar a viabilidade de utilização do rtGH na piscicultura;
- ✓ Realizar publicações em revistas especializadas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, J.; Estrada, M.P.; Carpio, Y.; Ruiz, O.; Morales, R.; Martínez, E.; Valdés, J.; Borroto, C.; Besada, V.; Sánchez, A.; Herrera, R. Tilapia somatotropin polypeptides: potent enhancers of fish growth and innate immunity. *Biotecnología Aplicada*, v. 26, n. 3, p. 267-272. 2009.
- Acosta, J.; Morales, R.; Morales, A.; Alonso, M.; Estrada, M.P. *Pichia pastoris* expressing recombinant tilapia growth hormone accelerates the growth of tilapia. *Biotechnol. Lett.*, v. 29, p. 1671-1676. 2007.
- Agellon, L.B.; Chen, T.T. Rainbow trout growth hormone: molecular cloning of cDNA and expression in *Escherichia coli*. *DNA*, v. 5, p. 463-467. 1986.
- Ahmad, M.; Hirz, M.; Pichler, H.; Schwab, H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol.* v. 98, p. 5301-17. 2014.
- Apte-Deshpande, A.; Rewanwar, S.; Kotwal, P.; Raiker, V.A.; Padmanabhan, S. Efficient expression and secretion of recombinant human growth hormone in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: potential applications for other proteins. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 54, p. 197-205. 2009.
- Araújo-Lima, C.; Goulding, M. Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. Volume 4 de Estudos do Mamirauá. Sociedade Civil Mamirauá. 186p. 1998.
- Barnard G.C., Kull A.R., Sharkey N.S., Shaikh S.S., Rittenhour AM, Burnina I., Jiang Y., Li F., Lynaugh H., Mitchell T., et al. High-throughput screening and selection of yeast cell lines expressing monoclonal antibodies. *J Ind Microbiol Biotechnol.* v. 37, p. 961-71. 2010.
- Barthem, R.B.; Fabr e, N.N. Biologia e diversidade dos recursos pesqueiros da Amazônia. In: A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia Brasileira. Editado por Mauro Luis Ruffino – ProV rzea, Manaus, Amazonas. 2003.
- Batista, V.S.; Chaves, M.P.S.R.; Júnior, C.H.F.; Oliveira, M.F.G.; Silva, A.J.; Bandeira, C.F. Caracteriza o socioecon mica da atividade pesqueira e da estrutura de comercializa o do pescado na calha Solimões-Amazonas. Capítulo I, 19-57p. In: Ibama/ProV rzea, Manaus. O setor pesqueiro na Amazônia: situa o atual e tendências. Projeto Manejo dos Recursos Naturais da Várzea, 122p. 2007.
- Baumann, K.; Maurer, M.; Dragosits, M.; Cos, O.; Ferrer, P.; Mattanovich, D. Hypoxic fed-batch cultivation of *Pichia pastoris* increases specific and volumetric productivity of recombinant proteins. *Biotechnol Bioeng.* v. 100, p. 177-83. 2008.
- Bayraktar, E. Effects of pH on human growth hormone production by *Pichia pastoris* considering the expression levels of regulatory genes. Thesis. School of Natural and

- Applied Sciences of Middle East Technical University. 2009.
- Bideci, A.; Çamurdan, O. Physiology of growth hormone secretion. *J Clin Res Ped Endo*, (Suppl 1), p. 1-7. 2009.
- Björnsson, B.Th. The biology of salmon growth hormone: from daylight to dominance. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 17, p. 9–24. 1997.
- Bretthauer, R.K.; Castellino, F.J. Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v. 30, p. 193-200. 1999.
- Brierley, R.A.; Davis, G.R.; Holtz, G.C. Production of insulin-like growth factor-1 in methylotrophic yeast cells. US Patent No. 5,324,639. 1994.
- Brierley, R.A.; Bussineau, C.; Kosson, O.R.; Melton, A.; Siegel, R.R. Fermentation Development of Recombinant *Pichia pastoris* Expressing the Heterologous Gene: Bovine Lysozyme. *Ann. NY Acad. Sci.*, vol. 589, p. 350. 1990.
- Broglio, F.; Benso, A.; Gottero, C.; Prodam, F.; Grottoli, S.; Tassone, F.; Maccario, M.; Casanueva, F.F.; Dieguez, C.; Deghenghi, R.; Ghigo, E.; Arvat, E. Effects of glucose, free fatty acids or arginine load on the GH-releasing activity of ghrelin in humans. *Clin Endocrinol.*, v. 57, p. 265-271. 2002.
- Brooks, C.L.; Morrison, M.; Joanne Lemieux, M. Rapid expression screening of eukaryotic membrane proteins in *Pichia pastoris*. *Protein Sci.*, v. 22, p. 425–33. 2013.
- Büchs, J. Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochem Eng J.* v. 7, p. 91–8. 2001.
- Buckup, P.A.; Menezes, N.A.; Ghazzi, M.S. Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Rio de Janeiro: Museu Nacional. 195p. 2007.
- Burrowes, O.J.; Diamond, G.; Lee, T.C. Recombinant expression of Pleurocidin cDNA using the *Pichia pastoris* expression system. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2005, n. 4, p. 374-384. 2005.
- Çalık, P.; Bayraktar, E.; İnankur, B.; Soyaslan, E.Ş.; Şahin, M.; Taşpınar, T.; Açık, E.; Yılmaz, R.; Özdamar, T.H. Influence of pH on recombinant human growth hormone production by *Pichia pastoris*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 85, n. 12, p. 1628-1635. 2010.
- Canosa, L.F.; Chang, J.P.; Peter, R.E. Neuroendocrine control of growth hormone in fish. *General and Comparative Endocrinology* v. 151, p. 1–26. 2007.
- Carmo, E. J. do. Clonagem e expressão regulada do cDNA da glicoamilase de *Aspergillus awamori* em *Pichia pastoris*. Dissertação de Mestrado. INPA, Manaus. 2010.
- Cereghino, G.P.; Cereghino, J.L.; Ilgen, C.; Cregg, J.M. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol*, v. 13, p. 329-

332. 2002.

- Cereghino, J.L.; Cregg, J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 24, p. 45-66. 2000.
- Chang, Y.S.; Liu, C.S.; Huang, F.L.; Lo, T.B. The primary structures of growth hormones of three cyprinoids species: bighead carp, silver carp and grass carp. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v. 87, p. 385-393. 1992.
- Charoenrat T., Ketudat-Cairns M., Stendahl-Andersen H., Jahic M., Enfors S.O. Oxygen-limited fed-batch process: an alternative control for *Pichia pastoris* recombinant protein processes. *Bioprocess Biosyst Eng.* v. 27, p. 399–406. 2005.
- Chen, T.T.; Marsh, A.; Shamblott, M.; Chan, K.M.; Tang, Y.L.; Cheng, C.M.; Yang, B.Y. Structure and evolution of fish growth hormone and insulinlike growth factor genes. In: *Molecular Endocrinology of Fish. Fish Physiology*, v. XIII, p. 179-209. 1994.
- Chiruvolu, V.; Gregg, J.M.; Meagher, M.M. Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatch fermentations. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 21, n. 4, p. 277-283. 1997.
- Clare, J.J.; Rayment, F.B.; Ballantine, S.P.; Sreekrishna, K.; Romanos, M.A. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Bio/Technology*, v. 9, p. 455–460. 1991b.
- Clare, J.J.; Romanos, M.A.; Rayment, F.B.; Rowedder, J.E.; Smith, M.A.; Payne, M.M.; Sreekrishna, K.; Henwood, C.A. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene*, v. 105, p. 205–212. 1991a.
- Costa, L.S.; Rosa, P.V.; Fortes-Silva, R.; Sánchez-Vázquez, F.J.; López-Olmeda, J.F. Daily rhythms of the expression of genes from the somatotrophic axis: the influence on tilapia (*Oreochromis niloticus*) of feeding and growth hormone administration at different times. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 181–182, p. 27–34. 2016.
- Couderc, R.; Baratti, J. Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: purification and properties of alcohol oxidase. *Agric. Biol. Chem.*, v. 44, p. 2279-2289. 1980.
- Cregg, J.M. *Pichia* protocols. 2nd. Edition. Humana Press. Totowa, New Jersey, USA. 2007.
- Cregg, J.M. Expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene Expression Systems Using Nature for the Art of Expression*, p. 157-191. 1999.
- Cregg, J.M.; Madden, K.R. Development of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, as a host system for the production of foreign proteins. *Dev. Ind. Microbiol.*, v. 29, p. 33–41. 1988.
- Cregg, J.M.; Barringer, K.J.; Hessler, A.Y.; Madden, K.R. *Pichia pastoris* as a host system

- for transformations. *Molecular and Cellular Biology*, v. 5, n. 12, p. 3376-3385. 1985.
- Cregg, J.M.; Cereghino, J.L.; Shi, J.; Higgins, D.R. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, v. 16, p. 23-52. 2000.
- Cregg, J.M.; Madden, K.R.; Barringer, K.J.; Thill, G.P.; Stillman, C.A. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and Cellular Biology*, v. 9, n. 3, p. 1316-1323. 1989.
- Cregg, J.M.; Tolstorukov, I.; Kusari, A.; Sunga, J.; Madden, K.; Chappell, T. Expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Methods in Enzymology*, v. 463, p. 169-188. 2009.
- Cregg, J.M.; Tolstorukov, I.; Kusari, A.; Sunga, J.; Madden, M.; Chappell, T. Expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Methods in Enzymology*, v. 463, p. 169-189. 2009.
- Cregg, J.M.; Vedvick, T.S.; Raschke, W.C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*, v. 11: p. 905-910. 1993.
- D'Anjou, M.C.; Daugulis, A.J. A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 72, p. 1-11. 2000.
- Daly, R.; Hearn, M.T.W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.*, v. 18, p. 119-138. 2005.
- Damasceno, L.M.; Pla, I.; Chang, H.J.; Cohen, L.; Ritter, G.; Old, L.J.; Batt, C.A. An optimized fermentation process for high-level production of a single-chain Fv antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, v. 37, p. 18-26. 2004.
- Dragosits M., Stadlmann J., Albiol J., Baumann K., Maurer M., Gasser B., Sauer M., Altmann F., Ferrer P., Mattanovich D. The effect of temperature on the proteome of recombinant *Pichia pastoris*. *J Proteome Res.*, v. 8, p. 1380-92. 2009.
- Duan, C. The insulin-like growth factor system and its biological actions in fish. *Amer. Zool.*, v. 37, p. 491-503. 1997.
- Duan, C.; Plisetskaya, E.M. National regulation of insulin-like growth factor I mRNA expression in salmon tissues. *J. Endocrinol.*, v. 139, p. 43-252. 1993.
- Ecamilla-Treviño, L.L.; Viader-Salvadó, J.M.; Barrera-Saldaña, H.A.; Guerrero-Olazará, M. Biosynthesis and secretion of recombinant human growth hormone in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, v. 22, p. 109-114. 2000.
- Eck, A.; Schmidt1, M.; Hamer, S.; Ruf, A.J.; Förster, J.; Schwaneberg, U.; Blank, L.M.; Wiechert, W.; Oldiges, M. Improved microscale cultivation of *Pichia pastoris* for clonal screening. *Fungal Biology Biotechnology*, v. 5, n. 8. 2018.
- Fellgaard, L.; Helenius, A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. v. 4, p. 181-191. 2003.

- Ferreira, E.J.G. Recursos pesqueiros amazônicos: uma análise conjuntural. 19-33p. In: Val, A.L. & Santos, G.M (Org.). Caderno de Debates do GEEA, Tomo 2, INPA. 148p. 2009.
- Fim, J.D.I.; Guimarães, S.F.; Storfi Filho, A.; Bobote, A.G.; Nobre Filho, G.R. Manual de criação de matrinxã (*Brycon amazonicus*) em canais de igarapés. Manaus: INPA, 46p. 2009.
- Fine, M.; Sakal, E.; Vashdi, D.; Daniel, V.; Levanon, A.; Lipshitz, O.; Certler, A. Recombinant carp (*Cyprinus carpio*) growth hormone: expression, purification, and determination of biological activity in vitro and in vivo. *General and Comparative Endocrinology*, v. 89, p. 51-61. 1993.
- Frankenne, F.; Scippo, M.L.; Van B.J.; Igout, A.; Hennen, G. Identification of placental growth hormone as the growth hormone-V gene expression product. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 71, p. 15-18 1990.
- Funkenstein, B.; Balas, V.; Skopal, T.; Radaelli, G.; Rowlerson, A. Long-term culture of muscle explants from *Sparus aurata*. *Tissue and Cell*, v. 38: p. 399–415. 2006.
- Gasser, B.; Dragosits, M.; Mattanovich, D. Engineering of biotin-prototrophy in *Pichia pastoris* for robust production processes. *Metabolic Engineering*, v. 12, n. 6, p. 573-580. 2010.
- Ghosalkar, A.; Sahai, V.; Srivastava, A. Optimization of chemically defined medium for recombinant *Pichia pastoris* for biomass production. *Bioresour Technol.*, v. 99, p. 7906–10. 2008.
- Goeddel, D.V.; Heyneker, H.L.; Hozumi, T.; Arentzen, R.; Itakura, K.; Yansura, D.G.; Ross, M.J.; Miozarri, G.; Crea, R.; Seeburg, P. Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature*, v. 281, n. 5732, p. 544-548. 1979.
- Goldenberg, N.; Barkan, A. Factors regulating growth hormone secretion in humans. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.*, v. 36, p. 37-55. 2007.
- Guler, H.P.; Zapf, J.; Schmid, C.; Froesch, E.R. Insulin-like growth factors I and II in healthy man: estimations of half-lives and production rates. *Acta Endocrinol (Copenh)*, v. 121, p. 753-758. 1989.
- Hemmerich, J.; Adelantado, N.; Barrigon, J.M.; Ponte, X.; Hormann, A.; Ferrer, P.; Kensy, F.; Valero, F. Comprehensive clone screening and evaluation of fedbatch strategies in a microbioreactor and lab scale stirred tank bioreactor system: application on *Pichia pastoris* producing *Rhizopus oryzae* lipase. *Microb Cell Fact.*, v. 13, n. 36. 2014.
- Hew, C.L.; Fletcher, G.L. The role of aquatic biotechnology in aquaculture. *Aquaculture* v. 197, p. 191–204. 2001.
- Higgins, D.R.; Cregg, J.M. Introduction to *Pichia pastoris*. In: *Pichia Protocols. Methods in Molecular Biology*, 103, Humana Press, Totowa, NJ. 1998.

- Holmes, W.J.; Darby, R.A.J.; Wilks, M.D.B.; Smith, R.; Bill, R.M. Developing a scalable model of recombinant protein yield from *Pichia pastoris*: the influence of culture conditions, biomass and induction regime. *Microb Cell Fact.* v. 8, n. 35. 2009.
- Inan, M.; Meagher, M.M. The effect of ethanol and acetate on protein expression in *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 92, n. 4, p. 337-341. 2001.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa da Pecuária Municipal. Dados da produção nacional e por unidade da federação de tabaqui. 2016. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940#resultado>>.
- Invitrogen. *Pichia* fermentation process guidelines. 1996.
- Invitrogen. Instruction Manual. WesternBreeze Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit. Version F. 2003.
- Invitrogen. For Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. 2010.
- Izel, A.C.U.; Boijink, C.L.; Chagas, E.C.; O'Sullivan, F.L.A.; Dairiki, J.K.; Inoue, L.A.K.A.; Crescêncio, R. Plano Estratégico da Embrapa Amazônia Ocidental para a Aquicultura. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos, v. 110. p. 93. 2013a.
- Izel, A.C.U.; Crescêncio, R.; O'Sullivan, F.F.L.A.; Chagas, E.C.; Boijink, C.L.; Silva, J.I. Produção intensiva de tabaqui em tanques escavados com aeração. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 4 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Circular Técnica 39). 2013b.
- Izel, A.C.U.; Melo, L.A.S. Criação de tabaqui (*Colossoma macropomum*) em tanques escavados no Estado do Amazonas. Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos, 32. 2004.
- Jeude, M.; Dittrich, B.; Niederschulte, H.; Anderlei, T.; Knocke, C.; Klee, D.; Buchs, J. Fed-batch mode in shake flasks by slow-release technique. *Biotechnol Bioeng.* v. 95, p. 433–445. 2006.
- Jungo, C.; Rerat, C.; Marison, I.W.; Stockar, U. von. Quantitative characterization of the regulation of the synthesis of alcohol oxidase and of the expression of recombinant avidin in a *Pichia pastoris* Mut⁺ strain. *Enzym. Microb. Technol.*, v. 39, p. 936-944. 2006.
- Kennedy, M.J.; Reader, S.L.; Davies, R.J.; Rhoades, D.A.; Silby, H.W. The scale up of mycelial shake flask fermentations: a case study gamma linolenic acid production by *Mucor hiemalis* IRL 51. *Journal of Industrial Microbiology*, v. 13, p. 212-216. 1994.
- Khatri, N.K. Optimisation of recombinant protein production in *Pichia pastoris*. (Academic Dissertation). University of Oulu, Faculty of Technology, Department of Process and Environmental Engineering, 57p. 2011.
- Kirk, T.V.; Szita N. Oxygen transfer characteristics of miniaturized bioreactor systems. *Biotechnol Bioeng.*, v. 110, p. 1005–19. 2013.

- Koutz, P.; Davis, G.R.; Stillman, C.; Barringer, K.; Cregg, J.; Thill, G. Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast*, v. 5, p. 167-177. 1989.
- Kumar, S.; Wittmann, C.; Heinzle, E. Review: Minibioreactors. *Biotechnology Letters*, v. 26, n. 1, p. 1. 2004.
- Lattermann, C.; Büchs, J. Microscale and miniscale fermentation and screening. *Curr Opin Biotechnol.*, v. 35, p. 1–6. 2015.
- Li, P.; Anumanthan, A.; Gao, X.G.; Ilangovan, K.; Suzara, V.V.; Düzgüneş, N.; Renugopalakrishnan, V. Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 142, p. 105-124. 2007.
- Li, Y.; Bai, J.; Jian, Q.; Ye, X.; Lao, H.; Li, X.; Luo, J.; Liang, X. Expression of common carp growth hormone in the yeast *Pichia pastoris* and growth stimulation of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, v. 216, p. 329-341. 2003.
- Liu, M.; Potvin, G.; Gan, Y.R.; Huang, Z.B.; Zhang, Z.S. Medium optimization for the production of phytase by recombinant *Pichia pastoris* grown on glycerol. *Int J Chem React Eng.*, v. 9, p.1–15. 2011.
- López-Pérez, M.; Viniegra-Gonzalez, G. Differential toxicity caused by methanol on the growth of *Pichia pastoris* cultured in solid-state and in submerged fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, v. 16, n. 3, 2017, p. 735-743. 2017.
- Macauley-Patrick, S.; Fazenda, M.L.; McNeil, B.; Harvey, L.M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, v. 22, p. 249-270. 2005.
- Melamed, P; Gong, Z.; Fletcher, G; Hew, C.L. The potential impact of modern biotechnology on fish aquaculture. *Aquaculture*, v. 204, p. 255–269. 2002.
- Melo, L. A. S.; Izel, A. C. U.; Rodrigues, F. M. Criação de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) em Viveiros de Argila/Barragens no Estado do Amazonas. Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos, 18. 2001.
- Minning, S.; Serrano, A.; Ferrer, P.; Solá, C.; Schmid, R.D.; Valero, F. Optimization of the high-level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *J Biotechnol*, v. 86, p. 59–70. 2001.
- Moore, D.D.; Walker, M.D.; Diamond, D.J.; Conkling, M.A.; Goodman, H.M. Structure, expression and evolution of growth hormone genes. *Rec. Progr. Horm. Res.*, v. 38, p.197-225. 1982.
- Moriyama, S.; Kawauchi, H. Growth stimulation of juvenile salmonids by immersion in recombinant salmon growth hormone. *Nippon Suisan Gakkaishi*, v. 56, p. 31-34. 1990.
- Müller, E.E.; Locatelli, V.; Cocchi, D. Neuroendocrine Control of Growth Hormone Secretion. *Physiological Reviews*. Vol. 79, N. 2, April, Printed in U.S.A. 1999.

- Murphy Jr, K.P.; Gagne, P.; Pazmany, C.; Moody, M.D. Expression of human interleukin-17 in *Pichia pastoris*: Purification and characterization. *Protein Expression and Purification*, v. 12, n. 2, p. 208-214. 1998.
- Nakano, A.; Lee, C.Y.; Yoshida, A.; Matsumoto, T.; Shiomi, N.; Katoh, S. Effects of methanol feeding methods on chimeric alpha-amylase expression in continuous culture of *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 101, p. 227-231. 2006.
- Norman, A.W.; Litwak, G. *Hormones*. 2ª Ed. Academic Press, San Diago. 1997.
- Orman, M.A.; Çalık, P.; Özdamar, T.H. The influence of carbon sources on recombinant-human-growth-hormone production by *Pichia pastoris* is dependent on phenotype: a comparison of Mut^s and Mut⁺ strains. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 52, p. 245-255. 2009.
- Paz, A.L. Efeitos do hormônio do crescimento bovino nos parâmetros zootécnicos e fisiológicos de tambaqui, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818). Dissertação de Mestrado. Nilton Lins: Manaus, 2015.
- Pereira-Filho, M.; Cavero, B.A.S.; Roubach, R.; Ituassu, D.R.; Gandra, A.L.; Crescêncio, R. Cultivo do pirarucu (*Arapaima gigas*) em viveiro escavado. *Acta Amazonica*, Manaus, v. 33, p. 715-719, 2003.
- Peréz-Sánchez, J. The involvement of growth hormone in growth regulation, energy homeostasis and immune function in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): a short review. *Fish Physiol Biochem*, v. 22, p. 135-144. 2000.
- Peréz-Sánchez, J.; Martí-Palanca, H.; Kaushik, S.J. Ration size and protein intake affect circulating growth hormone concentration, hepatic growth hormone binding and plasma insulin-like growth factor-I immunoreactivity in a marine teleost, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J. Nutr.*, v. 125, p. 546-552. 1995.
- Pessoa, M.C.F. Expressão e caracterização da enzima trealose-6-fosfato fosfatase de *Anopheles gambiae* produzida por *Pichia pastoris*. 126 f. Tese de Doutorado: UFAM, Manaus, 2014.
- Pinheiro, J.S; Wolff, J.L.C.; Araújo, R.C.; Hilsdorf, A.W.S. Molecular cloning and sequence analysis of growth hormone cDNA of neotropical freshwater fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Genetics and Molecular Biology*, v. 31, p. 381-384. 2008.
- Plackett R.L.; Burman J.P. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, v. 33, p. 305-325. 1946.
- Potvin, G.; Ahmad, A.; Zhang, Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochem Eng J Corrected Proof.*, v. 64, p. 91–105. 2012.
- Pratap, J; Rajamohan, G; Dikshit, K.L. Characteristics of glycosylated streptokinase secreted from *Pichia pastoris*: enhanced resistance of SK to proteolysis by glycosylation. *Appl.*

- Microbiol. Biotechnol., v. 53, p. 469-475. 2000.
- Queiroz, J.F.; Lourenço, J.N.P.; Kitamura, P.C. A Embrapa e a aquicultura: demandas e prioridades de pesquisa. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 35. 2002.
- Ramchuran, S.O.M.B.; Holst, O.; Karlsson, E.N. The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* as a host for the expression and production of thermostable xylanase from the bacterium *Rhodothermus marinus*. FEMS Yeast Res., v. 5, p. 839-850. 2005.
- Randone, P. Bioprocess studies of biomass and recombinant protein production by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Thesis submitted to University College of London for the degree of Doctor of Philosophy. 2014.
- Ray, J.; Jones, B.; Liebhaber, S.A.; Cooke, N.E. Glycosylated human growth hormone variant. Endocrinology, v. 125, p. 566-568. 1989.
- Rayon, C.; Lerouge, P.; Faye, L. The protein N-glycosylation in plants. Journal of Experimental Botany, v. 49, n. 326, p. 1463-1472. 1998.
- Rodrigues, M.I.; Iemma, A.F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. 2^a. ed. Campinas, SP: Cárita Editora. 2009.
- Romanos, M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. Current Opinion in Biotechnology, v. 6, p. 527-533. 1995.
- Romanos, M.A.; Makoff, A.J.; Fairweather, N.F.; Beesley, K.M.; Slater, D.E.; Rayment, F.B.; Payne, M.M.; Clare, J.J. Expression of tetanus toxin fragment C in yeast: gene synthesis is required to eliminate fortuitous polyadenylation sites in AT-rich DNA. Nucleic Acids Res., v. 19, p. 1461-1467. 1991.
- Romanos, M.A.; Scorer, C.A.; Clare, J.J. Foreign gene expression in yeast: a review. Yeast, v. 8, p. 423-488. 1992.
- Rothan, H.A.; Huy, T.S.; Mohamed, Z. Effect of codon optimisation on the production of recombinant fish growth hormone in *Pichia pastoris*. The Scientific World Journal, Volume 2014, 6 pages.
- Rousseau, K.; Dufour, S. Comparative aspects of GH and metabolic regulation in lower vertebrates. Neuroendocrinology, v. 86, p. 165-174. 2007.
- Sadalla-Pinto, E.A. Clonagem e expressão do cDNA codificador do hormônio de crescimento de tambaqui (*Colossoma macropomum*) na levedura *Pichia pastoris*. Dissertação de Mestrado. UFAM: Manaus, 2012.
- Sadalla-Pinto, E.A.; Porto, J.I.R.; Silva, S.D.; Carmo, E.J.; Andrade, E.V.; Astolfi-Filho, E. Cloning and expression of cDNA encoding growth hormone tambaqui (*Colossoma macropomum*) in the yeast *Pichia pastoris*. BMC Proceedings, 8(Suppl 4):P146. 2014.
- Saito, A.; Sekine, S.; Kornats, Y.; Sato, M.; Hirano, T.; Itoh, S. Molecular cloning of eel

- growth hormone cDNA and its expression in *Escherichia coli*. *Gene*, v. 73, p. 545-551. 1988.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. 2. Ed. New York, 1659p. 1989.
- Schwarzans, J.P.; Wibberg, D.; Winkler, A.; Luttermann, T.; Kalinowski, J.; Friehs, K. Integration event induced changes in recombinant protein productivity in *Pichia pastoris* discovered by whole genome sequencing and derived vector optimization. *Microb Cell Fact.*, v. 15, n. 84. 2016.
- Scorer, C.A.; Clare, J.J.; McCombie, W.R.; Romanos, M.A.; Sreekrishna, K. Rapid selection using G148 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. *Nature Biotechnology*, v. 12, p. 181-184. 1994.
- Scorer, C.A.; Buckholz, R.G.; Clare, J.J.; Romanos, M.A. The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, v. 136, n. 1-2, p. 111-9. 1993.
- Sekine, S.; Mizukami, T.; Nishi, T.; Kuwana, Y.; Saito, A.; Sato, M.; Itoh, S.; Kawauchi, H. Cloning and expression of cDNA for salmon growth hormone in *Escherichia coli*. *Proc. Nati. Acad. Sci., USA*. v. 82, p. 4306-4310. 1985.
- Siegel, R.S.; Brierley, R.A. Methylotrophic yeast *Pichia pastoris* produced in high-cell-density fermentations with high cell yields as vehicle for recombinant protein production. *Biotechnology Bioengineering*, v. 34, p. 403-404. 1989.
- Silva, S.D. Clonagem e expressão do hormônio de crescimento de *Colossoma macropomum* em *Escherichia coli*. Dissertação de Mestrado: INPA, Manaus-AM. 2012.
- Sousa, A.R.B. Análise do transcrito de etiquetas de sequências expressas da hipófise e parte do cérebro do tambaqui (*Colossoma macropomum*) e expressão do cDNA do hormônio de crescimento em *Pichia pastoris*. Tese de Doutorado. INPA, Manaus. 2009.
- Souza, C.J.H.; Benavides, M.V.; Melo, E.O. Caracterização molecular do hormônio do crescimento do tambaqui (*Colossoma macropomum*). Palmas, TO: Embrapa Pesca e Aquicultura (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Pesca e Aquicultura, ISSN 2358-6273; 12). 15p. 2016.
- Sreekrishna, K.; Brankamp, R.G.; Kropp, K.E.; Blankenship, D.T.; Tsay, J.T.; Smith, P.L.; Wierschke, J.D.; Subramaniam, A.; Birkenberger, L.A. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, v. 190, p. 55-62. 1997.
- StatSoft, Statistica 10.0. Data Miner., Inc. 2010.
- Stratton, J.; Chiruvolu, V.; Meagher, M. High cell-density fermentation. *Methods in Molecular Biology*, 103: *Pichia* Protocols, p. 107-120. 1998.

- Streit, W.; Entcheva, P. Biotin in microbes, the genes involved in its biosynthesis, its biochemical role and perspectives for biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 61, n. 1, p. 21-31. 2003.
- Suframa. Zona franca de Manaus: Projeto potencialidades regionais - Estudo de viabilidade econômica: piscicultura. v. 8. 2003.
- Terrazas, W.D.M. Fatores que influenciam a produção de biomassa e glicerol quinase pela levedura recombinante *Pichia pastoris*. Araraquara: Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. 2012.
- Tsai, H.J.; Hsieh, M.H.; Kuo, J.C. *Escherichia coli*-produced fish growth hormone as a feed additive to enhance the growth of juvenile black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*). *J. Appl. Ichthyol.*, v. 13, p. 79-82. 1997.
- Tschopp, J.F.; Brust, P.F.; Cregg, J.M.; Stillman, C.A.; Gingeras, T.R. Expression of the *lacZ* gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Research.*, v. 15, n. 9, p. 3859-3876. 1987.
- Tull, D.; Gottschalk, T.E.; Svendsen, I.; Kramhoft, B.; Phillipson, B.A.; Bisgard-Frantzen, H.; Olsen, O.; Svensson, B. Extensive N-glycosylation reduces the thermal stability of a recombinant alkalophilic *Bacillus* α -amylase produced in *Pichia pastoris*. *Protein Express. Purif.*, v. 21, p. 13-23. 2001.
- Varnai, A.; Tang, C.; Bengtsson, O.; Atterton, A.; Mathiesen, G.; Eijssink, V.G.H. Expression of endoglucanases in *Pichia pastoris* under control of the GAP promoter. *Microb Cell Fact.*, v. 13, p. 57. 2014.
- Venugopal, T.; Anathy, V.; Pandian, T.J.; Gong, G.Z.; Mathavan, S. Molecular cloning of growth hormone encoding cDNA of an Indian major carp, *Labeo rohita* and its expression in *Escherichia coli* and Zebrafish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v. 125, p. 236-247. 2002a.
- Venugopal, T.; Mathavan, S.; Pandian, T.J. Molecular cloning of growth hormone encoding cDNA of Indian major carps by a modified rapid amplification of cDNA ends strategy. *J. Biosci.*, v. 27, n. 3, p. 261-272. 2002b.
- Waltz, E. GM salmon declared fit for dinner plates. *Nature Biotechnology.*, v. 34, p. 7–9. 2016.
- Weidner, M.; Taupp, M.; Hallam, S.J. Expression of recombinant proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J Vis Exp.* v. 36, p. 1862. 2010.
- Weuster-Botz, D.; Altenbach-Rehm, J.; Arnold, M. Parallel substrate feeding and pH-control in shaking-flasks. *Biochemical Engineering Journal*, v. 7, n. 2, p 163-170. 2001.
- Wewetzer, S.J.; Kunze, M.; Ladner, T.; Luchterhand, B.; Roth, S.; Rahmen, N.; Kloss, R.; Silva, A.C.E.; Regestein, L.; Büchs, J. Parallel use of shake flask and microtiter plate

online measuring devices (RAMOS and BioLector) reduces the number of experiments in laboratory-scale stirred tank bioreactors. *J Biol Eng.*, v. 9, n. 9. 2015.

Wilming, A.; Bahr, C.; Kamerke, C.; Büchs, J. Fed-batch operation in special microtiter plates: a new method for screening under production conditions. *J Ind Microbiol Biot.*, v. 41, p. 513–25. 2014.

Woynarovich, E. Tambaqui e pirapitinga: propagação artificial e criação de alevinos. CODEVASF, Brasília. 68p. 1986.

Yousefian, M.; Shirzad, E. The review of the effect of growth hormone on immune system, metabolism and osmoregulation of fish. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, v. 5, n. 5, p. 467-475. 2011.

Zhang, W.; Inan, M.; Meagher, M.M. Fermentation strategies for recombinant protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, v. 5, p. 275-287. 2000.

Zhu, T.; Guo, M.; Tang, Z.; Zhang, M.; Zhuang, Y.; Chu, J.; Zhang, S. Efficient generation of multi-copy strains for optimizing secretory expression of porcine insulin precursor in yeast *Pichia pastoris*. *J Appl Microbiol.*, v. 107, p. 954–63. 2009.

APÊNDICE

Soluções estoques e meios de cultivo utilizados

a) Solução estoque 10X YNB (13,4 %):

| | |
|---------------------|---------|
| Yeast Nitrogen Base | 34 g/L |
| Sulfato de amônio | 100 g/L |

Dissolver 3,4 g de YNB em 90 mL de água destilada. Adicionar 10 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e esperar dissolver. Esterilizar por filtração. A solução foi estocada a 4 °C.

b) Solução estoque 500X Biotina (0,02 %):

Dissolver 20 mg de biotina foi dissolvida em 100 mL de água destilada. A solução foi esterilizada por filtração e estocada a 4 °C.

c) Solução estoque de 50X glicerol (50 %):

Glicerol no volume de 50 mL de glicerol (100 %) foi misturado com 50 mL de água e esterilizado em autoclave a 120 °C por 20 minutos.

d) Solução estoque de 10X glicose (20 %):

Vinte gramas (20 g) de glicose foram dissolvidos em 100 mL de água destilada e esterilizada em autoclave a 120 °C por 20 minutos.

e) Solução estoque de tampão 10X fosfato 1 M, pH 6,0 (1 L):

A quantidade de 132 mL de K_2HPO_4 1 M foi combinada com 868 mL de KH_2PO_4 1 M. O pH foi ajustado para $6,0 \pm 0,1$ com ácido fosfórico ou KOH. A solução foi esterilizada em autoclave a 120 °C por 20 minutos.

f) Meio YPD (*Yeast Extract, Peptone, Dextrose Medium*): manutenção das linhagens hospedeiras:

| | |
|---------------------|--------|
| Extrato de levedura | 10 g/L |
| Peptona | 20 g/L |
| Glicose | 20 g/L |
| Ágar | 20 g/L |

Este meio foi esterilizado por autoclavagem e as soluções de glicose e de ampicilina, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, foram adicionadas posteriormente.

g) Meio MD (*Minimal Dextrose Medium*): meio mínimo com glicose e sem histidinam para seleção auxotrófica dos clones transformantes:

| | |
|---------|------------------------|
| YNB | 13,4 g/L |
| Biotina | 4×10^{-4} g/L |
| Glicose | 20 g/L |
| Ágar | 20 g/L |

O volume da mistura foi completado com água para 1 L e adicionados 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina.

h) Meio MM (*Minimal Methanol Medium*): meio mínimo com metanol sem histidina para determinação fenotípica Mut^+ e Mut^s :

| | |
|---------|------------------------|
| YNB | 13,4 g/L |
| Biotina | 4×10^{-4} g/L |
| Metanol | 5 g/L |
| Ágar | 20 g/L |

A mistura foi completada para o volume final com água ou ágar estéril, para meio líquido ou sólido, respectivamente, e recebeu ampicilina na concentração 100 $\mu\text{g/mL}$.

i) Meio BMGY-U (*Buffered Glycerol Complex Medium*): meio complexo tamponado com glicerol para o aumento de massa celular:

| | |
|-----------------------|------------------------|
| Extrato de levedura | 10 g/L |
| Peptona | 20 g/L |
| Tampão fosfato pH 6,0 | 100 mM |
| YNB ou Ureia | 13,4 g/L |
| Biotina | 4×10^{-4} g/L |
| Glicerol | 10 g/L |

O volume da mistura foi completado com água ou ágar estéril, para meio líquido ou sólido, respectivamente, e recebeu adição de $100 \mu\text{g/mL}$ de ampicilina.

j) Meio BMMY-U (*Buffered Methanol Complex Medium*): meio complexo tamponado com metanol para indução da expressão da proteína heteróloga:

| | |
|-----------------------|------------------------|
| Extrato de levedura | 10 g/L |
| Peptona | 20 g/L |
| Tampão fosfato pH 6,0 | 100 mM |
| YNB ou Ueia | 13,4 g/L |
| Biotina | 4×10^{-4} g/L |
| Metanol | 5 g/L |

A mistura foi completada com água ou ágar estéril, para meio líquido ou sólido, respectivamente, e recebeu adição de $100 \mu\text{g/mL}$ de ampicilina.

a) Meio FM22 (*Basal Sais Medium*): meio definido de composição salina utilizado em biorreator.

| | |
|---|----------|
| KH_2PO_4 | 42,9 g/L |
| $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ | 5 g/L |
| $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 1,0 g/L |
| K_2SO_4 | 14,3 g/L |

| | |
|--------------------------------------|----------|
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 11,7 g/L |
| Glycerol | 40 g/L |
| PTM4 | 1 mL/L |

A mistura foi completada com água destilada e o pH ajustado para pH 5 com KOH.

b) Solução de elementos traços PMT4 para o meio FM22

| | |
|---|----------|
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 2,0 g/L |
| NaI | 0,08 g/L |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 3,0 g/L |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0,2 g/L |
| H ₃ BO ₃ | 0,02 g/L |
| CaSO ₄ .2H ₂ O | 0,5 g/L |
| CoCl ₂ | 0,5 g/L |
| ZnCl ₂ | 7 g/L |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 22 g/L |
| Biotina | 0,2 g/L |
| [H ₂ SO ₄] | 1 mL |

A solução de PMT4 foi adicionada ao meio FM22 na concentração de 1 ml/L. Também foi adicionada ao metanol como suplemento na concentração de 4 mL/L.