



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

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DO cDNA CODIFICADOR DO  
HORMÔNIO DE CRESCIMENTO DE TAMBAQUI (*Colossoma  
macropomum*) NA LEVEDURA *Pichia pastoris***

**ELSON ANTONIO SADALLA PINTO**

**MANAUS, AMAZONAS**

**2012**

**ELSON ANTONIO SADALLA PINTO**

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DO cDNA CODIFICADOR DO  
HORMÔNIO DE CRESCIMENTO DE TAMBAQUI (*Colossoma  
macropomum*) NA LEVEDURA *Pichia pastoris***

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadores:

Dr. Jorge Ivan Rebelo Porto

Dr. Spartaco Astolfi Filho

**MANAUS, AMAZONAS**

**2012**

Ficha Catalográfica

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

P659c Pinto, Elson Antonio Sadalla  
Clonagem e expressão do cDNA codificador do hormônio de crescimento de tabaqui (*Colossoma macropomum*) na levedura *Pichia pastoris* / Elson Antonio Sadalla Pinto. 2012  
79 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Jorge Ivan Rebelo Porto  
Orientador: Spartaco Astolfi Filho  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Hormônio de crescimento. 2. Tabaqui. 3. Expressão heteróloga. 4. *Pichia pastoris*. 5. Biorreator. I. Porto, Jorge Ivan Rebelo. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

**BANCA EXAMINADORA**

**Dr. Jorge Ivan Rebelo Porto**

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

**Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva**

Universidade Federal do Amazonas – UFAM

**Dr. Luis Andre Morais Mariuba**

Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

## **DEDICATÓRIA**

*Com muito carinho dedico este trabalho aos meus queridos pais, Elson Antonio Valente Pinto e Cleudete Sadalla Pinto, ao meu querido sobrinho Lucas Gabriel Sadalla Marques, aos meus avôs, irmãos e amigos que sempre me agraciaram com suas amáveis companhias.*

## 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 Dr. Jorge Porto, por ter aceitado orientar-me e prosseguido até o fim com este propósito.*

*Ao Dr. Spartaco Astolfi Filho, por compartilhar sua experiência profissional e sua mente privilegiada que muito contribuiu para o êxito deste trabalho; de longe já o conhecia pela fama de grande cientista, hoje, de perto, o conheço pelo grande ser humano que é.*

*Ao Dr. Edmar Andrade, pelo acompanhamento passo-a-passo da maioria dos experimentos desenvolvidos nos laboratórios de Tecnologias do DNA Recombinante e Proteoma da UFAM, pela amizade e pelo incentivo.*

*Ao Msc. Edson Júnior, pelos ensinamentos de “introdução à Pichia pastoris”.*

*Ao Dr. Fabio Wegbecher, pelos ensinamentos e apoio na fase de construção do pré-projeto de pesquisa.*

*Ao Dr. Luis Andre Moraes Mariuba, pelo acompanhamento e apoio no experimento de Western Blotting.*

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

*Aos amigos do CAM, em especial a Suelen, que participou ativamente dos experimentos realizados neste trabalho. À Eliane, Anita, PH, Hugo, Helber, Rogério, Andrezão, João, Marcos Pessoa, Dina, Lana, Jonathan, Bruna e Patrícia agradeço pelas trocas de experiências e aprendizagem.*

*Também agradeço:*

*A CAPES, pelo incentivo financeiro.*

*À UFAM, pela oportunidade de avançar nos estudos.*

*Ao PPGBIOTEC e todos seus servidores.*

*E ao IFAM Campus Coari, por autorizar minhas vindas à Manaus para participar das disciplinas e experimentos laboratoriais.*

*Muito obrigado!*

*Sucesso significa fazer o melhor que conseguimos com aquilo que temos. O sucesso é o fazer, não o obter; é a tentativa, não o triunfo. O sucesso é um padrão pessoal [...] tornando-nos em tudo aquilo que podemos ser.*

*Zig Ziglar*

## RESUMO

Estudos genéticos envolvendo a busca, clonagem e expressão de genes codificadores de proteínas associadas a importantes processos fisiológicos e características vantajosas do ponto de vista econômico têm tornado as pesquisas biotecnológicas cada vez mais promissoras. Pela sua importância zootécnica, os genes codificadores do hormônio de crescimento (GH) de diversas espécies de peixes têm sido isolados, clonados e expressos em sistemas de expressão heteróloga. O tambaqui (*Colossoma macropomum*), espécie de peixe amazônica considerada promissora para a aquicultura, tem sido objeto de extensas pesquisas biotecnológicas mirando a ampliação da capacidade produtiva da espécie. Neste trabalho, objetivou-se expressar o cDNA do GH de tambaqui na levedura metilotrófica *Pichia pastoris*. A sequência nucleotídica da região estrutural do cDNA do GH de tambaqui foi otimizada com os códons preferenciais de *P. pastoris* e obtida por síntese química e subclonada no vetor de expressão e secreção pPIC9. A expressão foi regulada pelo promotor AOX1 e a proteína recombinante endereçada para o sobrenadante da cultura por ação do peptídeo sinal fator  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae*. A análise em gel SDS-PAGE revelou a presença de uma banda proteica de aproximadamente 23 kDa, a qual foi confirmada ser o GH recombinante de tambaqui (rtGH) através de análise *Western blotting*. Futuramente, rtGH deverá ser analisado quanto a sua eficiência na aceleração do crescimento de juvenis de tambaqui com vista à possibilidade de uso na produção aquícola, o que decerto representará inovação nas tecnologias de cultivos de peixes nativos da Amazônia.

**Palavras-chave:** Hormônio de crescimento, tambaqui, expressão heteróloga, *Pichia pastoris*.

## ABSTRACT

Genetic studies involving search, cloning and expression of protein-coding genes associated with important physiological processes and advantageous characteristics from an economic point of view have made biotechnological research increasingly promising. Due to their zootechnical importance, the genes encoding growth hormone (GH) from several fish species have been isolated, cloned and expressed in heterologous expression systems. Tambaqui (*Colossoma macropomum*), an Amazonian fish species considered promising for aquaculture, has been the subject of extensive biotechnological research aimed at expanding the species' productive capacity. In this work, the objective was to express the tambaqui GH cDNA in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. The nucleotide sequence of the structural region of the tambaqui GH cDNA was optimized with the preferred codons of *P. pastoris* and obtained by chemical synthesis and subcloned into the pPIC9 expression and secretion vector. Expression was regulated by the AOX1 promoter and the recombinant protein addressed to the culture supernatant by the action of the signal peptide factor  $\alpha$  from *Saccharomyces cerevisiae*. SDS-PAGE gel analysis revealed the presence of a protein band of approximately 23 kDa, which was confirmed to be recombinant tambaqui GH (rtGH) through Western blotting analysis. In the future, rtGH should be analyzed for its efficiency in accelerating the growth of tambaqui juveniles with a view to the possibility of use in aquaculture production, which will certainly represent innovation in native fish farming technologies in the Amazon.

**Keywords:** Growth hormone, tambaqui, heterologous expression, *Pichia pastoris*.

## LISTAS DE SÍMBOLOS E SIGLAS

$\mu$	Micrômetro
A	Adenosina
<i>aox</i>	Gene codificador da enzima álcool oxidase
AOX	Promotor do gene da enzima álcool oxidase
Asn ou N	Asparagina
C	Citosina
cdNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
Cys ou C	Cisteína
D.O. <sub>600</sub>	Densidade óptica a 600 nanômetros
DNA	Ácido desoxirribonucleico
g	Gravidade
G	Guanina
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> )
His <sup>-</sup>	Fenótipo de <i>P. pastoris</i> incapaz de sintetizar o aminoácido histidina
His <sup>+</sup>	Fenótipo de <i>P. pastoris</i> que tem a capacidade de sintetizar o aminoácido histidina
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)
km <sup>2</sup>	Quilômetro quadrado
L	Litro
M	Molar
mA	Miliampères (10 <sup>-3</sup> Unidade de corrente elétrica)
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
Mut <sup>+</sup>	Máxima utilização de metanol ( <i>methanol utilization plus</i> )
Mut <sup>s</sup>	Lenta utilização do metanol ( <i>methanol utilization slow</i> )
NCBI	Centro nacional de informação biotecnológica ( <i>national center for biotechnology information</i> )
nm	Nanômetro
p/p	Peso por peso
p/v	Peso por volume
pb	Pares de bases nitrogenadas
PCR	Reação em cadeia da polimerase ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pI	Ponto isoelétrico
pmol	Picomol
rGH	Hormônio de crescimento recombinante
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotação por minuto
rtGH	Hormônio de crescimento recombinante de tabaqui
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase via transcrição reversa ( <i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i> )
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio – gel de poliácridamida ( <i>sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
Ser ou S	Serina
T	Timina
<i>tgh</i>	Gene codificador do hormônio de crescimento de tabaqui
tGH	Hormônio de crescimento de tabaqui
Thr ou T	Treonina
U	Unidade enzimática: quantidade de enzima necessária para digerir um $\mu$ g (micrograma) de DNA do fago $\lambda$ em condições ótimas de reação.
v/v	Volume por volume
W	Watt (Unidade de potência)
$\alpha$	Alfa

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa da distribuição geográfica do tabaqui. Norte da América do Sul mostrando os limites das bacias dos rios Amazonas, Orinoco e Tocantins (linha pontilhada) e a localização das principais cidades das bacias dos rios Amazonas e Orinoco onde há registros de desembarques de tabaqui capturados.  
**Fonte:** Costa et al. (2001) com adaptações.....19
- Figura 2.** Modelo molecular em estrutura 3-D do GH de “rohu”. Em destaque as 4 alfa-hélices antiparalelas com duas pontes dissulfeto entre as cadeias. É a estrutura tridimensional consenso para as moléculas de hormônio de crescimento.  
**Fonte:** Venugopal et al. (2002b).....22
- Figura 3.** 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 pituitária.  
**Fonte:** Duan (1997) com adaptações.....24
- Figura 4.** Via metabólica do metanol em *Pichia pastoris*: 1-Álcool oxidase; 2-Catalase; 3-Formaldeído desidrogenase; 4-Formato desidrogenase; 5-Diidroxiacetona sintase; 6-Diidroxiacetona quinase; 7-Frutose 1,6-bifosfato aldolase; 8-Frutose 1,6-bisfosfatase.  
**Fonte:** Cereghino & Cregg (2000) com adaptações.....27
- Figura 5.** Diagrama da estrutura de N-oligossacarídeos ligados ao resíduo asparagina (Asn) da enzima invertase de *Saccharomyces cerevisiae* expressa por *Pichia pastoris*. Oligossacarídeos e os tipos de ligações estão indicados no canto esquerdo superior. Os círculos abertos com linhas tracejadas representam as mais frequentes posições observadas para as últimas manoses em oligossacarídeos de *P. pastoris*. As ligações  $\alpha$ -1,3 das manoses terminais da estrutura cerne do oligossacarídeo em *S. cerevisiae* são as principais responsáveis pela elevada natureza antigênicas das glicoproteínas dessa levedura.  
**Fonte:** Cregg et al. (1993) com adaptações.....29
- Figura 6.** Vetor de expressão típico para o sistema *Pichia pastoris*. A maioria dos vetores desenvolvidos para esta levedura compartilham as características gerais mostradas em preto, enquanto outros possuem uma sequência sinal (Sig) e/ou origem em bacteriófago.  
**Fonte:** Invitrogen (2010) com adaptações.....31
- Figura 7.** Integração por adição do vetor ao genoma de *Pichia pastoris*. A integração ocorre por recombinação simples entre a região HIS4 do vetor com a região homóloga no genoma de *P. pastoris*. O gene *his4* mutado no genoma é restaurado durante a recombinação com a região HIS4 não mutada do vetor.  
**Fonte:** Invitrogen (2010) com adaptações.....32
- Figura 8.** Integração por adição do vetor ao genoma de *Pichia pastoris*. A integração ocorre por recombinação simples entre a região 3'AOX1 do vetor com a região homóloga no genoma de *P. pastoris*.  
**Fonte:** Invitrogen (2010) com adaptações.....32
- Figura 9.** Integração por substituição gênica do vetor com o locus do gene *aox1* no genoma de *Pichia pastoris*. A substituição ocorre por recombinação dupla entre as duas regiões 5'AOX1 (promotor) e 3'AOX1 com as respectivas regiões homólogas no genoma de *P. pastoris*. Esse tipo de integração resulta em transformantes de fenótipo Mut<sup>s</sup>.  
**Fonte:** Invitrogen (2010) com adaptações.....33

**Figura 10.** À esquerda: fenótipo dos peixes dos grupos controle e experimental após seis semanas de tratamento com o GH recombinante de tilápia (tiGH) (tamanho dado em centímetros). À direita: peso corporal na 2ª, 4ª e 6ª semana do início do experimento.

**Fonte:** Acosta et al. (2007) com adaptações.....38

**Figura 11.** Mapa circular do vetor de clonagem pUC19 e suas principais regiões.

**Fonte:** *New England BioLabs*.....41

**Figura 12.** Mapa circular do vetor de expressão e secreção pPIC9 e suas principais regiões.

**Fonte:** Invitrogen (2010).....41

**Figura 13.** Múltiplo sítio de clonagem do vetor pPIC9 e as regiões adjacentes. No círculo vermelho observam-se sítios *EcoRI* e *NotI* que foram usados para subclonagem direcional do inserto *tgh* ao vetor pPIC9. Nos círculos pretos evidenciam-se os sítios de anelamento dos iniciadores usados na PCR de colônia. O códon de iniciação da tradução (ATG) a partir do fator  $\alpha$  do peptídeo sinal e a sequência de clivagem proteolítica do peptídeo sinal após o endereçamento da proteína também estão mostrados.

**Fonte:** Invitrogen (2010) com adaptações.....43

**Figura 14.** Sequência de aminoácidos predita para o GH recombinante de tabaqui. Alinhamento traducional do cDNA otimizado para expressão em *Pichia pastoris*. Os destaques cinzas indicam a existência de dois sítios sinais para N-glicosilação e quatro resíduos de cisteína. Em negrito estão os sítios 5'-*EcoRI* e 3'-*NotI*. Também estão destacadas as sequências 5'-Kozak e a cauda de histidina na região C-terminal.....52

**Figura 15.** Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8 % da dupla digestão do vetor pUC-tGH com as endonucleases *EcoRI* e *NotI*. M: marcador de massa molecular de 1Kb (Promega). Poço 1: plasmídeo pUC-tGH após digestão endonucleásica; 2: inserto gênico *tgh* purificado; 3: vetor pPIC9 purificado e linearizado com *EcoRI* e *NotI*; 4: vetor pPIC9 não-linearizado.....53

**Figura 16.** Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8 % mostrando os resultados da PCR de 10 clones de *E. coli* DH10B transformados com o produto da ligação entre o vetor pPIC9 e o inserto *tgh*. M: marcador de massa molecular de 1kb (Promega). Poços 1 e 6-9: *E. coli* DH10B/pPIC-tGH; 2-5 e 10: *E. coli* DH10B/pPIC9; 11: controle negativo da reação. As bandas positivas quanto a presença do fragmento gênico *tgh* correspondem ao somatório entre o tamanho deste fragmento (586 pb) e a região codificadora para o peptídeo sinal (492 pb) do vetor pPIC9.....53

**Figura 17.** Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8 % mostrando a digestão dupla do plasmídeo recombinante pPIC-tGH com as endonucleases *EcoRI* e *NotI*. M: marcador de massa molecular de 1kb (Invitrogen); Poço 1: pPIC-tGH após a digestão endonucleásica. As setas indicam as bandas correspondentes ao vetor pPIC9 e ao inserto *tgh*.....54

**Figura 18.** Colônias de *Pichia pastoris* GS115 transformadas His<sup>+</sup> com o cassete de expressão do plasmídeo recombinante pPIC-tGH após digestão com a endonuclease *BglII*.....55

**Figura 19.** Fenótipos Mut<sup>+</sup> e Mut<sup>s</sup> de *Pichia pastoris* GS115/pPIC-tGH em meios MD (à esquerda) e MM (à direita). Dentro dos círculos vermelhos estão os fenótipos Mut<sup>s</sup>, os demais são Mut<sup>+</sup>. Nos círculos verdes na parte superior estão os controles positivos de fenótipo conhecido: *P. pastoris* Mut<sup>s</sup> (esquerda) e Mut<sup>+</sup> (direita).....55

**Figura 20.** Gráfico da cinética do crescimento de clones de *Pichia pastoris* GS115 produtora de GH recombinante de tabaqui (rtGH) durante a indução com metanol. C1 e C4: clones GS115/pPIC-tGH/Mut<sup>s</sup>; C2 e C3: clones GS115/pPIC-tGH/Mut<sup>+</sup>; C-: clone GS115/pPIC9/Mut<sup>+</sup> (controle negativo).....56

**Figura 21.** Perfil eletroforético de proteínas em gel SDS-PAGE 15 %. Expressão do GH recombinante de tabaqui no clone C3 de fenótipo Mut<sup>+</sup> (*Pichia pastoris* GS115/pPIC-tGH/Mut<sup>+</sup>). Poços de 1-5: tempos de indução 0 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h (GS115/pPIC-tGH/Mut<sup>+</sup>); 6: marcador de massa molecular de proteínas (Fermentas); 7: GH humano, isoforma de 20 kDa (Cristália); 8-10: tempos de indução 0 h, 48 h e 96 h do clone C- (GS115/pPIC9/Mut<sup>+</sup>, controle negativo).....57

**Figura 22.** Perfil eletroforético de proteínas em gel SDS-PAGE 15 %. Expressão do GH recombinante de tabaqui no clone C4 de fenótipo Mut<sup>s</sup> (*Pichia pastoris* GS115/pPIC-tGH/Mut<sup>s</sup>). Poços de 1-5: tempos de indução 0 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h (GS115/pPIC-tGH/Mut<sup>s</sup>); 6: marcador de massa molecular de proteínas (Fermentas); 7: GH humano, isoforma de 20 kDa (Cristália); 8-10: tempos de indução 0 h, 48 h e 96 h do clone C- (GS115/pPIC9/Mut<sup>+</sup>, controle negativo).....58

**Figura 23.** Análise *Western blotting* da expressão do GH recombinante de tabaqui nos clones de *Pichia pastoris* Mut<sup>+</sup> (C3) e Mut<sup>s</sup> (C4). M: marcador de massa molecular, 10-230 kDa (*New England BioLabs*); C-: controle negativo no tempo de 72 h de indução. A reação apontada pela seta indica a ocorrência de degradação proteolítica ou a formação de isoformas do GH recombinante de tabaqui.....62

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
2.1 Geral	17
2.2 Específicos	17
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>18</b>
3.1 Tabaqui	18
3.2 Hormônio de crescimento (GH)	20
3.3 O sistema de expressão <i>Pichia pastoris</i>	25
3.4 Produção heteróloga de hormônios de crescimento de peixes	34
3.5 Efeito de hormônios de crescimento recombinantes (rGHs) sobre o crescimento de peixes	37
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>40</b>
4.1 Linhagens de hospedeiras	40
4.2 Meios de cultivos	40
4.3 Vetores utilizados	40
4.4 Síntese química da região estrutural do gene do hormônio de crescimento de tabaqui ( <i>tgh</i> )	42
4.5 Construção do plasmídeo recombinante pPIC-tGH	42
4.6 Transformação de <i>Escherichia coli</i> DH10B com o plasmídeo recombinante pPIC-tGH	44
4.7 PCR de colônia para seleção dos transformantes de <i>Escherichia coli</i> DH10B carregando plasmídeo recombinante pPIC-tGH	45
4.8 Extração de DNA plasmidial	45
4.9 Análise de restrição do plasmídeo recombinante pPIC-tGH	46
4.10 Transformação de <i>Pichia pastoris</i> GS115 com o plasmídeo recombinante pPIC-tGH	46
4.11 Seleção dos fenótipos Mut <sup>+</sup> e Mut <sup>s</sup> de <i>Pichia pastoris</i> GS115/pPIC-tGH	47
4.12 Indução da expressão heteróloga em frascos agitados com <i>Pichia pastoris</i> GS115/pPIC-tGH/Mut <sup>+</sup> e Mut <sup>s</sup>	48
4.13 Cinética de crescimento em metanol de <i>Pichia pastoris</i> GS115/pPIC-tGH	48
4.14 Análise da proteína recombinante em gel SDS-PAGE	49
4.15 Análise <i>Western blotting</i> para confirmação da proteína recombinante	49
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>51</b>
5.1 Síntese química da região estrutural do gene <i>tgh</i> para expressão em <i>Pichia pastoris</i> GS115	51
5.2 Construção do plasmídeo recombinante pPIC-tGH	52
5.3 Transformação de <i>Pichia pastoris</i> GS115 com o plasmídeo recombinante pPIC-tGH	54
5.4 Determinação dos fenótipos Mut <sup>+</sup> e Mut <sup>s</sup> de <i>Pichia pastoris</i> GS115/pPIC-tGH	55
5.5 Cinética de crescimento em metanol de <i>Pichia pastoris</i> produtora de rGH de tabaqui	56
5.6 Análise da proteína recombinante em gel SDS-PAGE	57
5.7 Análise <i>Western blotting</i> da proteína recombinante no sobrenadante da cultura	62
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>63</b>
<b>7 PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>64</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>65</b>
<b>APÊNDICE</b>	<b>78</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Amazônia abrange um território de aproximadamente sete milhões de km<sup>2</sup> e comporta a maior bacia hidrográfica do planeta, que serve de habitat para uma gama de espécies aquáticas. A diversidade de peixes na bacia amazônica acompanha a sua dimensão, cujas estimativas atuais apontam para a existência de 1000 a 3000 espécies (Barthem & Fabré, 2003; Buckup et al., 2007).

Não basta que a bacia amazônica comporte a maior biodiversidade aquática do mundo, é importante também que essa biodiversidade seja explorada sustentavelmente em seu potencial de modo a despontar num genuíno processo de desenvolvimento da região. Nessa perspectiva, a piscicultura é apontada como um caminho promissor. As iniciativas que visam a produção de peixes em sistemas de cultivo são importantes pelo fato de contribuírem para a disponibilização do pescado no mercado o ano inteiro, dessa forma atendendo a crescente demanda de consumo da população. Além disso, a diminuição das pressões sobre os estoques naturais possibilita a manutenção da variabilidade genética das espécies exploradas (Suframa, 2003).

Estudos genéticos envolvendo a busca, clonagem e expressão de genes codificadores de produtos associadas a importantes processos metabólicos e características vantajosas do ponto de vista econômico têm tornado as pesquisas biotecnológicas cada vez mais promissoras. Um gene cujo seu produto está envolvido em uma cadeia de processos metabólicos e fisiológicos interessantes para fins biotecnológicos, e que vem sendo explorado nessas pesquisas, é o gene codificador do hormônio de crescimento (GH). A caracterização molecular e a expressão heteróloga desse gene, sobretudo das espécies economicamente visadas, têm sido objeto de extensas pesquisas com foco em aquicultura (Tsai et al., 1997; Venugopal et al., 2002ab; Funkenstein et al., 2005; Acosta et al., 2007, 2009).

Nessa perspectiva, o sucesso da expressão heteróloga, por meio das técnicas moleculares, sugere a possibilidade de produção em larga escala de GHs de peixes. Esse hormônio pode ser utilizado como fator anabólico suplementar em rações comumente utilizadas em piscicultura, o que decerto representará inovação nas tecnologias de cultivo de pescados amazônicos (Tsai et al., 1993b).

Existem relatos de que, até 2002, cerca de 30 espécies de peixes já estavam com o cDNA do GH clonado (Venugopal et al., 2002b). Atualmente acredita-se que esse número tenha aumentado, embora não haja na literatura levantamentos atualizados sobre o assunto. A maioria das descrições a respeito da identificação e expressão heteróloga de hormônios de crescimento de peixes é resultado de pesquisas com espécies de origem europeia e de outros países, como a

China e a Índia. Até agora, a única espécie de peixe nativa da Amazônia contemplada com estudos sobre o gene codificador do GH é o tambaqui (*Colossoma macropomum*), que teve o cDNA desse gene isolado e caracterizado por Sousa (2009).

Neste estudo, a sequência nucleotídica do gene do hormônio de crescimento de tambaqui (tGH) foi otimizada para expressão eficiente na levedura metilotrófica *P. pastoris*, visando sua futura incorporação nas tecnologias de cultivo dessa importante espécie Amazônica. Nessa perspectiva, pesquisas realizadas em diversas partes do mundo têm demonstrado que o GH, seja natural ou recombinante, quando administrado aos peixes apresenta boa eficiência na aceleração do crescimento e na formação de biomassa (Agellon et al., 1988b; Promdonkoy et al., 2004; Acosta et al., 2007).

Portanto, com a realização deste trabalho espera-se contribuir para futuras inovações biotecnológicas voltadas a utilização de produtos gênicos direcionados às tecnologias de cultivo de tambaqui, mirando na melhoria dos índices de desempenho zootécnico, tornando essa espécie mais rentável à piscicultura.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Clonar e expressar a região estrutural do gene do hormônio de crescimento de tabaqui (*Colossoma macropomum*) na levedura metilotrófica *Pichia pastoris*.

### 2.2 Específicos

- I. Otimizar a sequência da região codificadora do gene do hormônio de crescimento de tabaqui (*tgh*) para expressão eficiente em *P. pastoris*.
- II. Clonar a região codificadora do gene *tgh* num vetor de expressão e secreção do hormônio de crescimento recombinante de tabaqui (rtGH) em *P. pastoris*.
- III. Selecionar os clones transformantes de *P. pastoris* positivos para expressão do rtGH e caracterizá-los quanto aos fenótipos possíveis.
- IV. Avaliar a expressão do rtGH em *P. pastoris*.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Tambaqui

O peixe é um dos recursos naturais mais abundantes e consumidos na região amazônica (Suframa, 2003; Batista et al., 2007). A maior parte das espécies amazônicas com características apropriadas para piscicultura pertencem às ordens Characiformes e Osteoglossiformes. Na primeira ordem estão as famílias Characidae, representada pelas espécies tambaqui (*Colossoma macropomum*), pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) e matrinxã (*Brycon sp.*), Prochilodontidae, com as espécies curimatã (*Prochilodus nigricans*) e os jaraquis (*Semaprochilodus insignis*, *S. taeniurus*), e Anostomidae, na qual se incluem os piaus e aracus dos gêneros *Schizodon* e *Leporinus*; na segunda ordem, estão os Arapaimidae, representada pelo pirarucu (*Arapaima gigas*) (Val et al., 2000; Soares et al., 2000). O *C. macropomum*, popularmente conhecido como tambaqui, ruelo e bocó, é uma espécie que desperta grande interesse econômico uma vez que tradicionalmente é um dos peixes mais apreciados na culinária amazônica (Araújo-Lima & Goulding, 1998).

Segundo Nelson (2006), o tambaqui está classificado taxonomicamente da seguinte forma:

REINO Animalia

SUBFILO Vertebrata

SUPER-CLASSE Pisces ou Teleostomi

CLASSE Osteichthyes

SUBCLASSE Actinopterygii

ORDEM Characiformes

FAMÍLIA Characidae

SUBFAMÍLIA Serrasalminae

GÊNERO *Colossoma*

ESPÉCIE *Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818

O tambaqui é amplamente distribuído nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco, ocorrendo no Brasil, Peru, Colômbia, Bolívia e Venezuela (Araújo-Lima & Goulding, 1998; Costa et al., 2001). É o segundo maior peixe de escamas da América do Sul (Isaac & Ruffino,

2000), atrás apenas do *A. gigas*. Apresenta padrão alimentar onívoro com variações ontogenéticas: os adultos alimentam-se de frutos, sementes e zooplâncton, enquanto os alevinos e juvenis ingerem principalmente algas filamentosas, arroz silvestre, insetos, cladóceros, copépodes e larvas de quironomídeos (Goulding & Carvalho, 1982; Araújo-Lima & Goulding, 1998; Soares et al., 2008). O ciclo de vida está associado às planícies de inundação: os jovens (< 55 cm) vivem em lagos e áreas alagadas, e os adultos (> 55 cm) realizam a piracema no rio principal durante a seca: fenômeno de migração associada à reprodução e dispersão da espécie (Araújo-Lima & Goulding, 1998). A figura 1 mostra as principais cidades das bacias dos rios Amazonas e Orinoco, onde existem registros de desembarques de tambaqui nos últimos anos.



**Figura 1.** Mapa da distribuição geográfica do tambaqui. Norte da América do Sul mostrando os limites das bacias dos rios Amazonas, Orinoco e Tocantins (linha pontilhada) e a localização das principais cidades das bacias dos rios Amazonas e Orinoco onde há registros de desembarques de tambaqui capturados.

**Fonte:** Costa et al. (2001) com adaptações.

Por reunir características que o tornam apropriado à piscicultura, tais como a fácil obtenção de alevinos, bom potencial de crescimento, alta produtividade e rusticidade (Woynarovich, 1986; Araújo-Lima & Goulding, 1998), o tambaqui é a espécie nativa mais cultivada e produzida no Brasil: em 2010 foi responsável por 13,77 % da produção nacional (de 394.340,0 toneladas), ficando atrás somente das espécies exóticas carpa e tilápia, que juntas somam 63,4 % (MPA, 2012). Atualmente, de cada cinco tambaquis consumidos no Amazonas, quatro são provenientes de cativeiro (Jacometo et al., 2010).

Por sua importância econômica nacional e regional, o tambaqui foi incluído no

programa brasileiro de melhoramento genético junto com o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), o camarão branco (*Litopenaeus vannamei*) e a tilápia (*Oreochromis niloticus*) (Embrapa, 2009; Lopes et al., 2009). Ainda este ano foi anunciado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa, 2012) que o tambaqui e a cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) serão as primeiras espécies brasileiras de peixe a terem seu genoma sequenciado, o que sem dúvida implicará novas possibilidades de pesquisa e de melhoramento do potencial produtivo da espécie.

### 3.2 Hormônio de crescimento (GH)

O hormônio de crescimento (GH) foi, depois da insulina, o segundo produto biotecnológico oriundo das técnicas moleculares de engenharia genética. Este produto foi desenvolvido e inicialmente comercializado pela empresa *Genentech* e 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, como em estudos fisiológicos, veterinários e pecuária.

O GH é um hormônio pluripotente produzido pela glândula pituitária de vertebrados. Em peixes, o GH tem efeito em muitas diferentes funções e participa de quase todos os principais processos fisiológicos do corpo. Sua ação inclui a regulação dos íons, lipídios e proteínas, balanço osmótico, metabolismo dos carboidratos, crescimento dos tecidos moles e esqueléticos, reprodução e funções imunes. A atividade biológica do GH não está restrita apenas à promoção do crescimento por hiperplasia e hipertrofia, mas também inclui a mobilização de energia, desenvolvimento gonadal, apetite e comportamento social (Yousefian & Shirzad, 2011).

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 sugerem a evolução a partir de um ancestral comum (Moore et al., 1982; Chen et al., 1994). Dentre as características marcantes dos hormônios dessa família estão a massa molecular de aproximadamente 22 kDa, a existência de cerca de 200 resíduos de aminoácidos e a presença de resíduos de cisteínas envolvidos na formação de duas ou três pontes dissulfeto no interior da molécula. Essas pontes são altamente conservadas sugerindo um importante papel na ação biológica desses hormônios (Yousefian & Shirzad, 2011).

No caso específico do GH, o mesmo tem se revelado uma proteína com 22-23 kDa, e, em teleósteos e humanos, apresenta quatro resíduos de cisteínas em posições altamente conservadas, responsáveis pela formação de duas pontes dissulfeto essenciais à manutenção da integridade estrutural e atividade biológica da molécula. Há relatos da ocorrência de um resíduo adicional de cisteína nos GHs de alguns Ciprinídeos (“bighead carp” *Hypophthalmichthys nobilis*, “silver carp” *H. molitrix*, “grass carp” *Ctenopharyngodon idellus*) (Chang et al., 1992).

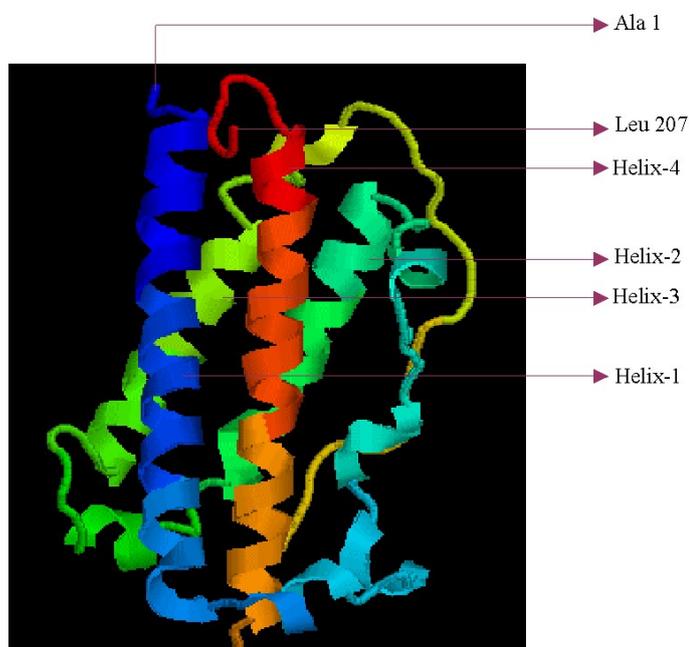
Muitos estudos de análise molecular mostram que os cDNAs de GHs de peixes codificam um polipeptídeo maduro com cerca de 178-191 resíduos de aminoácidos e um peptídeo sinal de 17-22 resíduos de aminoácidos (Agellon & Chen, 1986; Saito et al., 1988; Rentier-Delrue et al., 1989ab; Koren et al., 1989; Funkenstein et al., 1991; Chang et al., 1992; Pendón et al., 1994; Lemaire et al., 1994; Venugopal *et. al.*, 2002ab).

Também tem sido demonstrada a existência de potenciais sítios de glicosilação Asn-X-Ser/Thr (em que X pode ser qualquer aminoácido, exceto prolina) na molécula do GH de várias espécies de peixes, como o GH de salmão (*Oncorhynchus keta*) (Sekine et al., 1985), o que pode implicar na geração de diferentes isoformas da proteína durante o processamento pós-traducional. No caso do 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).

Em humanos, é conhecida uma variedade de isoformas de GH resultantes de diferentes *splicings* alternativos e processamento pós-traducional, tais como diferentes tipos de glicosilação, ligações covalentes e dissulfeto entre os oligômeros. Essas isoformas possuem massas moleculares que podem variar de 5 kDa a 44 kDa, sendo a isoforma de 22 kDa a mais produzida pela glândula pituitária humana e utilizada no tratamento do hipopituitarismo e outros distúrbios relacionados (Ray et al. 1989). A ocorrência de glicosilação também foi relatada para GH humano produzido em *P. pastori*, que preservou o efeito farmacológico e prolongamento da meia-vida na circulação de ratos para cerca de 24 vezes maior que a variante natural não glicosilada (Flintegaard et al. 2010). Esses resultados demonstram um aspecto positivo da glicosilação e tornam a expressão do GH de tambaqui em leveduras ainda mais promissora quando a intenção é sua utilização na piscicultura.

Com relação à estrutura tridimensional do GH de peixes, Venugopal et al. (2002b) observaram que os GHs de 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 4 alfa-hélices antiparalelas e 2 pontes dissulfeto entre as cadeias (figura 2).



**Figura 2.** Modelo molecular em estrutura 3-D do GH de “rohu”. Em destaque as 4 alfa-hélices antiparalelas com duas pontes dissulfeto entre as cadeias. É a estrutura tridimensional consenso para as moléculas de hormônio de crescimento.

**Fonte:** Venugopal et al. (2002b).

Por apresentar estrutura molecular bem conservada, o GH tem revelado um padrão similar de atuação fisiológica 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 somatotróficas 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 de liberação do GH pela glândula pituitária (Muller 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).

Com relação à atuação no organismo, o GH inicia sua ação biológica ligando-se às proteínas receptoras de GHs – GHRs existentes nas membranas 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*, demonstraram que a alimentação e a insulina atuam positivamente sobre a expressão do IGF I no fígado, acentuando o efeito estimulatório do GH (Duan & Plisetskaya, 1993; Peréz-Sánchez, 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 também 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 diversos 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, 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 3 está ilustrado o modelo de regulação endócrina do crescimento por meio do eixo GH/IGF I em peixes.



### 3.3 O sistema de expressão *Pichia pastoris*

*P. pastoris* é uma levedura metilotrófica cujas características genéticas e fisiológicas possibilitam usá-la como sistema de expressão de proteínas heterólogas. Essa levedura foi inicialmente desenvolvida como sistema hospedeiro para transformação por 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 ( $\text{His}^-$ ), sendo incapaz de crescer em meio auxotrófico para esse aminoácido. A transformação auxotrófica se baseia 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 ( $\text{His}^+$ ) e crescerem em meio auxotrófico. O gene *lacZ* (codificador da  $\beta$ -galactosidase) fusionado num vetor contendo o fragmento do promotor AOX1 regulado por metanol foi o primeiro gene expresso nessa levedura (Tschopp et al., 1987a).

Pelo fato de *P. pastoris* possuir status GRAS, os primeiros estudos na década de 1970 eram impulsionados principalmente pela possibilidade de usá-la como fonte de proteína de baixo custo para a alimentação animal. 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, 1993). Desse modo, a produção de proteínas heterólogas em *P. pastoris* pode ser facilmente obtida em todas as escalas, desde frascos agitados até grandes fermentadores (Siegel et al., 1989; Romanos, 1995), sendo útil para produzir quantidades em miligramas até gramas de proteínas, seja em laboratórios de pesquisas ou em plataformas industriais.

*Pichia pastoris* é o sistema de expressão eucarioto mais produtivo disponível atualmente (Invitrogen, 2010). Um número superior a 700 proteínas já foi expresso nesse sistema (Zhang et al., 2009), com relatos de obtenção de notáveis níveis de produção: 22 g/L para expressão intracelular (Hasslacher et al., 1997) e 14,8 g/L em expressão extracelular (Werten et al., 1999).

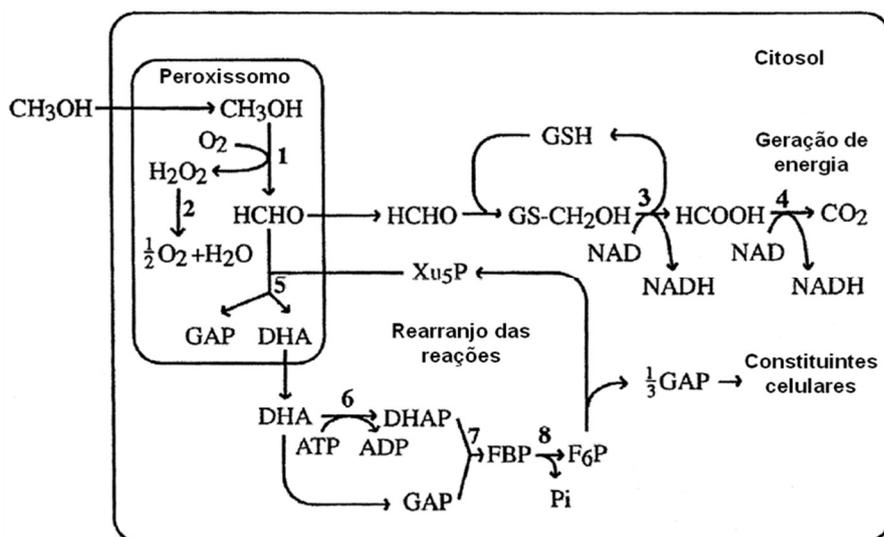
Como a produção de proteínas funcionais está intimamente relacionada à maquinaria celular do organismo hospedeiro (Macauley-Patrick et al., 2005), as células eucarióticas dispõem de habilidades de processamentos proteico ausentes em células procarióticas. Dessa forma, o mérito de *P. pastoris* como sistema de expressão está no fato de a mesma combinar características importantes de organismos eucariotos e procariotos. Essas incluem a fácil

manipulação genética e o rápido crescimento celular inerente aos procariotos, com uma complexa maquinaria subcelular que possibilita as modificações pós-traducionais tipicamente associadas aos eucariotos superiores, tais como o processamento da sequência sinal, dobramento da proteína, formação de pontes dissulfeto e clivagem proteolítica (Cregg et al., 1985, 1993, 2000).

Dentre as outras 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 protéica intra ou extracelular sob controle de promotores fortes e induzíveis, como o promotor AOX1 do gene da enzima álcool oxidase I; (d) técnicas de manipulação genética e fermentativa padronizadas e disponíveis comercialmente; e (e) modificações pós-traducionais mais compatíveis com as que ocorrem nos eucariotos (Cregg et al., 1993; Cereghino & Cregg 2000; Cereghino et al., 2002). Proteínas ineficientemente expressas em bactérias, *S. cerevisiae* ou células de insetos 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 pela linhagem hospedeira (Cereghino & Cregg, 2000; Macauley-Patrick et al., 2005; Li et al., 2007).

Nas leveduras metilotróficas, o metanol é metabolizado como fonte de carbono alternativa à glicose. O metanol é inicialmente oxidado nos peroxissomos pela ação das enzimas álcool oxidase (AO), catalase e diidroxiacetona sintase. O formaldeído gerado pela degradação do metanol pela enzima AO poderá seguir duas vias metabólicas: a geração de energia ou a formação de constituintes celulares, conforme ilustrado na figura 4 (Cereghino & Cregg, 2000). Durante o crescimento de *P. pastoris* em metanol, a enzima AO constitui a proteína mais abundante da célula, chegando a representar 30 % das proteínas celulares totais (Couderc & Baratti, 1980).



**Figura 4.** Via metabólica do metanol em *Pichia pastoris*: 1-Álcool oxidase; 2-Catalase; 3-Formaldeído desidrogenase; 4-Formato desidrogenase; 5-Diidroxiacetona sintase; 6-Diidroxiacetona quinase; 7-Frutose 1,6-bisfosfato aldolase; 8-Frutose 1,6-bisfosfatase.

**Fonte:** Cereghino & Cregg (2000) com adaptações.

A enzima AO é codificada por dois genes distintos existentes no genoma de *P. pastoris*: *aox1* e *aox2*, responsáveis por 95 % e 15 % da expressão da enzima AO, respectivamente (Cregg et al., 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 firmemente regulado pela fonte de carbono adicionada ao meio de cultura: a expressão é reprimida por glicose ou glicerol e induzida mais de mil vezes na presença de metanol como única fonte de carbono. Em células expostas ao metanol como única fonte de carbono, o promotor AOX1 é responsável por até 5 % da transcrição dos RNAs poli-A<sup>+</sup> totais, os quais são indetectáveis em células cultivadas em outras fontes de carbono como a glicose ou o glicerol (Cregg et al., 1993). O início da transcrição a partir do promotor AOX1 é altamente eficiente e comparável aos promotores dos genes constitutivos expressos na via glicolítica como o promotor PGK do gene codificador da enzima fosfoglicerato quinase.

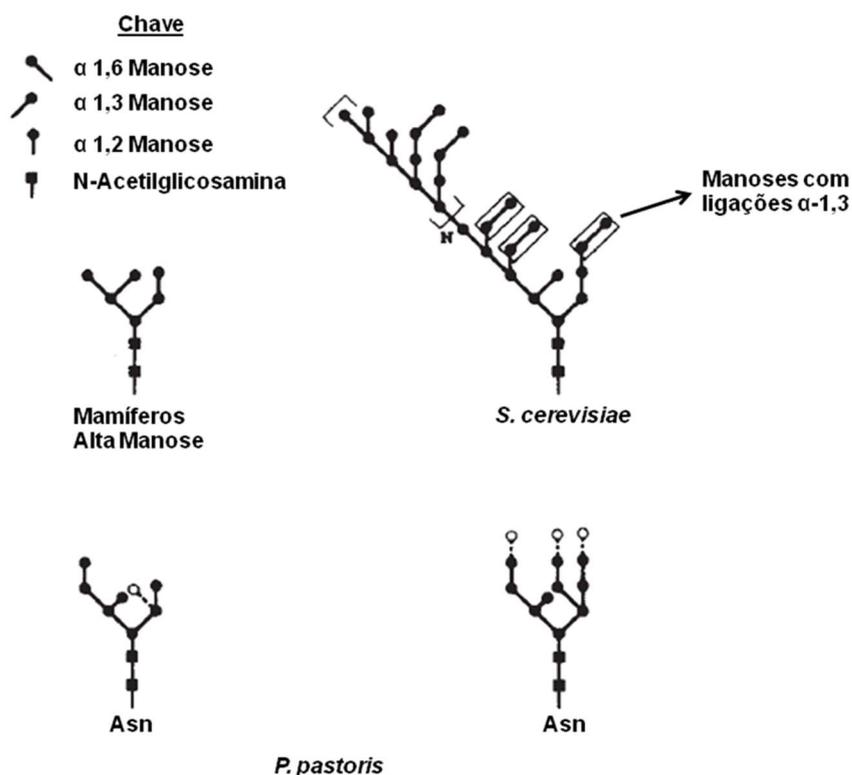
Outra característica importante da levedura *P. pastoris* é o seu perfil de glicosilação durante o processamento pós-traducional de proteínas transeuntes na via de secreção. Aproximadamente 0,5 a 1 % das proteínas traduzidas nos genomas de eucariotos são glicoproteínas (Daly & Hearn, 2005). A glicosilação ocorre no lúmen do retículo endoplasmático seguida de processamento no complexo golgiense (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 de oligossacarídeos N-

ligadas ao resíduo de Asn (asparagina) ou O-ligadas em quaisquer dos resíduos de Ser (serina) ou Thr (treonina) (Cregg et al., 2009).

Em leveduras e eucariotos superiores a N-glicosilação é mais conservada que a O-glicosilação, e envolve a adição de um núcleo de oligossacarídeo constituído por duas unidades N-acetilglicosamina (GlcNAc), nove manoses e três resíduos de glicose. Os resíduos de glicose são subsequentemente aparados na cadeia lateral e uma manose é removida. Essas etapas são comuns em leveduras, plantas e eucariotos superiores (Romanos et al., 1992; Bretthauer, 2003).

Durante a N-glicosilação o tamanho da cadeia de carboidratos adicionada por *P. pastoris* à proteína recombinante é bem menor do que a cadeia adicionada por *S. cerevisiae*. Em análise da estrutura de oligossacarídeos ligados ao grupamento amina (N-ligados) do resíduo asparagina (Asn) da enzima invertase e das glicoproteínas totais secretadas por *S. cerevisiae* e *P. pastoris*, foi verificado que, nessa última, mesmo as mais longas cadeias de glicanas possuem somente 30 resíduos de manoses. Essas são significativamente menores que os 50 a 150 resíduos de manoses tipicamente observados nas cadeias de glicoproteínas de *S. cerevisiae* (Kukuruzinska et al., 1987; Byrd, et al., 1982; Higgins & Cregg, 1998). A mais impressionante diferença é que as glicanas presentes na invertase secretada por *P. pastoris* não têm as ligações  $\alpha$ -1,3 entre os resíduos de manoses, características de *S. cerevisiae* (ver figura 5). O significado dessas observações é que as ligações  $\alpha$ -1,3 das manoses das glicoproteínas produzidas por *S. cerevisiae* são as principais responsáveis pela elevada natureza antigênicas dessas glicoproteínas (Cregg et al., 1993, Cregg, 1999).

Embora a estrutura dos carboidratos adicionados à proteína secretada seja característica muito específica de cada organismo, a estrutura dos oligossacarídeos adicionados às proteínas secretadas por *P. pastoris* é muito similar a dos adicionados às glicoproteínas das células de mamíferos, o que as torna menos antigênicas para essas células (Cregg, 1999).



**Figura 5.** Diagrama da estrutura de N-oligossacarídeos ligados ao resíduo asparagina (Asn) da enzima invertase de *Saccharomyces cerevisiae* expressa por *Pichia pastoris*. Oligossacarídeos e os tipos de ligações estão indicados no canto esquerdo superior. Os círculos abertos com linhas tracejadas representam as mais frequentes posições observadas para as últimas manoses em oligossacarídeos de *P. pastoris*. As ligações  $\alpha$ -1,3 das manoses terminais da estrutura cerne do oligossacarídeo em *S. cerevisiae* são as principais responsáveis pela elevada natureza antigênica das glicoproteínas dessa levedura.

**Fonte:** Cregg et al. (1993) com adaptações.

Na O-glicosilação, as cadeias de oligossacarídeos são ligadas ao grupamento hidroxila dos resíduos Ser ou Thr e ocorre principalmente no complexo golgiense (Bretthauer & Castellino, 1999). Os oligossacarídeos O-ligados sintetizados por leveduras são muito diferentes dos sintetizados por eucariotos superiores e são constituídos principalmente por resíduos de manoses (Romanos et al., 1992). Em mamíferos, a O-glicosilação é composta por N-acetilgalactosamina, galactose e ácido siálico. Em leveduras, tais como *S. cerevisiae*, a O-glicosilação é comumente constituída por um a nove resíduos de manoses arranjadas em ligações  $\alpha$ -1,2 (Duman et al., 1998).

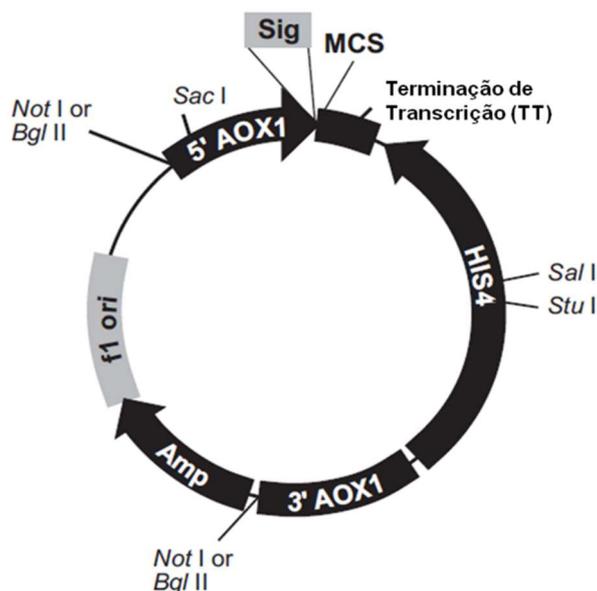
Tem sido sugerido que a glicosilação pode servir como um controle de qualidade antes da proteína entrar na via de secreção (Ellgaard & Helenius, 2003). Também tem sido relatado que a glicosilação pode aumentar a resistência da proteína contra a degradação proteolítica (Pratap et al., 2000), auxiliar no dobramento correto e na passagem pela via secretória, bem como aumentar a estabilidade da proteína madura (Rayon et al., 1998; Romanos et al., 1992; Daly & Hearn, 2005). Em revisão bibliográfica, Li et al. (2007) observaram que a maioria das

proteínas heterólogas N ou O-glicosiladas expressas 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 (Li et al., 2007). No entanto, há um relato de que a N-glicosilação extensiva foi responsável pela redução da estabilidade térmica da  $\alpha$ -amilase recombinante produzida em *P. pastoris* (Tull et al., 2001).

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<sup>-</sup>). Além dessa mutação, a linhagem KM71 é não funcional para o gene *aox1*, dependendo da enzima álcool oxidase produzida a partir do gene *aox2* para metabolizar metanol (fenótipo Mut<sup>s</sup>). E as linhagens SMD1163 / SMD1165 / SMD1168 são proteases defectivas devido à mutação nos genes *pep4* ou *prb1* ou ambos (SMD1163) (Invitrogen, 2010).

Os vetores de expressão desenvolvidos para *P. pastoris* carregam o fragmento HIS4 que complementa o gene *his4* mutado, restaurando a habilidade de sintetizar o aminoácido histidina nos transformantes (His<sup>+</sup>). Os vetores de expressão também possuem a região promotora (AOX1) e terminadora (TT) do gene *aox1*, para o controle 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 nessa bactéria (Invitrogen, 2010).

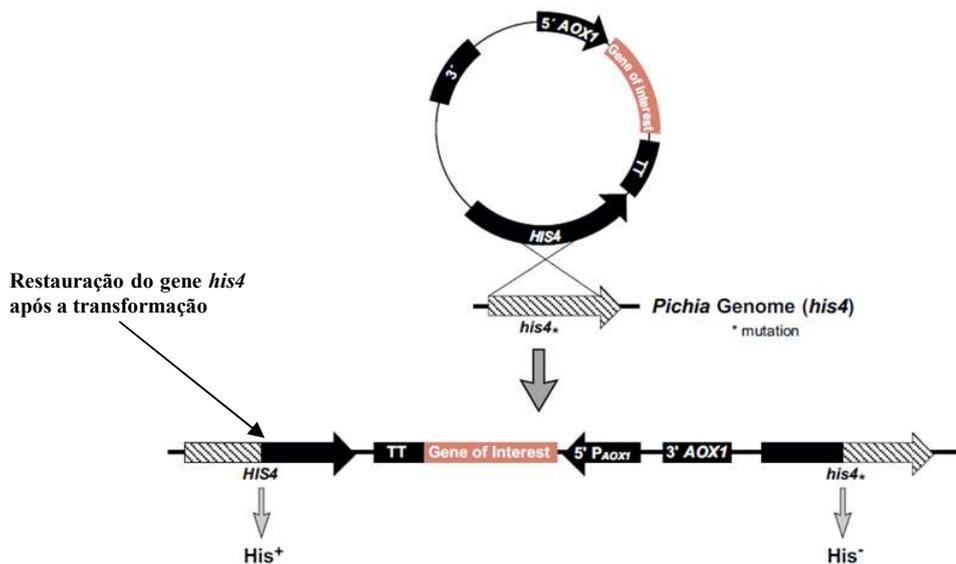
Embora a levedura *P. pastoris* tenha se mostrado um eficiente sistema de expressão de proteínas tanto intra quanto extracelular, nesse último caso existe a vantagem da levedura secretar baixos níveis de proteínas endógenas, o que faz da secreção da proteína heteróloga uma efetiva etapa de purificação, 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- $\alpha$  de *S. cerevisiae* é a sequência sinal mais frequentemente usada nos vetores comerciais. No entanto, vetores contendo a sequência sinal derivada do gene da enzima fosfatase ácida também estão disponíveis (Cregg et al., 2000; Zhang et al., 2000). Na figura 6, são mostradas as principais regiões comumente encontradas em vetores usados para transformação de *P. pastoris*.



**Figura 6.** Vetor de expressão típico para o sistema *Pichia pastoris*. A maioria dos vetores desenvolvidos para esta levedura compartilham as características gerais mostradas em preto, enquanto outros possuem uma sequência sinal (Sig) e/ou origem em bacteriófago.

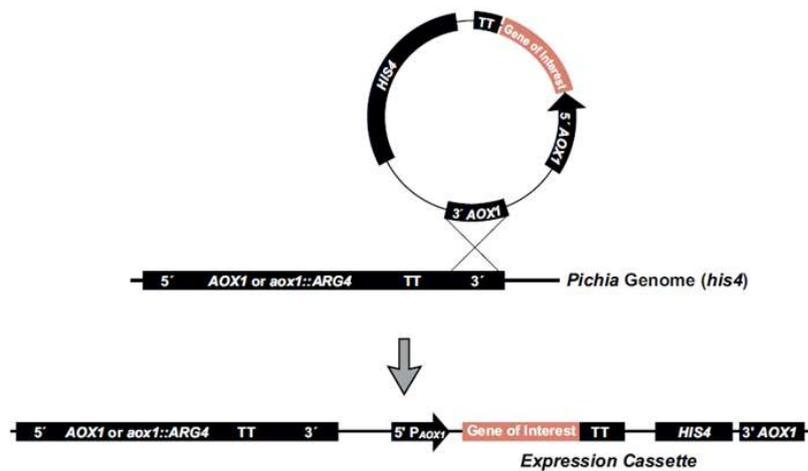
**Fonte:** Invitrogen (2010) com adaptações.

A transformação de *P. pastoris* ocorre por meio da integração do vetor ao genoma da levedura. 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 vários sítios de restrição nas regiões HIS4 ou 5'AOX1 existentes nos vetores de expressão (ver figura 6). 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<sup>+</sup> (máxima utilização de metanol – *methanol utilization plus*), cuja característica é a elevada habilidade da célula em metabolizar o metanol, exibindo um rápido crescimento em meio contendo metanol como única fonte de carbono (Cregg et al., 1993, 2000). Esse é o fenótipo encontrado na levedura selvagem. As figuras 7 e 8 mostram a integração do vetor ao genoma de *P. pastoris* por meio de recombinação homóloga com as regiões HIS4 ou AOX1 existentes nos vetores de expressão.



**Figura 7.** Integração por adição do vetor ao genoma de *Pichia pastoris*. A integração ocorre por recombinação simples entre a região *HIS4* do vetor com a região homóloga no genoma de *P. pastoris*. O gene *his4* mutado no genoma é restaurado durante a recombinação com a região *HIS4* não mutada do vetor.

Fonte: Invitrogen (2010) com adaptações.

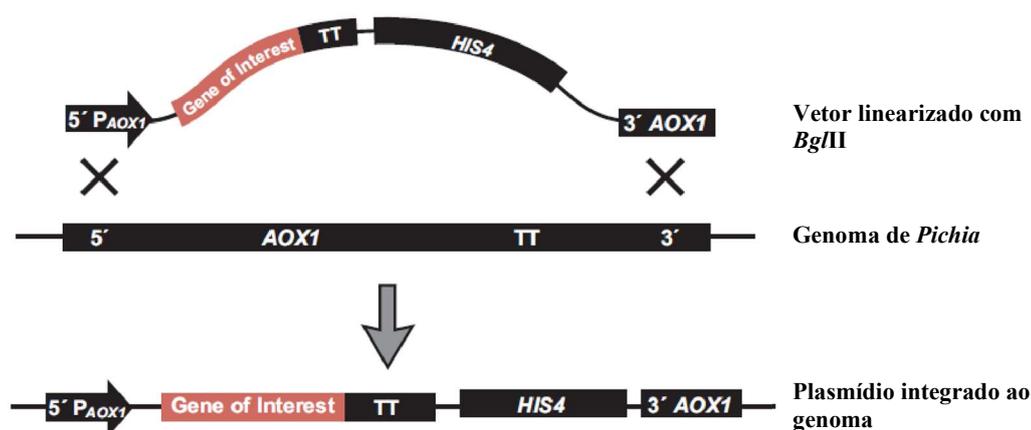


**Figura 8.** Integração por adição do vetor ao genoma de *Pichia pastoris*. A integração ocorre por recombinação simples entre a região 3' AOX1 do vetor com a região homóloga no genoma de *P. pastoris*.

Fonte: Invitrogen (2010) com adaptações.

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 9). Durante a transformação, essas regiões interagem com as respectivas regiões homólogas 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 com o gene heterólogo substitui o locus do gene *aox1* no genoma da levedura (Cregg et al., 1993, 2000). Dessa forma, o gene *aox1* sofre

um *knockout* (nocaute) e o metabolismo do metanol passa a ser realizado apenas pela enzima AO produzida pelo gene *aox2*, gerando transformantes com fenótipo Mut<sup>s</sup> (lenta utilização do metanol – *methanol utilization slow*), cuja característica é a reduzida habilidade celular em metabolizar o metanol, exibindo um lento crescimento em meio contendo metanol como única fonte de carbono. Algumas proteínas são expressas em níveis mais elevados nesse fenótipo do que no fenótipo Mut<sup>+</sup>, especialmente em culturas de frascos agitados (Higgins & Cregg, 1998; Cregg et al., 1993, 2000; Daly & Hearn, 2005).



**Figura 9.** Integração por substituição gênica do vetor com o locus do gene *aox1* no genoma de *Pichia pastoris*. A substituição ocorre por recombinação dupla entre as duas regiões 5' *AOX1* (promotor) e 3' *AOX1* com as respectivas regiões homólogas no genoma de *P. pastoris*. Esse tipo de integração resulta em transformantes de fenótipo Mut<sup>s</sup>.

**Fonte:** Invitrogen (2010) com adaptações.

Tanto na transformação por simples *crossover* (adição) como na substituição gênica, uma porcentagem significativa dos transformantes His<sup>+</sup> poderão 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* do vetor entra no genoma sem qualquer outra sequência adicional. Esse evento pode ocorrer em 10 a 50 % dos transformantes His<sup>+</sup> (Romanos, 1995; Cregg et al., 2000). Apenas 5 a 35 % dos transformantes são oriundos de substituição gênica (Mut<sup>s</sup>), os demais são originados das integrações em *HIS4* ou *AOX1* e são Mut<sup>+</sup> (Romanos, 1995; Invitrogen, 2010).

Devido às vantagens do sistema de expressão *P. pastoris*, essa levedura foi o organismo hospedeiro escolhido para a realização deste trabalho, pois além da fácil manipulação, os protocolos encontram-se padronizados no Laboratório de Tecnologias do DNA Recombinante da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, onde foram realizados os experimentos de expressão gênica.

### 3.4 Produção heteróloga de hormônios de crescimento de peixes

Por ter se tornado comercialmente importante na medicina, veterinária e pecuária, os genes codificadores de GHs têm sido clonados, sequenciados, expressos e filogeneticamente caracterizados em diversos vertebrados, incluindo os peixes (Barat et al., 1981; DeNoto et al., 1981; Sekine et al., 1985; Agellon et al., 1988ab; Yamano et al., 1988; Koren et al., 1989; Chiou et al., 1990; Funkenstein et al., 1991; Ho et al., 1991; Chang et al., 1992; Schneider et al., 1992; Bernardi et al., 1993; Tang et al., 1993; Lemaire et al., 1994; Venugopal et al., 1998; Anathy et al., 2001; Venugopal et al., 2002ab; Chen et al., 2004; Clements et al., 2004; Pinheiro et al., 2008). Apesar do amplo número de estudos com os genes de GHs de peixes, ainda são poucas as descrições na literatura de sequências gênicas de espécies nativas da Amazônia.

Em relação a expressão heteróloga, eficientes métodos para produção de GHs em larga escala têm sido desenvolvidos (Promdonkoy et al., 2004), sendo a produção heteróloga baseada em microrganismos um caminho promissor em biotecnologia. O GH recombinante, por apresentar função equivalente ao GH natural obtido da glândula pituitária, pode ser empregado em estudos fisiológicos (Li et al., 2003) ou em testes de melhoramento do desempenho zootécnico de peixes (Acosta et al., 2007), sendo a manipulação do crescimento desses organismos uma importante tarefa em biotecnologia aquática.

O uso de *E. coli* como sistema de expressão de GHs é amplamente descrito na literatura. O cDNA do GH de diversas espécies de peixes já foi clonado e expresso nesse sistema, a exemplo dos GHs de tilápia *Oreochromis sp.* (Rentier-Delrue et al., 1989a) e carpa *Cyprinus carpio* (Fine et al., 1993; Bai et al., 1999). Os GHs recombinantes produzidos em *E. coli* tiveram um importante papel nas pesquisas iniciais sobre as respostas fisiológicas de peixes submetidos ao hormônio e suas possíveis aplicações na aquicultura (Li et al., 2003). No entanto, *E. coli* é um procarioto, e durante a síntese proteica apresenta características intrínsecas diferentes das encontradas nos eucariotos. A baixa capacidade de endereçamento de proteínas no processamento pós-traducional dessa bactéria implica na formação de corpos de inclusão insolúveis e uma reduzida atividade da proteína recombinante (De Bernardez Clark, 1998).

Para que o GH exerça a bioatividade esperada na promoção do crescimento somático é essencial a ocorrência de dobramento correto dessa molécula por meio das pontes dissulfeto que se formam entre os resíduos de cisteína (Chen et al., 1992). Quando expresso em sistema procarioto, que não forma pontes dissulfeto, esse tipo de proteína sofre distorções conformacionais que levam a agregação e perda funcional da molécula (Arranz et al., 2008).

Portanto, a formação de corpos de inclusão insolúveis, a baixa atividade e a necessidade de renaturação da proteína produzida por *E. coli* representam limitações nas possibilidades de uso desse sistema de expressão em pesquisas com fins comerciais.

Com o desenvolvimento dos sistemas de expressão eucariotos, os GHs de diversas espécies de peixes passaram a ser produzidos em leveduras (Li et al., 2003), como alternativa às limitações dos sistemas procariotos. As vantagens desses sistemas residem no fato de que eles fornecem um ambiente apropriado para a síntese de proteínas eucarióticas, oferecendo condições para que ocorra dobramento correto, formação de pontes dissulfeto, oligomerização e modificações pós-traducionais (incluindo clivagem do peptídeo sinal, clivagem proteolítica, N-glicosilação, O-glicosilação, acilação, amidação, fosforilação e carboximetilação) similares às que ocorrem nas proteínas de mamíferos (Cregg et al., 1993; Cereghino & Cregg 2000; Cereghino et al., 2002).

Dependendo da finalidade de aplicação do produto expresso, pode-se optar entre as estratégias de expressão intra ou extracelular. Na expressão extracelular, existe a vantagem de a proteína recombinante ser endereçada diretamente para o sobrenadante da cultura, o que serve como primeira etapa de purificação do produto expresso. Por outro lado, na expressão intracelular, é necessária a adoção de procedimentos *downstream* de ruptura das células para extração da proteína recombinante, o que significa aumento nos custos de produção e etapas a mais no rol de experimentos laboratoriais (Cregg et al., 1993; Cereghino & Cregg, 2000).

Embora muitos estudos sobre os efeitos fisiológicos e eficiência de hormônios de crescimento recombinantes (rGHs) sobre o desempenho zootécnico de peixes tenham sido realizados com esses hormônios purificados, livres de *pellets* das células hospedeiras (Fine et al., 1993; Tsai et al., 1997; Jeh et al., 1998; Li et al., 2003; Funkenstein et al., 2005), a purificação de rGHs de peixes não é um processo economicamente viável para uso em cultivo comercial (Liu et al., 2008), haja vista a necessidade de tecnologia onerosa.

Além de *E. coli*, existem relatos da expressão bem-sucedida de rGHs de peixes em sistemas eucariotos, tais como leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* e *P. pastoris*), células de insetos e algas (Tabela 1).

Tabela 1. Produção de hormônios de crescimento de peixes em sistemas de expressão heteróloga.

Sistema de expressão	Espécie de peixe	Referência
<i>E. coli</i>	“chum salmon” ( <i>Oncorhynchus keta</i> )	Sekine et al. (1985)
	“rainbow trout” ( <i>Salmo gairdneri</i> )	Agellon & Chen (1986); Agellon et al. (1988b); Rentier-Delrue et al. (1989b); Tsai & Tseng (1992);
	“japanese eel” ( <i>Anguilla japonica</i> )	Saito et al. (1988)
	“tuna” ( <i>Thunnus thynnus</i> )	Sato et al. (1988, 1989); Kimura (1991)
	tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	Rentier-Delrue et al. (1989a)
	“grass carp” ( <i>Ctenopharyngodon idellus</i> )	Ho et al. (1991); Wang et al. (2001)
	“common carp” ( <i>Cyprinus carpio</i> )	Fine et al. (1993); Bai et al. (1999)
	“chinook salmon” ( <i>O. tshawytscha</i> )	Song et al., (1993)
	“yellowfin porgy” ( <i>Acanthopagrus latus</i> )	Tsai et al. (1993a, 1995, 1997)
	“striped bass” ( <i>Morone saxatilis</i> )	Cheng et al. (1995)
	“flounder” ( <i>Paralichthys olivaceus</i> )	Jeh et al. (1998)
	“goldfish” ( <i>Carassius auratus</i> )	Mahmoud et al. (1998)
	“rabbitfish” ( <i>Siganus guttatus</i> )	Ayson et al. (2000)
	“indian catfish” ( <i>Heteropneustes fossilis</i> )	Anathy et al. (2001)
	“rohu” ( <i>Labeo rohita</i> )	Venugopal et al. (2002a)
	“mrigal” ( <i>Cirrhina mrigala</i> ) e “catla” ( <i>Catla catla</i> )	Venugopal et al. (2002b)
	“giant catfish” ( <i>Pangasianodon gigas</i> )	Promdonkoy et al. (2004)
	“rabbitfish” ( <i>Siganus guttatus</i> )	Funkenstein et al. (2005)
	“pejerrey” ( <i>Odontesthes bonariensis</i> )	Sciara et al. (2006, 2011) Arranz et al. (2008)
<i>S. cerevisiae</i>	“tuna” ( <i>Thunnus thynnus</i> )	Hayami et al. (1989)
	“rainbow trout” ( <i>Salmo gairdneri</i> )	Tsai et al. (1994a); Ma et al. (1999)
	“giant catfish” ( <i>Pangasianodon gigas</i> )	Piyaviriyakul et al. (2002)
<i>P. pastoris</i>	“Japanese seabass” ( <i>Lateolabrax japonicus</i> )	Chen et al. (1998)
	“common carp” ( <i>Cyprinus carpio</i> )	Li et al. (2001, 2003)
	“grass carp” ( <i>Ctenopharyngodon idellus</i> )	Wang et al. (2003)
	tilápia ( <i>Oreochromis sp.</i> )	Acosta et al. (2007)
Células de insetos	“yellowfin porgy” ( <i>Acanthopagrus latus</i> )	Tsai et al. (1994b)
	“grass carp” ( <i>Ctenopharyngodon idellus</i> )	Ho et al. (1998)
Algas	“flounder” ( <i>Paralichthys olivaceus</i> )	Kim et al. (2003)
	“yellowfin porgy” ( <i>Acanthopagrus latus</i> )	Chen et al. (2008)
	“flounder” ( <i>Paralichthys olivaceus</i> )	Liu et al. (2008)

Uma importante vantagem da utilização da levedura *P. pastoris* para a produção de GHs está relacionada ao fato dessa levedura apresentar *status* GRAS (*generally regarded as safe*). A biomassa de *P. pastoris* expressando o rGH pode ser aproveitada como ingrediente na formulação de rações comerciais utilizadas em pisciculturas. Muitos estudos sobre a nutrição de peixes têm demonstrado que células de leveduras intactas, desidratadas ou lisadas em diferentes níveis de inclusão na ração aumentam a digestibilidade (Hisano et al., 2008), a eficiência alimentar, a resistência imunológica contra infecções (Li & Gatlin, 2003, 2004; Ortuño et al., 2002), os desempenhos produtivos (Tsai et al., 1993b; Hisano et al., 2007;

Gaiotto, 2005; Olvera-Novoa et al., 2002; Essa et al., 2011; Ozório et al., 2012) e reprodutivos (Signor, 2009), e a conversão alimentar de peixes (Meurer et al., 2000; Pezzato et al., 2006), além de servirem como fonte de vitaminas hidrossolúveis (Baccarin & Pezzato, 2001).

Portanto, a tecnologia de produção de proteínas heterólogas em sistemas eucariotos tem se apresentando como uma alternativa promissora em biotecnologia aquática visando o melhoramento do potencial produtivo de peixes cultivados, o que torna a produção heteróloga do GH de tambaqui em *P. pastoris* uma estratégia de ampliação da produtividade do tambaqui cultivado, tornando a espécie mais rentável à piscicultura.

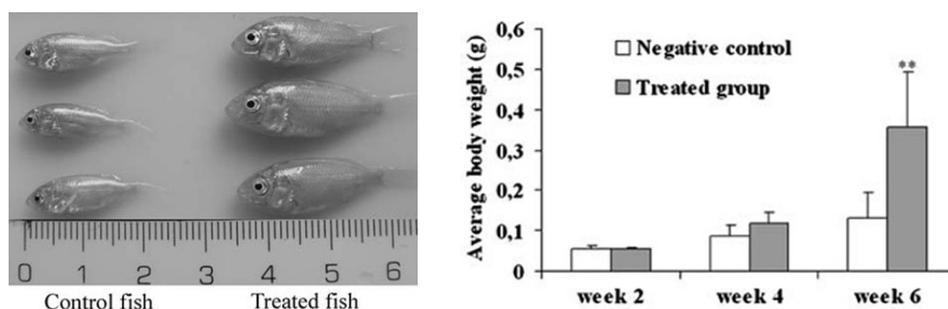
### **3.5 Efeito de hormônios de crescimento recombinantes (rGHs) sobre o crescimento de peixes**

Muitos estudos relatam que a administração de rGHs tem acelerado o crescimento, o peso e a conversão alimentar em peixes (Sekine et al., 1985; Agellon et al., 1988b; Melamed et al., 2002). Também existem relatos de que rGHs de mamíferos têm acelerado o crescimento em diversas espécies de peixes (Schulte et al., 1989; McLean et al., 1990; Hertz et al., 1991). Esses estudos concluem que o uso de rGHs é uma tecnologia possível em pecuária (Tsai et al., 1997).

Dentre as diversas maneiras pelas quais o rGH pode ser administrado aos peixes, a via oral junto à ração parece ser a mais viável à piscicultura, haja vista não necessitar de manuseio intensivo do animal (McLean et al., 1990; Jeh et al., 1998; Melamed et al., 2002), o que evita estresse nos tanques de cultivo (Tsai et al., 1997). Outra vantagem da administração oral está no fato de que as células epiteliais do trato intestinal de peixes absorvem o rGH com grande facilidade, visto que o mesmo logo é detectado no plasma sanguíneo (Le Bail, 1989; Hertz et al., 1991; Moriyama et al., 1990, 1993).

A administração do rGH também pode ser realizada mediante a imersão do peixe em água contendo o hormônio (Agellon et al., 1988b; Schulte et al., 1989; Moriyama & Kawauchi, 1990; Acosta et al., 2007), ou através de injeção via intramuscular ou intraperitoneal (Sekine et al., 1985; Schulte et al., 1989; Fine et al., 1993; Tsai et al., 1995; Guillén et al., 1998; Li et al., 2003; Promdonkoy et al., 2004; Funkenstein et al., 2005). Essas formas são impraticáveis em aquicultura de grande porte haja vista a necessidade de mão-de-obra (Liu et al., 2008), todavia são importantes para os estudos fisiológicos e de análise da bioatividade da molécula recombinante.

Acosta et al. (2007) demonstraram que o estudo da eficiência de rGHs pode ser realizado com o hormônio não purificado do extrato celular. Ao imergir tilápias por 90 minutos em água contendo células de *P. pastoris* intactas expressando o GH recombinante de tilápia (tiGH), em concentração de 0,1 mg de tiGH por litro de água, repetindo-se o procedimento três vezes por semana durante seis semanas, observaram um aumento na taxa de peso corporal dos peixes tratados com o tiGH de 171% em relação ao grupo controle.



**Figura 10.** À esquerda: fenótipo dos peixes dos grupos controle e experimental após seis semanas de tratamento com o GH recombinante de tilápia (tiGH) (tamanho dado em centímetros). À direita: peso corporal na 2ª, 4ª e 6ª semana do início do experimento.

**Fonte:** Acosta et al. (2007) com adaptações.

Sekine et al. (1985), ao testarem, separadamente, o rGH (parcialmente purificado) de “chum salmon” (*Oncorhynchus keta*) produzido em *E. coli* e o GH natural extraído da hipófise de salmão, obtiveram em ambos os casos um crescimento significativo de “rainbow trout” (*Salmo gairdneri*) em relação ao placebo, sendo a eficiência do rGH indistinguível da eficiência do GH natural. Ayson et al., (2000) também observaram equivalência entre o efeito do rGH de “rabbitfish” (*Siganus guttatus*) e GH natural oriundo da hipófise.

O rGH deve ser administrado em doses moderadas, visto que em alguns estudos têm sido demonstrados que em doses elevadas exibem um efeito adverso ao esperado para o crescimento em peixes. Quando o rGH é administrado via injeção, as concentrações acima de 1 µg de rGH/g de peso corporal do peixe demonstram-se demasiadas. Em experimento realizado por Tsai et al. (1995), os peixes (“striped mullets” - *Mugil cephalus*) tratados com 1 µg de rGH/g de peso corporal apresentaram crescimento inferior aos peixes tratados com 0,1 µg/g. Os mesmos autores observaram que a dosagem de 2 µg de rGH/g de peso corporal não estimulou um crescimento significativo em relação ao grupo controle. Em “rainbow trout” (*S. gairdneri*), Agellon et al. (1988) observaram que a taxa de crescimento específico do grupo tratado com alta dose (2 µg/g) de rGH foi menor do que a do grupo tratado com baixa dose (0,2

$\mu\text{g/g}$ ). Em “goldfish” (*Carassius auratus*), Promdonkoy et al. (2004) observaram que os peixes tratados com dosagem 0,1  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal cresceram levemente mais rápido, embora não estatisticamente significativo, que os tratados com 1  $\mu\text{g/g}$ .

Para o rGH administrado junto a ração, a concentração de 1% (p/p) demonstrou-se demasiada, exibindo efeito adverso. Tsai et al. (1997) observaram que “black seabream” (*Acanthopagrus schlegeli*) alimentados com ração contendo 0,5% de rGH purificado exibiram melhor desempenho no crescimento do que os peixes alimentados com ração a 1% de rGH, indicando que elevadas doses do rGH na ração causam efeito negativo sobre o crescimento.

Uma questão controversa sobre o uso de rações suplementadas com rGHs para cultivo comercial de peixes centra-se numa possível alteração da composição química e nutricional da carne desses animais. A resposta para essa questão pode ser esclarecida no trabalho de Li et al. (2003), onde foi observado que a administração do rGH de carpa (*C. carpio*) em juvenis de tilápia (*Oreochromis niloticus*) não alterou significativamente a composição química da musculatura dos animais do grupo experimental em relação ao controle. Em experimento similar, Agellon et al. (1988b), trabalhando com “rainbow trout” (*Salmo gairdneri*), também observaram a inexistência de diferenças significativas na composição química e estrutural do tecido muscular dos peixes do grupo experimental em relação ao controle.

No caso do tambaqui, muitos estudos para conhecer as possíveis alterações na composição química e nutricional dos tecidos corporais de peixes tratados com o rGH ainda devem ser realizados. No entanto, neste processo de desenvolvimento tecnológico, as pesquisas moleculares de engenharia genética e produção heteróloga do rGH de tambaqui antecedem os testes de desempenho zootécnico, momento em que as análises bioquímicas da carne deverão ser realizadas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Linhagens de hospedeiras

- *Escherichia coli* DH10B: linhagem de genótipo F-*mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *endA1* *araD139*  $\Delta$  (*ara, leu*)7697 *galU* *galK*  $\lambda$ -*rpsL* *nupG* /pMON14272 / pMON7124. Essas células são adequadas para clonagem de DNA, construção de bancos de genes e bibliotecas de cDNAs. Foi utilizada nos procedimentos de manipulação de DNA.

- *Pichia pastoris* GS115: linhagem de genótipo *his4* e fenótipo Mut<sup>+</sup>. Possui mutação no gene *his4* codificante para a enzima histidinol desidrogenase, o que implica incapacidade de sintetizar o aminoácido histidina (His<sup>-</sup>), não crescendo em meio auxotrófico para este aminoácido. Os transformantes são selecionados por sua habilidade de crescer em meio deficiente de histidina (Invitrogen, 2010). Essa linhagem foi utilizada para expressão do tGH pela transformação com vetor carregando a marca de seleção auxotrófica HIS4 e o gene *tgh*.

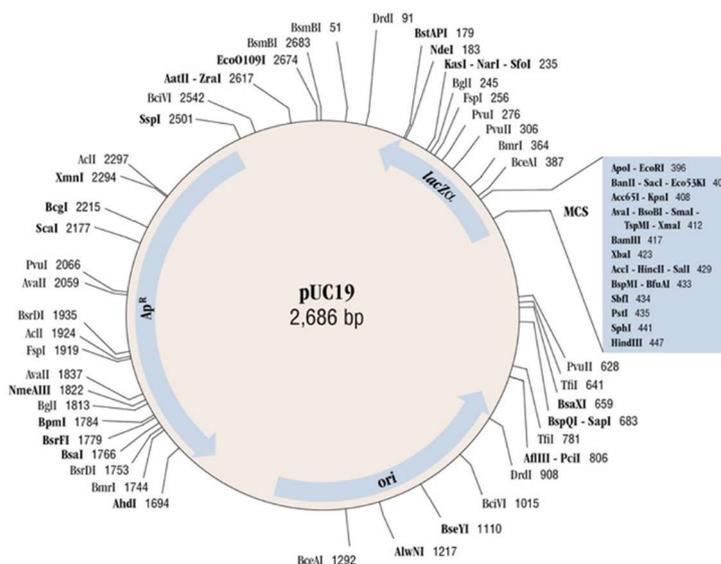
Essas células compõem o acervo de células hospedeiras do Laboratório de Tecnologias do DNA Recombinante da UFAM.

### 4.2 Meios de cultivos

Apêndice.

### 4.3 Vetores utilizados

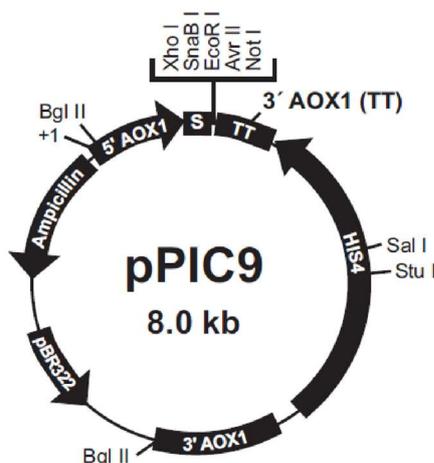
- pUC19 (*New England BioLabs*): é um vetor de clonagem comumente usado em *E. coli*. Possui tamanho molecular de 2686 pb e capacidade de gerar um alto número de cópias plasmidiais durante a clonagem molecular. No múltiplo sítio de clonagem (MCS), este vetor carrega sítios de reconhecimento específicos para 13 endonucleases de restrição. As regiões *ori* (origem de replicação em procarioto), *Ap<sup>R</sup>* (gene codificador da enzima beta-lactamase para seleção dominante dos transformantes – resistência a ampicilina) e *lacZ $\alpha$*  (fragmento derivado do gene *lacZ* do operon *Lac* de *E. coli*) são mostradas no mapa abaixo (figura 11).



**Figura 11.** Mapa circular do vetor de clonagem pUC19 e suas principais regiões.

**Fonte:** *New England BioLabs*.

- pPIC9 (Invitrogen): é apropriado para expressão e secreção de proteínas heterólogas em *P. pastoris* e apresenta as seguintes características: a) tamanho de 8023 pb; b) presença do promotor AOX1 do gene codificador da enzima álcool oxidase I, fortemente induzível por metanol; c) sequência codificadora do peptídeo sinal de secreção fator- $\alpha$  de *S. cerevisiae* (S); d) região de múltiplos sítios de clonagem com sítios de reconhecimento por endonucleases de clivagem *stick end* (extremidade colante) e *blunt end* (extremidade cega); e) terminador de transcrição próprio (TT); f) origem de replicação funcional em *E. coli* (derivada do vetor pBR322); g) sítios para integração no genoma de *P. pastoris* nas regiões HIS4 ou AOX1; h) marca de seleção auxotrófica HIS4; e, i) gene de resistência à ampicilina (Invitrogen, 2010), conforme ilustrado na figura 12 abaixo.



**Figura 12.** Mapa circular do vetor de expressão e secreção pPIC9 e suas principais regiões.

**Fonte:** *Invitrogen* (2010).

#### 4.4 Síntese química da região estrutural do gene do hormônio de crescimento de tabaqui (*tgh*)

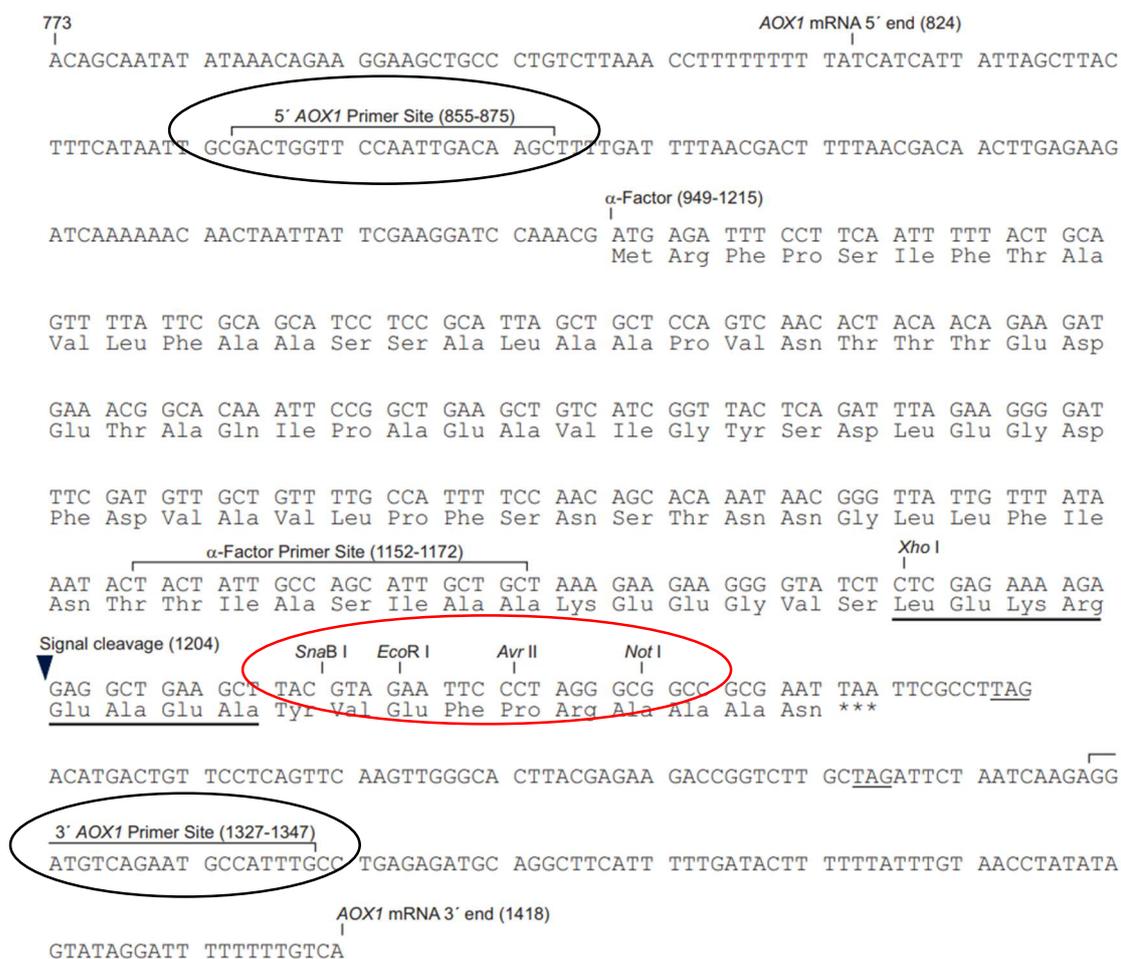
A sequência nucleotídica da região estrutural do cDNA do tGH foi obtida a partir de uma biblioteca de cDNA da hipófise e parte do cérebro de tabaqui previamente construída em trabalho realizado por Sousa (2009). Essa sequência foi otimizada para expressão em *P. pastoris* levando em consideração os códons preferenciais dessa levedura e o equilíbrio proporcional entre o conteúdo de bases nitrogenadas citosina (C) com guanina (G) e adenina (A) com timina (T). A sequência foi flanqueada em 5' e 3' com sítios de restrição para reconhecimento específico das endonucleases *EcoRI* e *NotI*, respectivamente, para a sua subclonagem no vetor pPIC9. Na extremidade 3', anterior ao *stop* códon, foi inserida uma sequência codificadora para cauda de seis resíduos de histidina (*His<sup>6</sup>-tag*) para confirmação da proteína recombinante por meio de ensaios imunológicos. Essa construção gênica foi quimicamente sintetizada pela empresa *Genone* e o gene sintético *tgh* foi clonado no vetor pUC19 (ver figura 10) pela mesma empresa. Esse vetor carregando a região estrutural do GH de tabaqui passou a ser denominado pUC-tGH.

Durante a otimização da sequência da região estrutural do GH de tabaqui para expressão em *P. pastoris* foram utilizadas as ferramentas de bioinformática *Oligocalc*, *molecular toolkit*, *NEBcutter V2.0*, *ClustalW2* e *Blast* disponíveis na *internet*. A determinação das propriedades teóricas como a massa molecular, sítios de glicosilação, ponto isoelétrico (pI) e meia-vida da proteína recombinante predita foi realizada com o auxílio das ferramentas de bioinformática *ExPASy*, *ProtParam*, *NetNGlyc 1.0 Server* e *NetOGlyc 3.1 Server*.

#### 4.5 Construção do plasmídeo recombinante pPIC-tGH

Para construção do vetor de expressão e secreção do tGH em *P. pastoris*, a região estrutural do GH de tabaqui foi primeiramente liberada do vetor de clonagem pUC-tGH por digestão dupla com as endonucleases *EcoRI* e *NotI* nas seguintes condições: tampão de *EcoRI* 1X, BSA 100 µg/mL, 5 U de cada endonuclease, 3 µL de DNA (~600 ng) em volume final de 10 µL. O sistema de reação foi mantido em repouso a 37 °C por 3 h. A visualização dos produtos da digestão se deu por eletroforese em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/mL e visualizado sob luz ultravioleta (UV).

Em seguida, o fragmento correspondente a região estrutural do tGH foi purificado do gel de agarose com o *kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) e ligado ao múltiplo sítio de clonagem do vetor pPIC9, previamente purificado e linearizado com as endonucleases *EcoRI* e *NotI* nas mesmas condições reacionais acima. A reação de ligação se deu por ação da enzima T4-DNA ligase (*New England BioLabs*) conforme as condições recomendadas pelo fabricante e o sistema incubado por 16 horas a 16 °C respeitando as proporções de 3-5 moléculas de inserto para 1 molécula de vetor. O plasmídeo recombinante resultante da ligação do vetor pPIC9 com o fragmento sintético *tgh* foi denominado pPIC-tGH, sendo constituído por 8609 pb. Esse plasmídeo foi utilizado para transformar células de *E. coli* DH10B eletrocompetentes. A figura 13 mostra o múltiplo sítio de clonagem do vetor pPIC9 e as suas sequências adjacentes.



**Figura 13.** Múltiplo sítio de clonagem do vetor pPIC9 e as regiões adjacentes. No círculo vermelho observam-se sítios *EcoRI* e *NotI* que foram usados para subclonagem direcional do inserto *tgh* ao vetor pPIC9. Nos círculos pretos evidenciam-se os sítios de anelamento dos iniciadores usados na PCR de colônia. O códon de iniciação da tradução (ATG) a partir do fator  $\alpha$  do peptídeo sinal e a sequência de clivagem proteolítica do peptídeo sinal após o endereçamento da proteína também estão mostrados.

**Fonte:** Invitrogen (2010) com adaptações.

#### 4.6 Transformação de *Escherichia coli* DH10B com o plasmídeo recombinante pPIC-tGH

Células de *E. coli* DH10 foram cultivadas e tornadas eletrocompetentes após sucessivas lavagens com glicerol 10 %. Para isso, uma única colônia da bactéria foi inoculada em 20 mL de meio LB e incubada em agitador de bancada a 37 °C por uma noite (*overnight*). Um mililitro dessa cultura foi inoculado em 300 mL de meio LB sem antibióticos. O inóculo foi mantido sob agitação até a cultura atingir densidade óptica em 600 nm (D.O.<sub>600</sub>) igual a 0,5. Após isso, o frasco contendo a cultura foi colocado em banho de gelo por 1 hora e então a cultura resfriada foi dividida em tubos, cada um com 50 mL de capacidade e centrifugados a 3500 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado imediatamente e as células ressuspensas gentilmente usando 10 mL de glicerol 10 % estéril e gelado. Em seguida foi realizada uma nova centrifugação a 3500 g por 8 minutos, seguida de descarte do sobrenadante e ressuspensão de cada *pellet* novamente em 10 mL de glicerol 10 % gelado e estéril. Essas lavagens foram repetidas por mais quatro vezes com subsequente centrifugação das células. O *pellet* foi ressuspenso em 15 mL de glicerol 10 % gelado e estéril, centrifugado, recuperado e em seguida ressuspensionado em 1 mL de glicerol 10 % gelado e estéril. As células eletrocompetentes foram aliqüotadas em volume de 80 µL e imediatamente estocadas em freezer na temperatura de -80 °C.

O vetor recombinante pPIC-tGH foi propagado por clonagem molecular em células de *E. coli* DH10B eletrocompetentes conservadas a -80 °C. A transformação genética foi realizada por eletroporação em pulso elétrico de 1900 volts em aparelho eletroporador (Modelo Eletroporator 2510 Eppendorf, cubeta com passagem de 1,0 mm e capacidade de 80 µL de células competentes) que garantiu a inserção do plasmídeo na célula hospedeira. Imediatamente após o pulso elétrico, as células eletroporadas foram ressuspensas em 1 mL de meio LB e o conteúdo transferido para um microtubo de 1,5 mL, o qual foi incubado a 37 °C por 1 hora sem agitação, tempo necessário para iniciar a expressão do gene de resistência a ampicilina na hospedeira. Logo após realizou-se a semeadura (com volumes de células entre 25 a 300 µL) em placas de *Petri* contendo aproximadamente 25 mL de meio LB ágar 1,5-2 % e o agente seletivo ampicilina na concentração de 200 µg/mL. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 16 horas para crescimento das colônias transformantes *E. coli* DH10B/pPIC-tGH, as quais foram analisadas por PCR de colônia para confirmação da presença da região estrutural do tGH.

#### 4.7 PCR de colônia para seleção dos transformantes de *Escherichia coli* DH10B carregando plasmídeo recombinante pPIC-tGH

Foi realizada PCR de colônia em 10 clones transformantes de *E. coli* DH10B selecionados aleatoriamente para confirmação da presença da região estrutural do tGH. Os iniciadores utilizados foram: **5'AOX1-forward (senso)** 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3' e **3'AOX1-reverse (anti-senso)** 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3' (Invitrogen, 2010). Esses iniciadores são complementares às regiões de início e término do promotor AOX1 no vetor pPIC9, respectivamente. Essas regiões flanqueiam o inserto sub-clonado no plasmídeo pPIC-tGH.

Os 10 clones transformantes foram retirados do meio de crescimento e transferidos para microtubos contendo 5  $\mu$ L de água MilliQ estéril. Para reação de PCR, foi utilizado 1  $\mu$ L dessa suspensão e adicionado ao sistema de reação previamente ajustado com tampão da enzima *Taq* DNA polimerase 1X, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,3 mM de dNTPs, 5 pmol de cada iniciador e 1,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase do *kit* comercial da empresa Biotech AMAZÔNIA. As condições da reação foram as seguintes: 2 minutos a 95 °C, seguido de 25 ciclos de 94 °C por 40 segundos, 62 °C por 40 segundos, 72 °C por 1 minuto e uma extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os produtos resultantes da PCR de colônia foram analisados em gel de agarose 0,8 %.

#### 4.8 Extração de DNA plasmidial

Clones que confirmaram a presença do inserto *tgh* na PCR de colônia foram cultivados a 37 °C por 16 horas em 20 mL de meio LB líquido com o agente seletivo ampicilina na concentração 100  $\mu$ g/mL. Para a extração do DNA plasmidial dos clones foi utilizado o *kit Illustra PlasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare), o qual possui soluções atuantes nas fases de lise celular, desproteinização, lavagem e eluição do DNA plasmidial. Os procedimentos foram realizados segundo as especificações do fabricante. O perfil eletroforético dos produtos de extração plasmidial se deu em gel de agarose 0,8 %.

#### 4.9 Análise de restrição do plasmídeo recombinante pPIC-tGH

O DNA plasmidial extraído da hospedeira *E. coli* DH10B/pPIC-tGH foi submetido à análise de restrição por endonucleases para confirmação da correta construção do plasmídeo engenheirado pPIC-tGH. Na análise de restrição, o DNA plasmidial sofreu dupla digestão com as endonucleases *EcoRI* e *NotI* (*New England Biolabs*). As condições da reação de digestão foram as seguintes: tampão NEB 3 1X, BSA 100 µg/mL, 5 U de cada endonuclease, 2 µL de DNA em volume final de 10 µL. A reação foi incubada a 37 °C por 2,5 horas. O perfil eletroforético dos produtos da digestão enzimática se deu em gel de agarose 0,8 %.

#### 4.10 Transformação de *Pichia pastoris* GS115 com o plasmídeo pPIC-tGH

Inicialmente foi necessário proceder com a preparação de células eletrocompetentes de *P. pastoris* GS115 para que, após impulso elétrico, pudessem receber em seu genoma o cassete de expressão contendo o gene codificador do tGH. Essas células foram preparadas de acordo com o protocolo descrito no manual de expressão gênica em *P. pastoris* (Invitrogen, 2010). Para tal, uma colônia de células de *P. pastoris* foi inoculada em *Erlenmeyer* de 125 mL contendo 5 mL de meio YPD e cultivada por 24 horas a 30 °C. Aproximadamente 0,5 mL desse pré-inóculo foi adicionado em 500 mL de meio YPD (em *Erlenmeyer* de 2 L) e incubados a 30 °C sob agitação de 200 rpm até a cultura atingir D.O.<sub>600</sub> de 1,3 a 1,5, que corresponde à fase de crescimento exponencial com presença de células viáveis. Atingindo esta fase crescimento, as células foram centrifugadas a 1500 g por 5 minutos a 4 °C e ressuspensas em 500 mL de água gelada estéril. Esse passo foi repetido por mais duas vezes utilizando em cada repetição 250 mL de água gelada estéril. Em seguida, as células foram ressuspensas em 20 mL de sorbitol 1 M gelado estéril, novamente centrifugadas a 1500 g por 5 minutos a 4 °C e ressuspensas em 0,5 mL de sorbitol 1 M gelado estéril, completando para um volume final de 1,5 mL após delicada homogeneização. Ao final deste passo as células foram consideradas eletrocompetentes e estocadas em alíquotas de 80 µL em temperatura de -80 °C.

Para transformação das células eletrocompetentes de *P. pastoris* GS115, o vetor pPIC-tGH foi digerido com a endonuclease *BglIII* para liberação do cassete de expressão contendo o cDNA do tGH. As condições da reação de digestão foram as seguintes: tampão NEB 3 1X, BSA 100 µg/mL, 5 U de *BglIII*, 1,5 µL de DNA em volume final de 20 µL. A reação foi incubada a 37 °C por 3 horas

Para a eletroporação, foram utilizados 80 µL de células eletrocompetentes misturadas

com 10 µg do DNA linearizado em volume de 10 µL em água MilliQ autoclavada. O sistema de transformação foi transferido para uma cubeta de eletroporação de 2 mm previamente resfriada e incubado em gelo por 5 minutos. Em seguida, as células foram submetidas à eletroporação de 1500 volts em eletroporador (Electroporator 2510 – Eppendorf). Imediatamente após a eletroporação, as células foram ressuspensas em 1 mL de sorbitol 1 M gelado para auxiliar na recuperação da parede celular. O conteúdo foi transferido para um microtubo estéril de 1,5 mL e semeados volumes de 100, 200 e 300 µL em placas de *petri* contendo meio MD sem o aminoácido histidina para seleção auxotrófica das células transformantes. As placas foram incubadas a 30 °C até o surgimento de clones recombinantes His<sup>+</sup>, em geral em torno de 24 a 36 horas.

Como o vetor foi linearizado no sítio de *Bgl*III, a transformação da hospedeira pode ocorrer tanto por eventos de substituição gênica entre o *locus* do gene *aox1* e cassete de expressão carregando o gene heterólogo *tgh*, quanto por eventos de simples recombinação homóloga entre as regiões HIS4 ou AOX1 do cassete de expressão com as respectivas regiões homólogas no genoma da levedura. No caso da substituição gênica, implica na geração de transformantes tanto com fenótipo His<sup>+</sup>Mut<sup>+</sup> quanto His<sup>+</sup>Mut<sup>s</sup>. Na simples recombinação, implica na geração de transformantes com fenótipo His<sup>+</sup>Mut<sup>+</sup> somente (Cregg et al., 1993, 2000; Invitrogen, 2010).

#### **4.11 Seleção dos fenótipos Mut<sup>+</sup> e Mut<sup>s</sup> de *Pichia pastoris* GS115/pPIC-tGH**

O experimento para determinação dos fenótipos Mut<sup>+</sup> e Mut<sup>s</sup> foi realizado segundo as recomendações do manual de expressão em *P. pastoris* (Invitrogen, 2010). Para tal, foram aleatoriamente selecionados 34 clones recombinantes de *P. pastoris* (GS115/pPIC-tGH) e dois controles positivos de fenótipos conhecidos Mut<sup>+</sup> e Mut<sup>s</sup> preservados no Laboratório de Tecnologia do DNA da UFAM. Esses foram 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 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<sup>+</sup> e as que cresceram mais lentamente, como Mut<sup>s</sup>.

#### 4.12 Indução da expressão heteróloga em frascos agitados com *Pichia pastoris* GS115/pPIC-tGH/Mut<sup>+</sup> e Mut<sup>s</sup>

Para a realização do experimento de indução da expressão heteróloga em frascos agitados, foram selecionadas cinco colônias de *P. pastoris* transformantes: quatro clones GS115/pPIC-tGH, dois com fenótipo Mut<sup>+</sup> e dois com fenótipo Mut<sup>s</sup>, e um clone GS115/pPIC9 com fenótipo Mut<sup>+</sup> (controle negativo). Para aumento de massa celular, os clones selecionados foram inoculados em 25 mL de meio de cultura BMGY-U em *Erlenmeyer* de 250 mL e incubados a 30 °C sob agitação de 250 rpm até que a cultura atingisse D.O.<sub>600</sub> entre 2-6, em tempo aproximado de 18 a 24 horas. Ao atingir a D.O.<sub>600</sub> necessária, as culturas foram centrifugadas a 3000 g por 5 minutos a 4 °C e ressuspensas em 50 mL de meio BMMY-U em frascos *Erlenmeyer* de 500 mL de modo que a D.O.<sub>600</sub> inicial da cultura ficasse próximo a 1,0. A indução do promotor AOX1, o qual sinaliza a transcrição do gene *tgh* integrado ao genoma da hospedeira, foi realizada por adição 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 durante 120 horas a 30 °C sob agitação constante de 250 rpm.

Para posterior análise da expressão da proteína heteróloga por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE), foram realizadas coletas das culturas nos intervalos de 0 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h de indução. As alíquotas das culturas foram centrifugadas a 12000 g por 3 minutos a 4 °C e os sobrenadantes imediatamente conservados a -80 °C para posterior análise.

#### 4.13 Cinética de crescimento em metanol de *Pichia pastoris* GS115/pPIC-tGH

Para a determinação da cinética de crescimento de *P. pastoris* produtora de tGH, foram realizadas coletas das culturas nos intervalos de 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h de indução com metanol. Os clones selecionados para a cinética de crescimento foram os mesmos do experimento de indução do item 4.12. A curva de crescimento da levedura foi determinada medindo-se a D.O.<sub>600</sub> em cada tempo. A D.O.<sub>600</sub> obtida foi convertida para massa celular (g/L) utilizando-se a fórmula  $(g/L) = 0,22 \times D.O._{600}$ .

#### 4.14 Análise da proteína recombinante em gel SDS-PAGE

Os sobrenadantes das culturas foram analisados em gel SDS-PAGE, conforme modificações da metodologia descrita por Sambrook et al. (1989). Alíquotas de aproximadamente 4 mL dos sobrenadantes das culturas nos tempos de 0 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h de indução foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) à concentração final de 10 %. Após a centrifugação de 12000 g a 4 °C, os *pellets* das proteínas precipitadas foram lavados com acetona 100 % gelada e em seguida ressuspensos em 100 µL de tampão de amostra 1X para 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)). Em seguida, as amostras foram fervidas a 100 °C em banho-maria por 5 minutos e prontamente incubadas em gelo até a aplicação no gel SDS-PAGE. As amostras foram aplicadas em um sistema de minigel com gradientes de poliácridamida de 5 % concentrador e 15 % separador. A eletroforese foi realizada em tempo aproximado de 2 horas nas seguintes condições: tensão 200 volts, corrente 50 mA e potência 30W. O marcador molecular utilizado foi o GH de humano isoforma de 20 kDa, gentilmente cedido pela empresa Cristália-Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA. Após a corrida eletroforética, o gel com as proteínas separadas foi submerso por 30 minutos em solução fixadora (ácido acético 10 %, metanol 40 %) 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)) por incubação *overnight*. Após esse procedimento, o gel foi submerso em água destilada para perder o excesso de corante para que sua imagem fosse então documentada por digitalização em *scanner* (LabScan 5.0, GE Healthcare).

#### 4.15 Análise *Western blotting* para confirmação da proteína recombinante

Para confirmação do rtGH nos sobrenadantes das culturas de *P. pastoris* GS115/pPIC-tGH induzidas por metanol foi realizada análise *Western blotting* usando anticorpo primário que reage especificamente com a cauda de histidina fusionada em C-terminal da proteína recombinante. Após a corrida eletroforética em gel SDS-PAGE (conforme descrito no item 4.14), as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema de transferência semi-seco (Trans-Blot®SD, Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad) durante 1 h nas seguintes condições: 10 volts, 0,13 A, 1 W. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose com as proteínas imobilizadas foi tratada com os anticorpos fabricados pela Invitrogen

(catálogo número 46-0693) e reagentes do *kit WesternBreeze® Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit* (Invitrogen), cujos procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante. Após a revelação das amostras na membrana, a imagem foi documentada por digitalização em *scanner*.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Síntese química da região estrutural do gene *tgh* para expressão em *Pichia pastoris* GS115

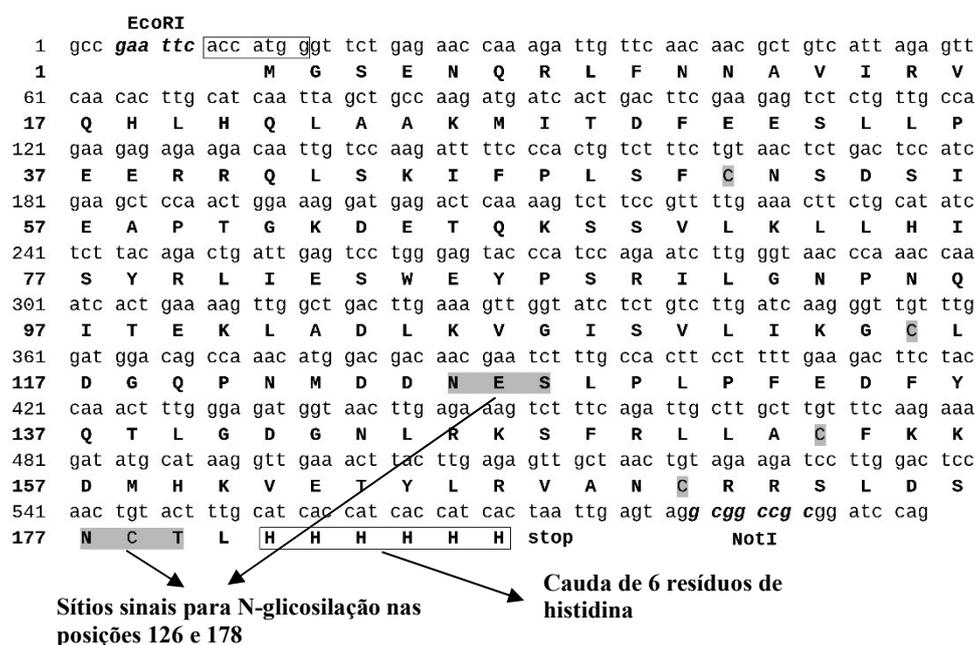
As tentativas preliminares de expressão do cDNA do GH de tabaqui em *P. pastoris*, clonado no vetor pPIC9 (construção de Sousa, 2009), foram malogradas. A análise literária revelou que as sequências de DNA com elevado conteúdo de AT ( $\geq 60\%$ ) estão associadas à expressão em baixos níveis ou a não expressão de proteínas no sistema *P. pastoris*. O gene do fragmento C da toxina do tétano de *Clostridium tetani* somente foi expresso em *P. pastoris* após a diminuição das regiões ricas em AT e aumento do conteúdo de GC (Romanos et al., 1991). Isso ocorre devido à terminação transcricional prematura do RNA (Romanos et al., 1992; Boettner et al., 2007; Invitrogen, 2010).

Em *S. cerevisiae*, as sequências TAG...TA(T)GT...TTT e TTTTATA são descritas como responsáveis pelo término prematuro de transcritos (Zaret & Sherman, 1982; Henikoff & Cohen, 1984). Embora não amplamente reconhecida, a presença dessas sequências pode ser a razão comum para baixos rendimentos ou insucesso na expressão de alguns genes heterólogos em leveduras (Romanos et al., 1992). O gene *gp120* codificador da glicoproteína integrante do envelope do vírus HIV-1 somente foi expresso em *P. pastoris* após mudança na sequência ATTATTTTATAAAA, responsável pelo término prematuro dos transcritos (Scorer et al., 1993, Invitrogen, 2010).

Em análise da sequência do cDNA do GH de tabaqui isolado por Sousa (2009), foi verificado que a mesma possuía 537 pb e o conteúdo de AT correspondia a 65 % das bases nitrogenadas. Neste trabalho, essa sequência foi modificada com base nos códons preferenciais de *P. pastoris* sem alterar seu conteúdo de aminoácidos preditos na tradução. E o conteúdo de AT foi reduzido para 58 % para evitar a terminação transcricional prematura do RNA (Romanos et al., 1992; Boettner et al., 2007; Invitrogen, 2010). A sequência gênica engenheirada do GH de tabaqui possui 586 pb.

Em análise *Blast* de comparação da sequência de aminoácidos do GH de tabaqui com as sequências de GHs de outros vertebrados depositadas no banco de dados do NCBI, foi possível observar maior similaridade entre os GHs do tabaqui e do *Piaractus mesopotamicus* (99 % identidade), seguida dos GHs dos Cypriniformes *Ictiobus bubalus* e *Myxocyprinus asiaticus*, com 88,8 % identidade.

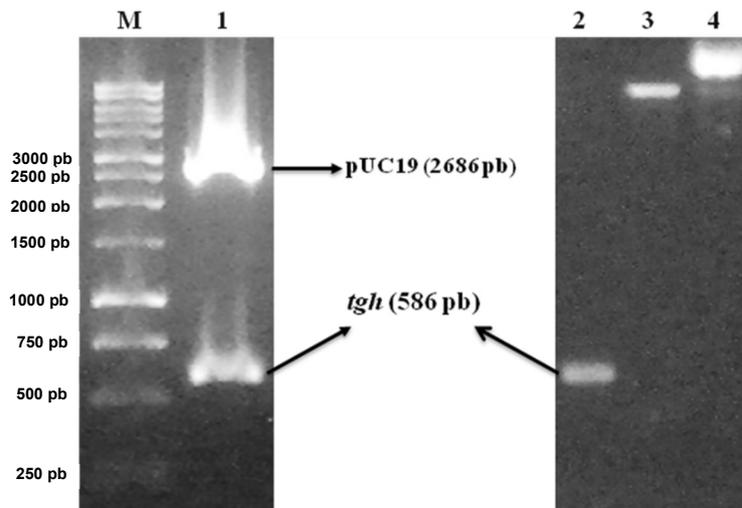
Em análise de alinhamento traducional entre a sequência otimizada do cDNA do GH de tabaqui e a sequência predita de aminoácidos, foi possível observar que a tradução está em fase, gerando um polipeptídeo (rtGH) de 186 resíduos de aminoácidos, incluindo os seis resíduos de histidina na região C-terminal, conforme mostrado na figura 14. Outras análises com as ferramentas de bioinformática *NetNGlyc 1.0 Server* e *NetOGlyc 3.1 Server* revelaram a existência de dois sítios sinais de N-glicosilação nas posições 125 e 177 e a ausência de sítios sinais para O-glicosilação na sequência de aminoácidos do rtGH.



**Figura 14.** Sequência de aminoácidos predita para o GH recombinante de tabaqui. Alinhamento traducional do cDNA otimizado para expressão em *Pichia pastoris*. Os destaques cinzas indicam a existência de dois sítios sinais para N-glicosilação e quatro resíduos de cisteína. Em negrito estão os sítios 5'-EcoRI e 3'-NotI. Também estão destacadas as sequências 5'-Kozak e a cauda de histidina na região C-terminal.

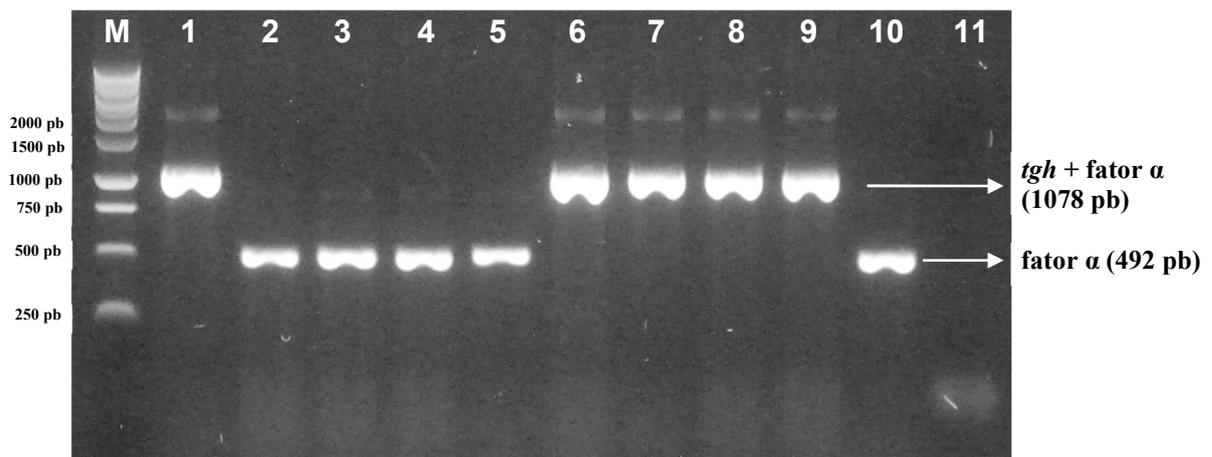
## 5.2 Construção do plasmídeo recombinante pPIC-tGH

A liberação do fragmento da região estrutural do gene do tGH de 586 pb do vetor pUC-tGH foi realizada por meio de digestão dupla desse vetor com as endonucleases *EcoRI* e *NotI*. Este fragmento gênico foi purificado e ligado ao múltiplo sítio de clonagem do vetor pPIC9, previamente linearizado com as mesmas endonucleases. Na figura 15 são mostrados os perfis eletroforéticos resultantes da digestão do vetor pUC-tGH, da purificação do inserto gênico e da linearização do vetor pPIC9. O produto da ligação entre o inserto gênico (*tgh*) e o vetor pPIC9 foi usado para transformar *E. coli* DH10B.



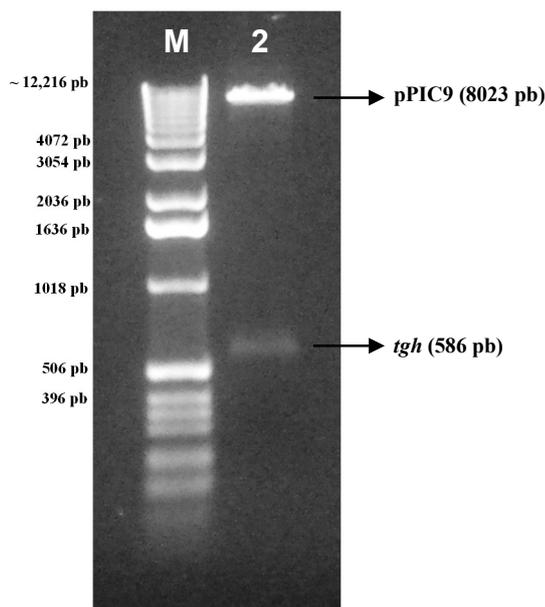
**Figura 15.** Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8 % da dupla digestão do vetor pUC-tGH com as endonucleases *EcoRI* e *NotI*. M: marcador de massa molecular de 1Kb (Promega). Poço 1: plasmídeo pUC-tGH após digestão endonucleásica; 2: inserto gênico *tgh* purificado; 3: vetor pPIC9 purificado e linearizado com *EcoRI* e *NotI*; 4: vetor pPIC9 não-linearizado.

Cerca de 30 clones foram obtidos por transformação de *E. coli* DH10B com o produto da ligação do inserto *tgh* ao vetor pPIC9. Na figura 16, são mostrados os resultados da PCR de colônia para identificação dos transformantes de *E. coli* DH10B portadores do plasmídeo recombinante pPIC-tGH. Entre as dez colônias analisadas, cinco apresentaram o perfil esperado, amplificando um fragmento de 1078 pb ao inserto gênico do GH de tabaqui (586 pb) e a sequência do peptídeo sinal do fator  $\alpha$  de *S. cerevisiae* (492 pb) do vetor pPIC9.



**Figura 16.** Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8 % mostrando os resultados da PCR de 10 clones de *E. coli* DH10B transformados com o produto da ligação entre o vetor pPIC9 e o inserto *tgh*. M: marcador de massa molecular de 1kb (Promega). Poços 1 e 6-9: *E. coli* DH10B/pPIC-tGH; 2-5 e 10: *E. coli* DH10B/pPIC9; 11: controle negativo da reação. As bandas positivas quanto a presença do fragmento gênico *tgh* correspondem ao somatório entre o tamanho deste fragmento (586 pb) e a região codificadora para o peptídeo sinal (492 pb) do vetor pPIC9.

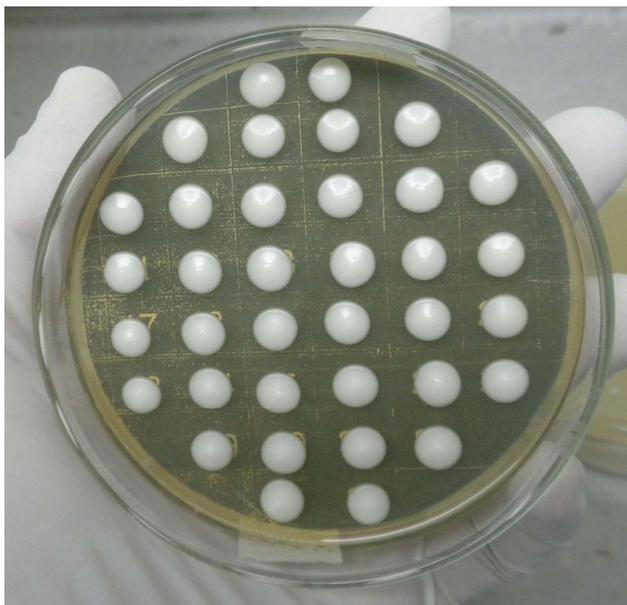
Dentre os clones transformantes que confirmaram a presença do inserto *tgh* na PCR de colônia, um foi selecionado para a extração do DNA plasmidial e análise de restrição enzimática para confirmação do plasmídeo recombinante pPIC-tGH. Na figura 17, é apresentado o perfil eletroforético dessa análise, confirmando a correta construção do plasmídeo recombinante pPIC-tGH: os fragmentos liberados correspondem ao tamanho do vetor pPIC9 (8023 pb) e do gene *tgh* (586 pb).



**Figura 17.** Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8 % mostrando a digestão dupla do plasmídeo recombinante pPIC-tGH com as endonucleases *EcoRI* e *NotI*. M: marcador de massa molecular de 1kb (Invitrogen); Poço 1: pPIC-tGH após a digestão endonucleásica. As setas indicam as bandas correspondentes ao vetor pPIC9 e ao inserto *tgh*.

### 5.3 Transformação de *Pichia pastoris* GS115 com o plasmídeo recombinante pPIC-tGH

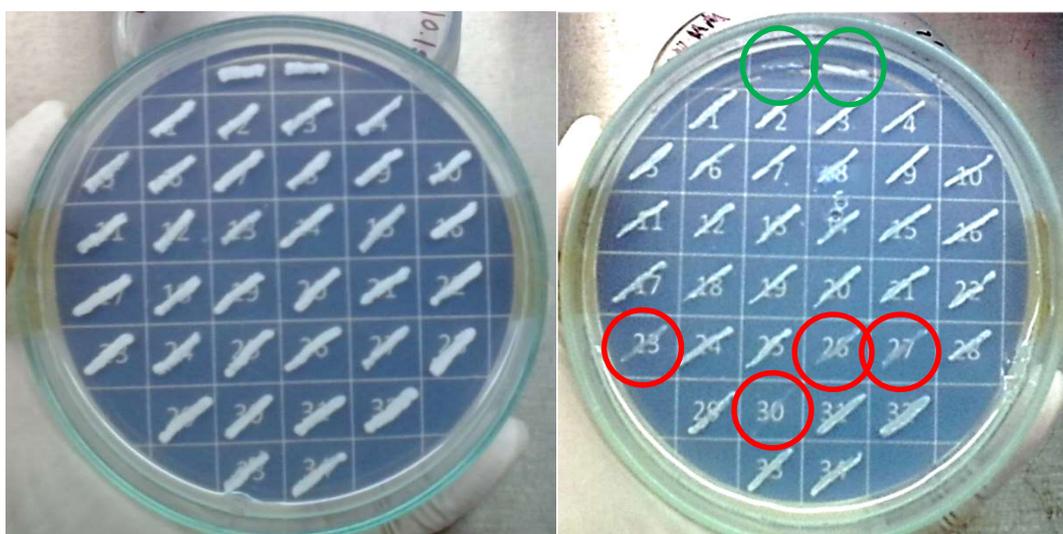
O cassete de expressão do plasmídeo recombinante pPIC-tGH obtido após a digestão com a endonuclease *BglII* foi utilizado para transformar células eletrocompetentes de *P. pastoris* GS115. A seleção auxotrófica revelou a presença de 95 colônias transformantes. A técnica de *replica plating* foi adotada para testar a estabilidade genética dos transformantes isolados em meio auxotrófico, conforme ilustrado na figura 18.



**Figura 18.** Colônias de *Pichia pastoris* GS115 transformadas His<sup>+</sup> com o cassete de expressão do plasmídeo recombinante pPIC-tGH após digestão com a endonuclease BglIII.

#### 5.4 Determinação dos fenótipos Mut<sup>+</sup> e Mut<sup>s</sup> de *Pichia pastoris* GS115/pPIC-tGH

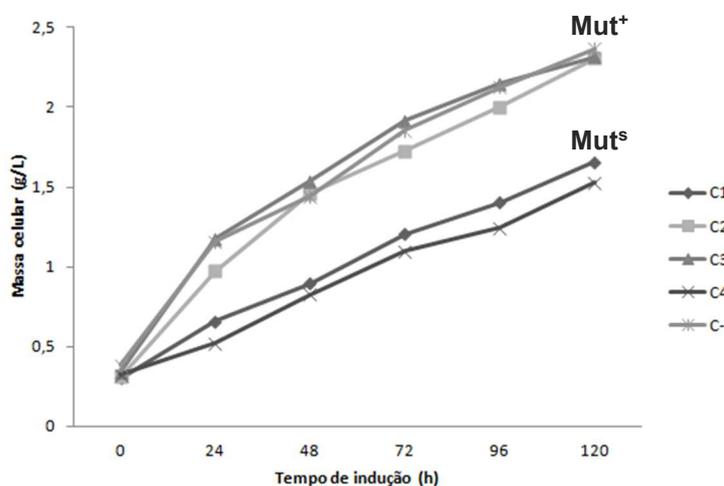
Dentre os transformantes selecionados para a determinação fenotípica, 30 demonstraram ser do fenótipo Mut<sup>+</sup>, incluindo o clone de controle negativo (*P. pastoris* GS115 transformada com o vetor pPIC9 sem o inserto *tgh*), e 4 demonstram ser do fenótipo Mut<sup>s</sup>. Essa proporção de fenótipo Mut<sup>s</sup> encontra-se de acordo com a frequência esperada de 5 a 35 % dos transformantes de *P. pastoris* GS115 His<sup>+</sup> (Romanos, 1995; Invitrogen, 2010).



**Figura 19.** Fenótipos Mut<sup>+</sup> e Mut<sup>s</sup> de *Pichia pastoris* GS115/pPIC-tGH em meios MD (à esquerda) e MM (à direita). Dentro dos círculos vermelhos estão os fenótipos Mut<sup>s</sup>, os demais são Mut<sup>+</sup>. Nos círculos verdes na parte superior estão os controles positivos de fenótipo conhecido: *P. pastoris* Mut<sup>s</sup> (esquerda) e Mut<sup>+</sup> (direita).

### 5.5 Cinética de crescimento em metanol de *Pichia pastoris* produtora de rGH de tambaqui

Na cinética de crescimento celular, durante a indução por metanol, foi possível discriminar a habilidade de metabolizar o metanol como única fonte de carbono dos fenótipos Mut<sup>+</sup> e Mut<sup>s</sup>. As linhagens de *P. pastoris* produtoras de rtGH cresceram continuamente durante todo o período de indução, indicando a capacidade dessas células de metabolizar o metanol para geração de energia e constituintes celulares. Na figura 19, é apresentado o gráfico da massa celular obtida ao longo de 120 h de indução por metanol. Pode-se observar que o aumento da massa celular seguiu um padrão linear de crescimento durante este período, respeitando a taxa de crescimento esperada para cada fenótipo: os clones Mut<sup>+</sup> (C2, C3 e C-) cresceram mais rapidamente do que os clones Mut<sup>s</sup> (C1 e C4). Esse resultado está de acordo com as descrições encontradas na literatura (Li et al., 2007; Pla et al., 2006). Ademais, Cregg e colaboradores, em 1989, já haviam demonstrado que a linhagem selvagem de *P. pastoris*, com fenótipo Mut<sup>+</sup>, quando cultivada em metanol demanda um tempo de geração de 4,8 h, enquanto que as linhagens geneticamente modificadas, de fenótipo Mut<sup>s</sup>, demandam um tempo de aproximadamente 30 h.



**Figura 20.** Gráfico da cinética do crescimento de clones de *Pichia pastoris* GS115 produtora de GH recombinante de tambaqui (rtGH) durante a indução com metanol. C1 e C4: clones GS115/pPIC-tGH/Mut<sup>s</sup>; C2 e C3: clones GS115/pPIC-tGH/Mut<sup>+</sup>; C-: clone GS115/pPIC9/Mut<sup>+</sup> (controle negativo).

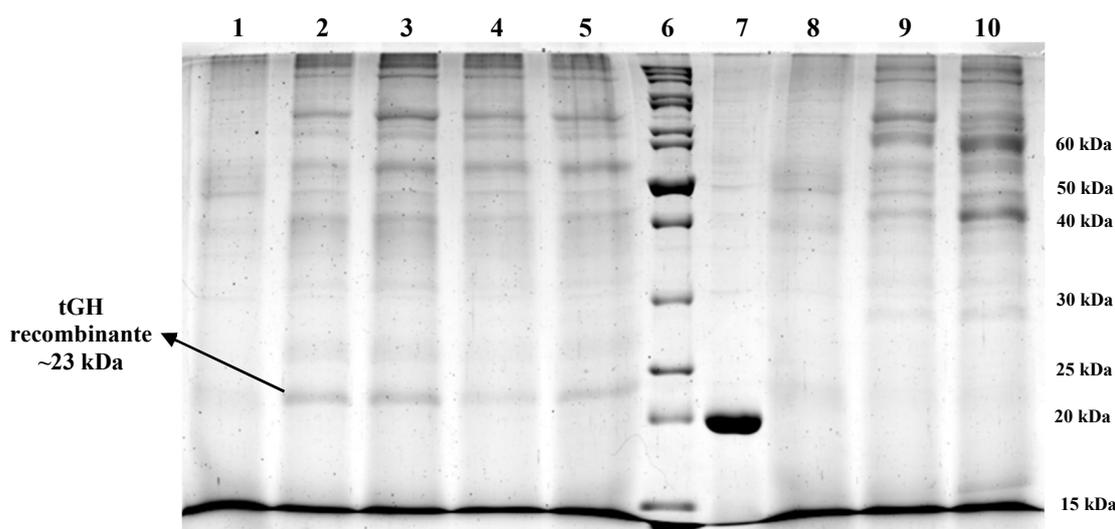
O aumento contínuo da massa celular durante todo o período de indução por metanol significa que a cultura não alcançou a fase estacionária nesse período. Semelhantemente, na expressão da enzima galactose oxidase, a massa celular manteve-se na fase ascendente durante todo o período de 216 h de indução (Spadiut et al., 2010). Esse padrão de crescimento em

metanol é bem reportado na literatura de expressão heteróloga de *P. pastoris* (Damasceno et al., 2004; Fonseca, 2006; Souza, 2007; Selamoğlu, 2009).

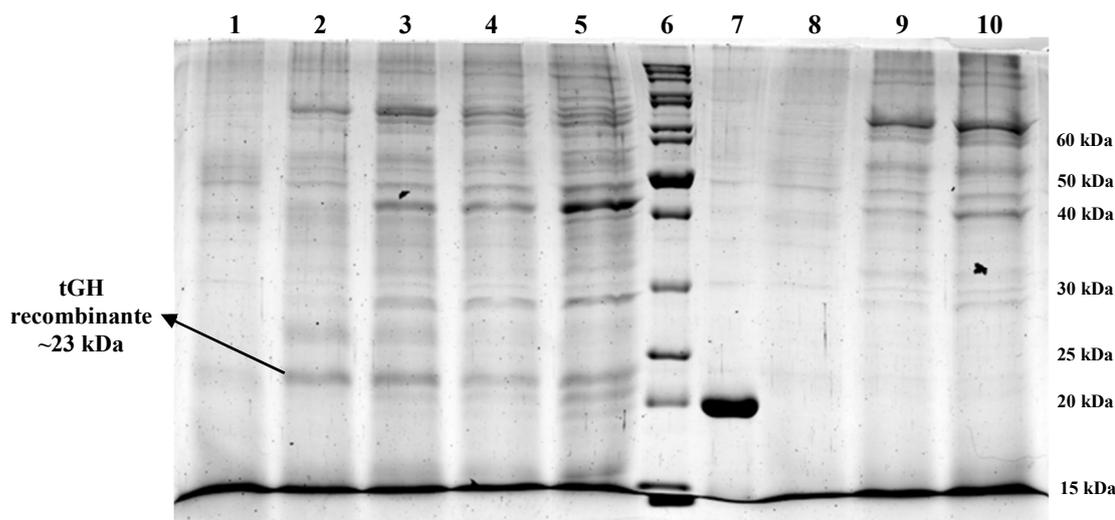
### 5.6 Análise da proteína recombinante em gel SDS-PAGE

A corrida eletroforética em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) revelou a presença de uma banda proteica de massa molecular análoga à encontrada para os GHs descritos na literatura. Essa banda não foi encontrada nas amostras oriundas do controle negativo.

Nas figuras 20 e 21 são mostrados os perfis eletroforéticos em gel SDS-PAGE das proteínas extraídas dos sobrenadantes das culturas de *P. pastoris* GS115/pPIC-tGH/Mut<sup>+</sup> (clone C3) e GS115/pPIC-tGH/Mut<sup>s</sup> (clone C4), respectivamente, nos tempos 0 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h de indução com metanol. Observa-se que a proteína rtGH foi expressa tanto no clone de fenótipo Mut<sup>+</sup> (C3) quanto no clone de fenótipo Mut<sup>s</sup> (C4). Em ambos os fenótipos, a expressão da proteína recombinante iniciou-se nas primeiras 24 h de indução e prosseguiu continuamente até às 96 h. Nesses tempos, observa-se a presença de uma banda de ~ 23 kDa, a qual não está presente nos tempos 0 h, 48 h e 96 h do controle negativo (GS115/pPIC9/Mut<sup>+</sup>). Em trabalho de expressão e secreção do GH de carpa em *P. pastoris*, foi observado que a partir das primeiras 24 h de indução a proteína recombinante já estava presente no meio e os tempos de 72 e 96 horas corresponderam ao pico da expressão dessa proteína (Li et al., 2003).



**Figura 21.** Perfil eletroforético de proteínas em gel SDS-PAGE 15 %. Expressão do GH recombinante de tambaqui no clone C3 de fenótipo Mut<sup>+</sup> (*Pichia pastoris* GS115/pPIC-tGH/Mut<sup>+</sup>). Poços de 1-5: tempos de indução 0 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h (GS115/pPIC-tGH/Mut<sup>+</sup>); 6: marcador de massa molecular de proteínas (Fermentas); 7: GH humano, isoforma de 20 kDa (Cristália); 8-10: tempos de indução 0 h, 48 h e 96 h do clone C- (GS115/pPIC9/Mut<sup>+</sup>, controle negativo).



**Figura 22.** Perfil eletroforético de proteínas em gel SDS-PAGE 15 %. Expressão do GH recombinante de tambaqui no clone C4 de fenótipo Mut<sup>s</sup> (*Pichia pastoris* GS115/pPIC-tGH/Mut<sup>s</sup>). Poços de 1-5: tempos de indução 0 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h (GS115/pPIC-tGH/Mut<sup>s</sup>); 6: marcador de massa molecular de proteínas (Fermentas); 7: GH humano, isoforma de 20 kDa (Cristália); 8-10: tempos de indução 0 h, 48 h e 96 h do clone C- (GS115/pPIC9/Mut<sup>+</sup>, controle negativo).

No clone C4, de fenótipo Mut<sup>s</sup>, observa-se o surgimento, a partir das 48 h de indução, de bandas com massa molecular inferior a banda correspondente ao tGH recombinante, sugerindo a ocorrência de degradação proteolítica ou a formação de isoformas do tGH resultantes de diferentes processamentos pós-traducionais.

Em análise de bioinformática usando os portais de pesquisa *ExPASy* e *ProtParam*, a massa molecular estimada para o tGH não glicosilado foi de 21,5 kDa. No entanto, com base nos géis de proteínas mostrados, a banda correspondente ao tGH recombinante teve migração eletroforética equivalente à massa de ~ 23 kDa.

Considerando a existência de dois sítios potenciais de glicosilação na sequência polipeptídica do tGH (ver figura 13), e que a glicosilação afeta a migração eletroforética de proteínas em gel SDS-PAGE, deduz-se que a elevação da massa estimada do tGH recombinante de 21,5 kDa para ~ 23 kDa obtida nos experimentos realizados neste trabalho seja resultado da ocorrência de glicosilação durante o processamento pós-traducional da proteína recombinante ao longo da via secretória.

Um estudo recente verificou que uma variante recombinante N-glicosilada do GH humano teve migração em gel SDS-PAGE com mobilidade correspondente a massa aproximada de 25 kDa, enquanto que no tipo natural não glicosilado a migração correspondeu à massa de 22 kDa (Flintegaard et al., 2010). Esse resultado corrobora a suposição de que o GH de tambaqui produzido em *P. pastoris* encontra-se na forma glicosilada. Esse mesmo estudo

também verificou que o GH humano recombinante glicosilado, produzido por mutagênese sítio-dirigida de cDNA, além de preservar o efeito farmacológico esperado, teve a sua meia vida prolongada na circulação de ratos GH deficientes 24 vezes superior a variante natural. Esses resultados tornam a produção heteróloga do GH de tabaqui em leveduras ainda mais promissora quando comparada à produção em sistemas procarióticos os quais possuem limitações pós-traducionais.

Em análise de bioinformática, no portal *ProtParam*, a meia-vida do tGH recombinante não glicosilado pôde ser estimada em 7,2 h em células de mamíferos *in vitro*, >20 h em células de leveduras *in vivo* e >10 h em células de *E. coli in vivo*. O pI teórico do tGH recombinante foi de 6,76.

Em muitas espécies de peixes são comuns às descrições da existência de um a dois sítios potenciais de glicosilação na sequência do GH. No GH de tabaqui foram identificados dois sítios sinais de glicosilação nas posições 126 e 178 (ver figura 13), o que não é exclusividade dessa espécie. Assim, na comparação entre as sequências de aminoácidos do GH de tabaqui e de outros Characiformes (*Piaractus mesopotamicus* – pacu), Siluriformes (*Pangasianodon gigas* – “giant catfish”, *Ictalurus punctatus* – “channel catfish”, *Heteropneustes fossilis* – “indian catfish”) e Cypriniformes (*Cyprinus carpio* – “common carp”, *Hypophthalmichthys molitrix* – “silver carp”, *Labeo rohita* – “rohu”, *Catla catla* – “catla”, *Cirrhina mrigala* – “mrigal”) observa-se a coexistência de dois sítios potenciais de N-glicosilação bem conservados (Koren et al., 1989; Chiou et al., 1990; Hong & Schartl, 1993; Anathy et al., 2001; Venugopal et al., 2002ab; Acosta et al., 2007; Pinheiro et al., 2008).

Sítios potenciais de glicosilação também são encontrados nos GHs de representantes de outras ordens de peixes como o salmão (*O. keta*) (Wagner *et al* 1985; Sekine et al., 1985) e a *Amia calva* (“bowfin”) (Rubin & Dores, 1994). Por outro lado, o GH do cão doméstico – *Canis familiaris* é um exemplo de GH não glicosilado expresso em *P. pastoris* (Ascacio-Martínez & Barrera-Saldaña, 2004).

Embora neste trabalho não se tenha adotado estratégia experimental para a quantificação do rGH de tabaqui produzido pelos clones de *P. pastoris* GS115 de fenótipos Mut<sup>+</sup> e Mut<sup>s</sup>, sabe-se que as células de fenótipo Mut<sup>s</sup>, quando cultivadas em frascos agitados, tendem a produzir quantidades equivalentes ou superiores de proteínas heterólogas quando comparadas às células de fenótipo Mut<sup>+</sup>, isso porque em sistemas de frascos agitados há um suprimento de oxigênio limitado, e as células Mut<sup>+</sup>, por demandarem elevado consumo de oxigênio, têm o seu crescimento limitado (Romanos et al., 1992; Cregg et al., 1993). Portanto, os níveis mais

elevados de produção de proteínas heterólogas em *P. pastoris* Mut<sup>s</sup> cultivada em frascos agitados têm sido comumente relatado na literatura, a exemplo da produção do GH de *C. familiaris*, que teve 40 µg/mL para Mut<sup>s</sup> e 15 µg/mL para Mut<sup>+</sup> (Ascacio-Martínez & Barrera-Saldaña, 2004), das enzimas β-galactosidase (Tschopp et al., 1987a) e invertase (Tschopp et al., 1987b), do fragmento do anticorpo A33scFv (Pla et al., 2006) e do antígeno de superfície da hepatite B humana (HBsAg) (Cregg et al., 1987).

Em sistema de biorreator, o fenótipo Mut<sup>s</sup> também pode ser mais produtivo do que o Mut<sup>+</sup>. Na produção de rGH humano, o fenótipo Mut<sup>s</sup> produziu 160 mg/L da proteína recombinante, valor três vezes superior ao obtido pelo fenótipo Mut<sup>+</sup>, apesar do fato de que a concentração celular deste último tenha sido duas vezes superior (Orman et al., 2009).

As linhagens hospedeiras Mut<sup>s</sup> portadoras de simples ou multi cópias do gene codificador do HBsAg foram mais eficientes na montagem correta da proteína recombinante do que as linhagens Mut<sup>+</sup>, sugerindo que o crescimento rápido está relacionado a limitações no dobramento da proteína recombinante, enquanto que o crescimento lento serve de obstáculo à formação de agregados (Cregg et al., 1987; Vassileva et al., 2001), análogos aos corpos de inclusão produzidos em *E. coli*.

Estudos que buscam o estabelecimento de processos fermentativos otimizados para produção de proteínas heterólogas em *P. pastoris* têm demonstrado que os níveis de expressão de uma proteína recombinante nesta levedura dependem de vários fatores, dentre os quais estão a sequência nativa do cDNA a ser expresso, os códons preferenciais, o número de cópias do cassete de expressão integrado ao genoma da levedura, a temperatura, o pH, o tempo de indução, a concentração do indutor e a aeração (Cregg et al., 1993; D'Anjou & Daugulis, 2000; Damasceno et al., 2004; Khatri, 2011).

Tem sido relatado que as variações de pH na faixa de 3-6 não geram alterações significativas na velocidade de crescimento celular. Por outro lado, o pH tem efeito direto sobre a estabilidade e rendimento da proteína recombinante produzida durante o crescimento celular, uma vez que em certas faixas de pH a ação de proteases é reduzida ou até mesmo anulada no sobrenadante da cultura (Damasceno et al., 2004).

O pH ótimo para manter a estabilidade de uma proteína varia de acordo com as propriedades da mesma. Em estudo da influência do pH sobre a produção do rGH humano em *P. pastoris*, foi demonstrado que o pH igual a 5,0 corresponde a condição ótima para em bioprocessos fermentativos, considerando, contudo, que a concentração de proteases aumenta com a elevação do pH e com o tempo de cultivo (Çalik et al., 2010). Na produção do rGH de

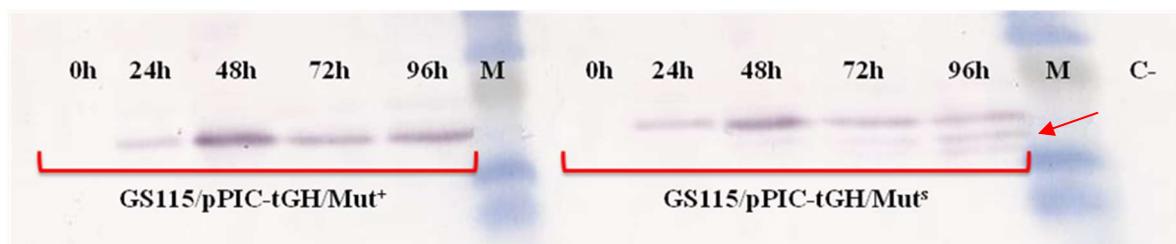
*C. carpio* (carpa), o pH ótimo foi 6,0 (Li et al., 2003). Já na produção do rGH de *Ailuropoda melanoleuca* (panda gigante), as condições ótimas foram o pH igual a 7,0 e a concentração de metanol igual a 1,5 % (Xu et al., 2008). Na produção do rGH de tambaqui, o pH foi ajustado à 6,0 e o metanol foi adicionado à concentração final de 0,5 %, de acordo com as orientações do manual de expressão em *P. pastoris* (Invitrogen, 2010).

Durante a revisão da literatura, pôde-se observar a existência de uma notável variação nos níveis de produção de GHs heterólogos em *P. pastoris*. No geral, essa variação depende da estratégia de produção a ser adotada, seja em frascos agitados ou em biorreatores. Em biorreator, os níveis de produção obtidos para o rGH humano variam de 49 mg/L (Ecamilla-Treviño et al., 2000) a ~500 mg/L (Apte-Deshpande et al., 2009). Entre as expressões de rGHs de peixes, o maior nível encontrado foi para o rGH de tilápia, com 1,5-2 g/L (Acosta et al., 2007). Na expressão em frascos agitados, o maior nível de expressão encontrado foi a do GH de *C. carpio*, com 300-400 mg/L (Li et al., 2003).

Em *P. pastoris*, o nível de expressão heteróloga obtido a partir de culturas em frascos agitados pode não refletir com precisão o nível observado em culturas de biofermentadores (Cregg et al., 1993). Assim, é imprescindível a realização de futuros trabalhos de investigação sobre as condições ótimas específicas para produção do rGH de tambaqui, tanto em escala laboratorial quanto em escala industrial, tendo em vista sobretudo a viabilidade econômica e aplicabilidade zootécnica do produto biotecnológico.

### **5.7 Análise *Western blotting* da proteína recombinante no sobrenadante da cultura**

Confirmando os resultados obtidos em gel SDS-PAGE, a análise *Western blotting*, realizada através da imunodeteção da cauda de histidina, detectou a presença do tGH recombinante no sobrenadante das culturas de *P. pastoris* GS115/pPIC-tGH/Mut<sup>+</sup> (clone C3) e GS115/pPIC-tGH/Mut<sup>s</sup> (clone C4) a partir de 24 h de indução por metanol. Através da análise da intensidade das bandas na figura 22, é possível afirmar que o tempo de 48 h de indução corresponde ao pico de concentração do tGH recombinante em ambos os fenótipos. O aumento da concentração de proteases nos tempos posteriores pode ter resultado em degradação proteolítica de proteínas, reduzindo a concentração de tGH recombinante no sobrenadante da cultura. Conforme o esperado, nos tempos de 0 h de ambos os clones e no tempo de 72 h do controle negativo (GS115/pPIC9/Mut<sup>+</sup>) não houve imunorreção, indicando a ausência do tGH recombinante no meio.



**Figura 23.** Análise *Western blotting* da expressão do GH recombinante de tabaqui nos clones de *Pichia pastoris* Mut<sup>+</sup> (C3) e Mut<sup>S</sup> (C4). M: marcador de massa molecular, 10-230 kDa (*New England BioLabs*); C-: controle negativo no tempo de 72 h de indução. A reação apontada pela seta indica a ocorrência de degradação proteolítica ou a formação de isoformas do GH recombinante de tabaqui.

No clone C4, de fenótipo Mut<sup>S</sup>, a seta indica ou ocorrência de degradação proteolítica ou a formação de isoformas do tGH recombinante resultante de processamento pós-traducional, conforme inferido anteriormente.

A produção de proteínas fusionadas a cauda de histidina é um método amplamente utilizado para facilitar a subsequente detecção e purificação da proteína de interesse. Uma vez que a atividade biológica da proteína fusionada raramente é afetada, a necessidade de remoção da cauda de histidina depende da aplicação destinada à proteína de interesse (Terpe, 2003). De modo geral, o efeito sobre a atividade biológica e estrutura terciária depende da localização e composição de aminoácidos da cauda escolhida (Bucher et al. 2002).

No presente trabalho, a cauda de histidina foi essencial para confirmação da produção do tGH recombinante em *P. pastoris*, uma vez que ainda não existe um anticorpo específico anti-tGH. Em momento futuro, o tGH recombinante poderá ser facilmente purificado por cromatografia de afinidade e utilizado em estudos zootécnicos e fisiológicos de peixes amazônicos.

## 6 CONCLUSÕES

- I. Durante o levantamento bibliográfico foi verificada a existência de vasta gama de trabalhos envolvendo a expressão gênica e a produção GHs de peixes em *E. coli*, sendo a expressão em *P. pastoris* uma abordagem em desenvolvimento.
- II. No presente trabalho foi possível demonstrar que somente a sequência otimizada do cDNA do GH de tambaqui pode ser expressa na levedura *P. pastoris* e a proteína recombinante secretada para o sobrenadante da cultura dirigida pelo fator  $\alpha$  de *S. cerevisiae*.
- III. O tambaqui, por sua importância econômica, foi até o momento a única espécie de peixe amazônica a ter o cDNA do GH expresso em sistema heterólogo, o qual pode servir de base para a produção de GHs de outras espécies importantes para a aquicultura regional e nacional.
- IV. Com base apenas em análise de gel SDS-PAGE, não houve diferenças aparentes nos níveis de expressão do tGH recombinante entre os fenótipos Mut<sup>s</sup> e Mut<sup>+</sup>.
- V. O tGH recombinante foi encontrado no sobrenadante da cultura a partir das primeiras 24 h de indução por metanol e prosseguiu até às 96 horas de experimento.
- VI. Com base nas análises de bioinformática da sequência polipeptídica do tGH, a massa estimada do tGH não glicosilado seria de 21,5 kDa. No entanto, o perfil eletroforético em gel SDS-PAGE revelou que o tGH recombinante expresso em *P. pastoris* tem massa molecular de ~ 23 kDa. Essa parece ser a forma glicosilada desta proteína, haja vista a existência de dois sítios potenciais de glicosilação na sequência proteica.
- VII. A expressão do tGH recombinante em *P. pastoris* foi confirmada através da reação de imunodeteção, a qual também apontou que o tempo de 48 h de indução correspondeu ao momento de maior concentração do tGH recombinante no meio em ambos os fenótipos.
- VIII. O tGH recombinante poderá ser analisado quanto a sua eficiência na aceleração do crescimento de juvenis de tambaqui com vista à possibilidade de uso na produção aquícola, o que decerto representará avanço e inovação nas tecnologias de cultivos de peixes amazônico.

## 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- I. Realizar a espectrometria de massa para confirmação e caracterização do tGH recombinante expresso em *P. pastoris*.
- II. Produzir o tGH em biorreator e otimizar sua produção.
- III. Purificar o tGH recombinante e analisar sua eficiência zotécnica na aceleração do crescimento de juvenis de tambaqui.
- IV. Realizar a expressão intracelular do tGH em *P. pastoris*.
- V. Realizar estudos fisiológicos do tGH recombinante mediante análise de RT-PCR em tempo real.

## 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. 2009. Tilapia somatotropin polypeptides: potent enhancers of fish growth and innate immunity. *Biotechnología Aplicada*, Vol.26, n. 3, 267-272p.
- Acosta, J.; Morales, R.; Morales, A.; Alonso, M.; Estrada, M.P. 2007. *Pichia pastoris* expressing recombinant tilapia growth hormone accelerates the growth of tilapia. *Biotechnol. Lett.*, 29: 1671-1676p.
- Agellon, L.B.; Chen, T.T. 1986. Rainbow trout growth hormone: molecular cloning of cDNA and expression in *Escherichia coli*. *DNA*, 5: 463-467p.
- Agellon, L.B.; Davies, S.L.; Chen, T.T.; Powers, D.A. 1988a. Structure of a fish (*Rainbow trout*) growth hormone gene and its evolutionary implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5136-5140p.
- Agellon, L.B.; Emery, C.J.; Jones, J.M.; Davies, S.L.; Dingle, A.D.; Chen, T.T. 1988b. Promoting of rapid growth of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by a recombinant fish growth hormone. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 45: 146-151p.
- Anathy, V.; Venugopal, T.; Koteeswaran, R.; Pandian, T.J.; Mathavan, S. 2001. Cloning, sequencing and expression of cDNA encoding growth hormone from Indian catfish (*Heteropneustes fossilis*). *J. Biosci.*, Vol. 26, n. 3, 315-324p.
- Apte-Deshpande, A.; Rewanwar, S.; Kotwal, P.; Raiker, V.A.; Padmanabhan, S. 2009. Efficient expression and secretion of recombinant human growth hormone in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: potential applications for other proteins. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 54: 197-205p.
- Araújo-Lima, C.; Goulding, M. 1998. Os frutos do tabaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. Volume 4 de Estudos do Mamirauá. Sociedade Civil Mamirauá. 186p.
- Arranz, S.E.; Sciara, A. A.; Botta, P.; Cerutti, P.; Tobin, M.; Somoza, G.M. 2008. Growth hormone-insuline-like growth factor-I system in pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes). *R. Bras. Zootec.*, Vol. 37, *Suplemento Especial*, 01-07p.
- Ascacio-Martínez, Jorge A.; Barrera-Saldaña, Hugo A. 2004. Production and secretion of biologically active recombinant canine growth hormone by *Pichia pastoris*. *Gene*, 340: 261-266p.
- Ayson, F. G.; De Jesus, E.G.; Amemiya, Y.; Moriyama, S.; Hirano, T.; Kawakauchi, H. 2000. Isolation, cDNA cloning, and growth promoting activity of rabbitfish (*Siganus guttatus*) growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 117: 251-259p.
- Baccarin, A.E.; Pezzato, L.E. 2001. Efeito da utilização da levedura desidratada de álcool em dietas para tilápia-do-Nilo. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, Vol. 36, n. 3, 549-556p.
- Bai, J.J.; Ma, J.; Jian, Q.; Li, X.H.; Luo, J.R. 1999. Cloning of cDNA for common carp GH and its expression in prokaryocyte. *Chin. J. Biochem. Mol. Biol.*, 15: 409-412p.
- Barat, A.; Richerds, R.I.; Baxter, J.D.; Shine, J. 1981. Primary structure and evolution of rat growth hormone gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 4867-4871p.

- Barthem, R.B.; Fabr e, N.N. 2003. 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.
- Batista, V.S.; Chaves, M.P.S.R.; Júnior, C.H.F.; Oliveira, M.F.G.; Silva, A.J.; Bandeira, C.F. 2007. 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.
- Bernardi, G.; D’Onofrio, G.; Caccio’, S.; Bernardi, G. 1993. Molecular phylogeny of bony fishes based on their amino acid sequence of the growth hormone. *J. Mol. Evol.*, 16, 644-649p.
- Bideci, A.;  amurdan, O. 2009. Physiology of growth hormone secretion. *J Clin Res Ped Endo*, (Suppl 1): 1-7p.
- Boettner, M.; Steffens, C.; Mering, C.V; Bork, P.; Stahl, U.; Lang, C. 2007. Sequence-based factors influencing the expression of heterologous genes in the yeast *Pichia pastoris*: a comparative view on 79 human genes. *Journal of Biotechnology*, 130: 1-10p.
- Bretthauer, R.K. 2003. Genetic engineering of *Pichia pastoris* to humanize N-glycosylation of proteins. *Trends in Biotechnology*, Vol. 21, n. 11, 459-462p.
- Bretthauer, R.K.; Castellino, F.J. 1999. Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 30: 193-200p.
- 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. 2002. Effects of glucose, free fatty acids or arginine load on the GH-releasing activity of ghrelin in humans. *Clin Endocrinol.*, 57: 265-271p.
- Bucher, M.H.; Evdokimov, A.G.; Waugh, D.S. 2002. Differential effects of short affinity tags on the crystallization of *Pyrococcus furiosus* maltodextrin-binding protein. *Biol Cryst*, 58: 392-397p.
- Buckup, P.A.; Menezes, N.A.; Ghazzi, M.S. 2007. Cat logo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Rio de Janeiro: Museu Nacional. 195p.
- Byrd, J.C.; Tarentino, A.L.; Maley, F.; Atkinson, P.H.; Trimble, R.B. 1982. Glycoprotein synthesis in yeast identification of Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> as an essential intermediate in oligosaccharide processing. *J. Biol. Chem.*, 257: 14657-14666p.
-  alık, P.; Bayraktar, E.; İnankur, B.; Soyaslan, E.Ş.; Şahin, M.; Taşpınar, T.; A ık, E.; Yılmaz, R.;  zdamar, T.H. 2010. Influence of pH on recombinant human growth hormone production by *Pichia pastoris*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Volume 85, Issue 12, 1628-1635p.
- Cereghino, G.P.; Cereghino, J.L.; Ilgen, C.; Cregg, J.M. 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol*, 13: 329-332p.
- Cereghino, J.L.; Cregg, J.M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 45-66p.
- Chang, Y.S.; Liu, C.S; Huang, F.L.; Lo, T.B. 1992. The primary structures of growth hormones of three cyprinoids species: bighead carp, silver carp and grass carp. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 87: 385-393p.

- Chen, D.; Yang, F.; Wang, W.; Xu, X. 1998. Intracellular expression of *Lateolabrox japonicus* growth hormone in methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Prog. Biochem. Biophys.*, 25, 140-143p.
- Chen, H.L.; Li, S.S.; Huang, R.; Tsai, H.J. 2008. Conditional production of a functional fish growth hormone in the transgenic line of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae). *J. Phycol.*, 44, 768-776p.
- Chen, T.T.; Marsh, A.; Shambloott, M.; Chan, K.M.; Tang, Y.L.; Cheng, C.M.; Yang, B.Y. 1994. Structure and evolution of fish growth hormone and insulinlike growth factor genes. *In: Molecular Endocrinology of Fish. Fish Physiology*, Vol. XIII, 179-209p.
- Chen, X.Z.; Shafer, A.W.; Yun, J.S.; Li, Y.S.; Wagner, T.E.; Kopchick, J.J. 1992. Conversion of bovine growth hormone cysteine residues to serine affects secretion by cultured cells and growth rates in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.*, 6: 598-606p.
- Chen, Y.; Wang, Y.; He, S.; Zhu, Z. 2004. Cloning and sequencing of the growth hormone gene of large yellow croaker and its phylogenetic significance. *Biochemical Genetics*, Vol. 42, 365-375p.
- Cheng, Clara M.; Lin, C.M.; Shambloott, M.; Gonzalez-Villasenoc, L.I.; Powers, D.A.; Woods, C.; Chen, T.T. 1995. Production of a biologically active recombinant teleostean growth hormone in *E. coli* cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Vol. 108, Issues 1-2, 27, 75-85p.
- Chiou, C.S.; Chen, H.T.; Chang, W.C. 1990. The complete nucleotide sequence of the growth-hormone gene from the common carp (*Cyprinus carpio*). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1087, 91-94p.
- Clements, M.D.; Bart Jr., H.L.; Hurley, D.L. 2004. Isolation and characterization of two distinct growth hormone cDNAs from the tetraploid smallmouth buffalofish (*Ictiobus bubalus*). *General and Comparative Endocrinology*, 136: 411-418p.
- Costa, L.R.F.; Barthem, R.B.; Bittencourt, M.M. 2001. A pesca do tambaqui, *Colossoma macropomum*, com enfoque na área do Médio Solimões, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, 31(3): 449-468p.
- Couderc, R.; Baratti, J. 1980. Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: purification and properties of alcohol oxidase. *Agric. Biol. Chem.*, 44: 2279-2289p.
- Cregg, J.M. 1999. Expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *In: Hoeffler, J. & Fernandez, J. Nature: The palette for the art of expression, Ed. Academic Press, San Diego, CA*, 157-191p.
- Cregg, J.M.; Barringer, K.J.; Hessler, A.Y.; Madden, K.R. 1985. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 5, n. 12. 3376-3385p.
- Cregg, J.M.; Cereghino, J.L.; Shi, J.; Higgins, D.R. 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, Vol., 16, 23-52p.
- Cregg, J.M.; Madden, K.R.; Barringer, K.J.; Thill, G.P.; Stillman, C.A. 1989. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia Pastoris*. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 9, n. 3, 1316-1323p.
- Cregg, J.M.; Tolstorukov, I.; Kusari, A.; Sunga, J.; Madden, K.; Chappell, T. 2009. Expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Methods in Enzymology*, Vol. 463, 169-188p.
- Cregg, J.M.; Tschopp, J.F.; Stillman, C.; Siegel, R.; Akong, M.; Craig, W.S.; Buckholz, R.G.; Madden, K.R.; Kellaris, P.A.; Davis, G.R.; Smiley, B.L.; Cruze, J.; Torregrossa, R.;

- Velicelebi, G; Thill, G.P. 1987. High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology*, 5: 479-485p.
- Cregg, J.M.; Vedvick, T.S.; Raschke, W.C. 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*, 11: 905-910p.
- D'Anjou, M.C.; Daugulis, A.J. 2000. A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, 72: 1-11p.
- Daly, R.; Hearn, M.T.W. 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.*, 18: 119-138p.
- Damasceno, L.M.; Pla, I.; Chang, H.J.; Cohen, L.; Ritter, G.; Old, L.J.; Batt, C.A. 2004. An optimized fermentation process for high-level production of a single-chain Fv antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 37: 18-26p.
- De Bernardez Clark, E. 1998. Refolding of recombinant proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9: 157-63p.
- Debnath, Surajit. 2010. A review on the physiology of Insulin like growth factor-I (IGF-I) peptide in bony fishes and its phylogenetic correlation in 30 different taxa of 14 families of teleosts. *Advances in Environmental Biology*, 5(1): 31-52p.
- DeNoto, F.M.; Moore, D.D.; Goodman, H.M. 1981. Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing. *Nucleic Acid Res.*, 9: 3719-3730p.
- Duan, C. 1997. The insulin-like growth factor system and its biological actions in fish. *Amer. Zool.*, 37: 491-503p.
- Duan, C.; Plisetskaya, E.M. 1993. Nutritional regulation of insulin-like growth factor I mRNA expression in salmon tissues. *J. Endocrinol.*, 139: 43-252p.
- Duguay, S.J.; Park, L.K.; Samadpour, M.; Dickhoff, W.W. 1992. Nucleotide sequence and tissue distribution of three insulin-like growth factor I prohormones in salmon. *Mol. Endocrinol.*, 6, 1202-1210p.
- Duman, J.G.; Miele, R.G.; Liang, H.; Grella, D.K.; Sim, K.L.; Castellino, F.J.; Bretthauer, R.K. 1998. O-mannosylation of *Pichia pastoris* cellular and recombinant proteins. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 28: 39-45p.
- Ecamilla-Treviño, L.L.; Viader-Salvadó, J.M.; Barrera-Saldaña, H.A.; Guerrero-Olazará, M. 2000. Biosynthesis and secretion of recombinant human growth hormone in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 22: 109-114p.
- Ellgaard, L.; Helenius, A. 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. Vol. 4, 181-191p.
- Embrapa. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Fábio Reyno. 2012. Embrapa inicia o primeiro sequenciamento do genoma de peixes brasileiros. Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2012/janeiro/3a-semana/embrapa-inicia-o-primeiro-sequenciamento-do-genoma-de-peixes-brasileiros/>. Acessado em: 19 julho de 2012.
- Embrapa. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Tupinambá, M.J.; Souza, S.R.S. 2009. Tabaqui terá centro de melhoramento genético. Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2009/janeiro/1a-semana/tabaqui-tera-centro-de-melhoramento-genetico/?searchterm=tabaqui>. Acessado em: 19 julho de 2012.

- Essa, M.A.; Mabrouk, H.A.; Mohamed, R.A.; Michael, F.R. 2011. Evaluating different additive levels of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, on the growth and production performances of a hybrid of two populations of Egyptian African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*, 320, 137-141p.
- Fine, M.; Sakal, E.; Vashdi, D.; Daniel, V.; Levanon, A.; Lipshitz, O.; Certler, A. 1993. Recombinant carp (*Cyprinus carpio*) growth hormone: expression, purification, and determination of biological activity *in vitro* and *in vivo*. *General and Comparative Endocrinology*, 89: 51-61p.
- Flintegaard, T.V.; Thygesen, P.; Rahbek-Nielsen, H.; Levery, S.B.; Kristensen, C.; Clausen, H.; Bolt, G. 2010. N-Glycosylation increases the circulatory half-life of human growth hormone. *Endocrinology*, 151(11): 5326–5336p.
- Fonseca, M.C. 2006. Produção de estreptavidina recombinante pela levedura *Pichia pastoris*. Tese (Doutorado em *Magister Scientiae*). Universidade Federal de Viçosa, 69p.
- Frankenne, F.; Scippo, M.L.; Van B.J.; Igout, A.; Hennen, G. 1990. Identification of placental growth hormone as the growth hormone-V gene expression product. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 71: 15-18p.
- Funkenstein, B.; Chen, T.T.; Powers, D.A.; Cavari, B. 1991. Cloning and sequencing of gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth hormone encoding cDNA. *Gene*, 103: 243-247p.
- Funkenstein, B.; Dyman, A.; Lapidot, Z.; Jesus-Ayson, E.G.; Gertler, A.; Ayson, F.G. 2005. Expression and purification of a biologically active recombinant rabbitfish (*Siganus guttatus*) growth hormone. *Aquaculture*, 250: 504-515p.
- Gaiotto, J.R. 2005. Utilização de levedura de cana-de-açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*) e seus subprodutos na alimentação de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*). Dissertação (Mestrado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2005.
- Goeddel, D.V.; Heyneker, H.L.; Hozumi, T.; Arentzen, R.; Itakura, K.; Yansura, D.G.; Ross, M.J.; Miozari, G.; Crea, R.; Seeburg, P. 1979. Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature*, 281(5732): 544-548p.
- Goldenberg, N.; Barkan, A. 2007. Factors regulating growth hormone secretion in humans. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.*, 36: 37-55p.
- Goulding, M.; Carvalho, M. L. 1982. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): An important Amazonian food fish. *Revista Brasileira de Zoologia*, 1: 107-133p.
- Guillén, I.I.; Leonart, R.; Agramante, A.; Morales, R.; Morales, A.; Hernández, C.A.; Vázquez, M.M.; Díaz, M.; Herrera, M.T.; Álvarez-Lajonchere, L.; Hernández, O.; La Fuente, J. 1998. Physiological changes in the juvenile euryhaline teleost, the tilapia *Oreochromis hornorum*, injected with *E. coli*-derived homologous growth hormone. *J Mar Biotechnol*, 6: 142-151p.
- Guler, H.P.; Zapf, J.; Schmid, C.; Froesch, E.R. 1989. Insulin-like growth factors I and II in healthy man: estimations of half-lives and production rates. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 121: 753-758p.
- Hasslacher, M.; Schall, M.; Hayn, M.; Bona, R.; Rumbold, K.; Luckl, J.; Griengl, H.; Kohlwein, S.D.; Schwab, H. 1997. High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from

- the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. *Protein Expr. Purif.*, 11: 61-71p.
- Hayami, T.; Sato, N.; Ichiryu, T.; Inoue, Y.; Murata, K.; Kimura, S.; Nonaka, M.; Kimura, A. 1989. Production of recombinant tuna growth hormone by a yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric. Biol. Chem.*, 53: 2917-2922p.
- Henikoff, S.; Cohen, E.H. 1984. Sequences responsible for transcription termination on a gene segment in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 4: 1515-1520p.
- Hertz, Y.; Tchelet, A.; Madar, Z.; Gertler, A., 1991. Absorption of bioactive human growth hormone after oral administration in the common carp (*Cyprinus carpio*) and its enhancement by deoxycholate. *J. Comp. Physiol. B*, 161: 159-163p.
- Higgins, D.R.; Cregg, J.M. 1998. Introduction to *Pichia pastoris*. In: *Pichia* Protocols. *Methods in Molecular Biology*, 103, Humana Press, Totowa, NJ.
- Hisano, H.; Narváez-Solarte, W.V.; Barros, M.M.; Pezzato, L.E. 2007. Desempenho produtivo de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com levedura e derivados. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, Vol. 42, n. 7, 1035-1042p.
- Hisano, H.; Sampaio, F.G.; Barros, M.M.; Pezzato, L.E. 2008. Digestibilidade aparente de rações contendo levedura íntegra, levedura autolisada e parede celular pela tilápia-do-Nilo. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 34(2): 281-287p.
- Ho, W.K.K.; Mng, Z.Q.; Lin, H.R.; Poon, C.T.; Leung, Y.K.; Yan, K.T.; Dias, N.; Che, A.P.K.; Liu, J.; Zheng, W.M.; Sun, Y.; Wong, A.O.L. 1998. Expression of grass carp growth hormone by baculovirus in silkworm larvae. *Biochim. Biophys. Acta*, 381: 331-339p.
- Ho, W.K.K.; Wong, M.W.; Chan, A.P.Y. 1991. Cloning and sequencing of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) growth hormone gene. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1090: 245-248p.
- Hong, Y.; Scharl, M. 1993. Sequence of the growth hormone (GH) gene from the silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and evolution of GH genes in vertebrates. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1174: 285-288p.
- Invitrogen. 2010. For Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. Disponível em [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pichiameth\_man.pdf]. Acessado em: 21 setembro de 2012.
- Isaac, V.J.; Ruffino, M.L. 2000. Informe estatístico do desembarque pesqueiro na cidade de Santarém, PA: 1992-1993, 225-280p. In: IBAMA. Recursos pesqueiros do médio Amazonas: biologia e estatística pesqueira, (Coleção Meio Ambiente. Serie Estudos Pesca, 22). Brasília.
- Jacometo, C.B.; Barrero, N.M.L.; Rodriguez-Rodriguez, M.D.P.; Gomes, P.C.; Povh, J.A.; Junior, D.P.S.; Vargas, L.; Resende, E.K.; Ribeiro, R.P. 2010. Variabilidade genética em tambaquis (Teleostei: Characidae) de diferentes regiões do Brasil. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, Vol. 45, n. 5, 481-487p.
- Jeh, H.S.; Kim, C.H.; Lee, H.K.; Han, K. 1998. Recombinant flounder growth hormone from *Escherichia coli*: overexpression, efficient recovery, and growth-promoting effect on juvenile flounder by oral administration. *Journal of Biotechnology*, 60: 183-193p.
- Khatri, N.K. 2011. Optimisation of recombinant protein production in *Pichia pastoris*. (Academic Dissertation). University of Oulu, Faculty of Technology, Department of Process and Environmental Engineering, 57p.

- Kim, D.H.; Kim, Y.T.; Cho, J.J.; Bae, J.H.; Hur, S.B.; Hwang, I.; Choi, T.J. 2002. Stable integration and functional expression of flounder growth hormone gene in transformed microalga, *Chlorella ellipsoidea*. *Mar. Biotechnol.*, 4, 63-73p.
- Kimura, A. 1991. Microbial production of tuna growth hormone. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 11: 113-127p.
- Koren, Y.; Sarid, S.; Ber, R.; Daniel, V. 1989. Carp growth hormone: molecular cloning and sequencing of cDNA. *Gene*, 77: 309-315p.
- Koutz, P.; Davis, G.R.; Stillman, C.; Barringer, K.; Cregg, J.; Thill, G. 1989. Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast*, 5: 167-177p.
- Kukuruzinska, M.A.; Bergh, M.L.E.; Jackson, B.J. 1987. Protein glycosylation in yeast. *Ann. Rev. Biochem.*, 56: 915-944p.
- Le Bail, P.Y.; Sire, M.F.; Vernier, J.M. 1989. Intestinal transfer of growth hormone into the circulation system of rainbow trout, *Salmon gairdneri*: interference by granule cells. *J. Exp. Zool.*, 251: 101-107p.
- Lemaire, C.; Writ, S.; Panyin, S. 1994. Giant catfish *Pangasianodon gigas* growth hormone-encoding cDNA cloning and sequencing by one sided polymerase chain reaction. *Gene*, 49: 271-276p.
- Li, P.; Anumanthan, A.; Gao, X.G.; Ilangovan, K.; Suzara, V.V.; Düzgüneş, N.; Renugopalakrishnan, V. 2007. Expression of recombinant proteins in *Pichia Pastoris*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 142: 105-124p.
- Li, P.; Gatlin, D.M. 2003. Evaluation of brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*). *Aquaculture*, 219, 681-692p.
- Li, P.; Gatlin, D.M. 2004. Dietary brewers yeast and the prebiotic Grobiotic™ influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. *Aquaculture*, Vol. 231, 445-456p.
- Li, Y.; Bai, J.; Jian, Q.; Ye, X.; Lao, H.; Li, X.; Luo, J.; Liang, X. 2003. Expression of common carp growth hormone in the yeast *Pichia pastoris* and growth stimulation of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 216: 329-341p.
- Li, Y.H.; Bai, J.J.; Li, X.H.; Ye, X.; Jian, Q.; Luo, J.R.; Liang, X.F. 2001. Expression of common carp growth hormone in yeast *P. pastoris*. *Chin. J. Biochem. Mol. Biol.*, 17, 488-491p.
- Liu, S.; Zhang, X.; Zang, X.; Liu, B.; Arunakumara, K.K.I.U; Xu, D.; Zhang, X. 2008. Growth, feed efficiency, body muscle composition, and histology of flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed GH transgenic *Synechocystis*. *Aquaculture*, 277: 78-82p.
- Lopes, T.S; Streit Jr., D.P.; Ribeiro, R.P.; Povh, J.A.; Lopera-Barrero, N.M.; Vargas, L.; Pinto Filho, C.; Queiroz, J.R. 2009. Diversidade genética de estoques de reprodutores de *Colossoma macropomum*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Vol. 61, n.3, 728-735p.
- Ma, J.; Bai, J.J.; Li, X.H.; Luo, J.R.; Jian, Q.; Zhang, H.J. 1999. Expression of rainbow trout GH cDNA in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Chin. J. Biotechnol.*, 15(4): 219-224p.
- Macauley-Patrick, S.; Fazenda, M.L.; McNeil, B.; Harvey, L.M. 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22: 249-270p.

- Mahmoud, S.S.; Wang, S.; Moloney, N.M.; Habibi, H.R. 1998. Production of a biologically active novel goldfish growth hormone in *Escherichia coli*. *Comp. Biochem. Physiol., Part B*, 120: 657-663p.
- McLean, E.; Donaldson, E.M.; Dye, H.M.; Souza, L.M. 1990. Growth acceleration of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) following oral administration of recombinant bovine somatotropin. *Aquacult.*, 91: 197-203p.
- Melamed, P.; Gong, Z.; Fletcher; Hew, C.L. 2002. The potential impact of modern biotechnology on fish aquaculture. *Aquaculture*, 204: 255-369p.
- Meurer, F.; Hayashi, C.; Soares, C.M.; Boscolo, W.R. 2000. Utilização de levedura *spray dried* na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). *Acta Scientiarum*, 22(2): 479-484p.
- Moore, D.D.; Walker, M.D.; Diamond, D.J.; Conkling, M.A.; Goodman, H.M. 1982. Structure, expression and evolution of growth hormone genes. *Rec. Progr. Horm. Res.*, 38: 197-225p.
- Moriyama, S.; Kawauchi, H. 1990. Growth stimulation of juvenile salmonids by immersion in recombinant salmon growth hormone. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56: 31-34p.
- Moriyama, S.; Takahashi, A.; Hirano, T.; Kawauchi, H. 1990. Salmon growth hormone is transported into the circulation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after intestinal administration. *J Comp Physiol B*, 160: 251-257p.
- Moriyama, S.; Yamamoto, H.; Sugimoto, S.; Abe, T.; Hirano, T.; Kawauchi, H. 1993. Oral administration of recombinant salmon growth hormone to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 112: 99-106p.
- MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. 2012. Boletim estatístico da pesca e aquicultura do ano de 2010. Disponível em: [http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes\\_e\\_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf). Acessado em: 19 julho de 2012.
- Muller, E.E.; Locatelli, V.; Cocchi, D. 1999. Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiological Reviews*, Vol. 79, n. 2, 511-607p.
- Nelson, J.S. 2006. Fishes of the world. *John Wiley and Sons*, Inc. New York. 4 Ed. 601p.
- Olvera-Novoa, M.A.; Martínez-Palacios, C.A.; Olivera-Castillo, L. 2002. Utilization of torula yeast (*Candida utilis*) as a protein source in diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters) fry. *Aquaculture Nutrition*, 8, 257-264p.
- Orman, M.A.; Çalık, P.; Özdamar, T.H. 2009. The influence of carbon sources on recombinant-human-growth-hormone production by *Pichia pastoris* is dependent on phenotype: a comparison of Mut<sup>s</sup> and Mut<sup>+</sup> strains. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 52: 245-255p.
- Ortuño, J.; Cuesta, A.; Rodríguez, A.; Esteban, M.A.; Meseguer, J. 2002. Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Spaurus auratus* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Vol.85, 41-50p.
- Ozório, R.O.A.; Portz, L.; Borghesi, R.; Cyrino, J.E.P. 2012. Effects of dietary yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) supplementation in practical diets of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Animals*, 2: 16-24p.

- Pendón, C.; Martínez-Barberá, J.P.; Pérez-Sánchez, J.; Rodríguez, R.B.; Grenett, H.; Valdivia, M.M. 1994. Cloning of the sole (*Solea senegalensis*) growth hormone-encoding cDNA. *Gene*, Vol. 145, Issue 2, 237-240p.
- Peréz-Sánchez J. 2000. 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*, 22: 135-144p.
- Peréz-Sánchez, J.; Martí-Palanca, H.; Kaushik, S.J. 1995. 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.*, 125: 546-552p.
- Pezzato, L.E.; Menezes, A.; Barros, M.M.; Guimarães, I.G.; Schich, D. 2006. Levedura em dietas para alevinos de tilápia do Nilo. *Veterinária e Zootecnia*, Vol.13, n. 1, 84-94p.
- Pinheiro, J.S; Wolff, J.L.C.; Araújo, R.C.; Hilsdorf, A.W.S. 2008. Molecular cloning and sequence analysis of growth hormone cDNA of neotropical freshwater fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Genetics and Molecular Biology*, 31: 381-384p.
- Piyaviriyakul, P.; Panyim, S.; Eurwilaichitr, L. 2002. High intracellular expression of giant catfish growth hormone under the control of PGK promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 18: 773-777p.
- Pla, I.A.; Damasceno, L.M.; Vannelli, T.; Ritter, G.; Batt, C.A.; Shuler, M.L. 2006. Evaluation of Mut<sup>+</sup> and Mut<sup>s</sup> *Pichia pastoris* phenotypes for high level extracellular scFv expression under feedback control of the methanol concentration. *Biotechnol Prog*, 22: 881-888p.
- Pratap, J; Rajamohan, G; Dikshit, K.L. 2000. Characteristics of glycosylated streptokinase secreted from *Pichia pastoris*: enhanced resistance of SK to proteolysis by glycosylation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53: 469-475p.
- Promdonkoy, B.; Warit, S.; Panyim, S. 2004. Production of a biologically active growth hormone from giant catfish (*Pangasianodon gigas*) in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 26: 649-653p.
- Ray, J.; Jones, B.; Liebhaber, S.A.; Cooke, N.E. 1989. Glycosylated human growth hormone variant. *Endocrinology*, 125: 566-568p.
- Rayon, C.; Lerouge, P.; Faye, L. 1998. The protein N-glycosylation in plants. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 49, n. 326, 1463-1472p.
- Rentier-Delrue, F.; Swennen, D.; Mercier, L.; Lion, M.; Benrubi, O.; Martial, J.A. 1989b. Molecular cloning and characterization of two forms of trout growth hormone cDNA: expression and secretion of tGH-II by *Escherichia coli*. *DNA*, 8(2): 109-117p.
- Rentier-Delrue, F.; Swennen, D.; Philippart, J. C.; L'hoir, C.; Lion, M.; Benrubi, O.; Martial, J.A. 1989a. Tilapia growth hormone: molecular cloning of cDNA and expression in *Escherichia coli*. *DNA*, 8(4): 271-278p.
- Romanos, M. 1995. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Current Opinion in Biotechnology*, 6: 527-533p.
- Romanos, M.A.; Makoff, A.J.; Fairweather, N.F.; Beesley, K.M.; Slater, D.E.; Rayment, F.B.; Payne, M.M.; Clare, J.J. 1991. Expression of tetanus toxin fragment C in yeast: gene synthesis is required to eliminate fortuitous polyadenylation sites in AT-rich DNA. *Nucleic Acids Res.*, 19, 1461-1467p.

- Romanos, M.A.; Scorer, C.A.; Clare, J.J. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, Vol. 8: 423-488p.
- Rousseau, K.; Dufour, S. 2007. Comparative aspects of GH and metabolic regulation in lower vertebrates. *Neuroendocrinology*, 86: 165-174p.
- Rubin, D.A.; Dores, R.M. 1994. Cloning of a growth hormone from a primitive bony fish and its phylogenetic relationships. *General and Comparative Endocrinology*, 95, 71-83p.
- Saito, A.; Sekine, S.; Kornats, Y.; Sato, M.; Hirano, T.; Itoh, S. 1988. Molecular cloning of eel growth hormone cDNA and its expression in *Escherichia coli*. *Gene*, 73: 545-551p.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. 2. Ed. New York, 1659p.
- Sato, N.; Hayami, T.; Murata, K.; Watanabe, K.; Kariya, Y.; Sakaguchi, M.; Kimura, S.; Nonaka, M.; Kimura, A. 1989. Expression of tuna growth hormone cDNA in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 30: 153-159p.
- Sato, N.; Murata, K.; Watanabe, K.; Hayami, T.; Kariya, Y.; Sakaguchi, M.; Kimura, S.; Nonaka, M.; Kimura, A. 1988. Growth-promoting activity of tuna growth hormone and expression of tuna growth hormone cDNA in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 10: 385-393p.
- Schneider, J.F.; Myster, S.H.; Hackett, P.B.; Guise, K.S.; Faras, A. J. 1992. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for northern pike *Esox lucius*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 1, 106-112p.
- Schulte, P.M.; Down, N.E.; Donaldson, E.M.; Souza, L.M. 1989. Experimental administration of recombinant bovine growth hormone to juvenile rainbow trout (*Salmon gairdneri*) by injection or by immersion. *Aquacult.*, 76: 145-156p.
- Sciara, A.A.; Rubiolo, J.A.; Somoza, G.M.; Arranz, S.E. 2006. Molecular cloning, expression and immunological characterization of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) growth hormone. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology and Toxicology*, 142: 284-292p.
- Sciara, A.A.; Vigliano, F.A.; Somoza, G.M.; Arranz, S.E. 2011. Muscular hypertrophy and growth-promoting effects in juvenile pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) after oral administration of recombinant homologous growth hormone obtained by a highly efficient refolding process. *Aquaculture Research*, 42, 844-857p.
- Scorer, C.A.; Buckholz, R.G.; Clare, J.J.; Romanos, M.A. 1993. The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 136(1-2): 111-9p.
- Sekine, S.; Mizukami, T.; Nishi, T.; Kuwana, Y.; Saito, A.; Sato, M.; Itoh, S.; Kawauchi, H. 1985. Cloning and expression of cDNA for salmon growth hormone in *Escherichia coli*. *Proc. Nati. Acad. Sci., USA*. Vol. 82, 4306-4310p.
- Selamoğlu, H. 2009. High-level expression of hepatitis B surface antigen in *Pichia pastoris*, its purification and immunological characterization. Master of Science Biotechnology Department, Middle East Technical University, 90p.
- Siegel, R.S.; Brierley, R.A. 1989. Methylotrophic yeast *Pichia pastoris* produced in high-cell-density fermentations with high cell yields as vehicle for recombinant protein production. *Biotechnology Bioengineering*, 34: 403-404p.

- Signor, A. 2009. Levedura íntegra e levedura autolisada como pronutriente em dieta para reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu.
- Soares, M.C.F.; Roubach, R.; Honeczaryck, A.; Lourenço, J.N.P. 2000. Aquicultura na Amazônia Legal: prioridades e sustentabilidade. *Anais do Simpósio Brasileiro de Aqüicultura – SIMBRAQ*, Florianópolis, 11.
- Soares, M.G.M.; Costa, E.L.; Siqueira-Souza, F.K.; Anjos, H.D.B.; Yamamoto, K.C.; Freitas, C.E.C. 2008. Peixes de lagos do médio rio Solimões. 2ª Ed., Rev. – Manaus: Piatam.
- Song, S.; Zhang, T.; Zhao, W.; Qi, W.; Hu, W.; Wang, P.; Hew, C.L. 1993. Expression of chinook salmon growth hormone gene in *E. coli*. *Aquaculture*, Vol. 111, Issues 1-4, 199-205p.
- Sousa, A.R.B. 2009. 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.
- Souza, H.M. 2007. Expressão do gene *L1* do Papilomavírus bovino tipo 4 em células da levedura *Pichia pastoris*. Dissertação (Mestrado). UFPE. CCB. Genética. 86p.
- Spadiut, O.; Olsson, L.; Brumer, H. 2010. A comparative summary of expression systems for the recombinant production of galactose oxidase. *Microbial Cell Factories*, 9: 68.
- Suframa. 2003. Zona franca de Manaus: Projeto potencialidades regionais - Estudo de viabilidade econômica: piscicultura. Vol. 8.
- Tang, Y.; Lim, C.M.; Chen T.T.; Kawauchi, H.; Dunham, R.A.; Powers, D.A. 1993. Structure of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) growth hormone gene and its evolutionary implications. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 4: 198-206p.
- Terpe, K. 2003. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 60: 523-533p.
- Tsai, H.J.; Chen, H.M.; Lo, C.F. 1994b. Secretory synthesis of active recombinant fish growth hormone by insect cells using a baculovirus vector. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 51, 1-7p.
- Tsai, H.J.; Hsih, M.H.; Kuo, J.C. 1997. *Escherichia coli*-produced fish growth hormone as a feed additive to enhance the growth of juvenile black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*). *J. Appl. Ichthyol.*, 13: 79-82p.
- Tsai, H.J.; Kuo, J.C.; Lou, S.W.; Kou, T.T. 1994a. Growth enhancement of juvenile striped mullet by feeding recombinant yeasts containing fish growth hormone. *Prog. Fish-Cult.*, 56: 7-12p.
- Tsai, H.J.; Lin, K.L.; Chen, T.T. 1993a. Molecular cloning and expression of yellowfin porgy (*Acanthopagrus latus* Houttuyn) growth hormone cDNA. *Comp. Biochem. Physiol.*, 104B: 803-810p.
- Tsai, H.J.; Lin, K.L.; Kuo, J.C.; Chen, S.W. 1995. Highly efficient expression of fish growth hormone by *Escherichia coli* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 61, n. 11, 4116-4119p.
- Tsai, H.J.; Tseng, C.F. 1992. Expression of rainbow trout hormone cDNA in *E. coli* from vector utilizing tac promoter. *J. Fish. Soc. Taiwan*, 19: 45-53p.
- Tsai, H.J.; Wei, K.C.; Ching, C.C. 1993b. Enhancement of tilapia growth by dietary administration of recombinant yeast lysates as a supplement. *J. Fish. Soc. Taiwan*, 20: 339-345p.

- Tschopp, J.F.; Brust, P.F.; Cregg, J.M.; Stillman, C.A.; Gingeras, T.R. 1987a. Expression of the *lacZ* gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastons*. *Nucleic Acids Research*. Vol. 15, n. 9, 3859-3876p.
- Tschopp, J.F.; Sverlow, G.; Kosson, R.; Craig, W.; Grinna, L. 1987b. High-level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*. 5: 1305-1308p.
- Tull, D.; Gottschalk, T.E.; Svendsen, I.; Kramhoft, B.; Phillipson, B.A.; Bisgard-Frantzen, H.; Olsen, O.; Svensson, B. 2001. Extensive N-glycosylation reduces the thermal stability of a recombinant alkalophilic *Bacillus*  $\alpha$ -amylase produced in *Pichia pastoris*. *Protein Express. Purif.*, 21: 13-23p.
- Val, A.L.; Rolim, P.R.; Tabela, H. 2000. Situação atual da aquicultura na Região Norte. In: Valenti, W.C.; Poli, C.R.; Pereira, J.A.; Borghetti, J.R. [eds.] *Aquicultura no Brasil: Bases para seu Desenvolvimento Sustentável*. CNPq, Brasília, 247-266p.
- Vassileva, A; Chugh, D.A.; Swaminathan, S.; Khanna, N. 2001. Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Express. Purif.*, 21: 71-80p.
- Venugopal, T. Mathavan, S.; Pandian, T.J. 1998. Cloning, sequencing and comparison of growth hormone cDNA of Indian major carps. *Proc. Fifth Asian Fisheries Forum*, Thailand, 136p.
- Venugopal, T.; Anathy, V.; Pandian, T.J.; Gong, G.Z.; Mathavan, S. 2002a. 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.*, 125: 236-247p.
- Venugopal, T.; Mathavan, S.; Pandian, T.J. 2002b. Molecular cloning of growth hormone encoding cDNA of Indian major carps by a modified rapid amplification of cDNA ends strategy. *J. Biosci.*, Vol. 27, n. 3, 261-272p.
- Wagner, G.F.; Fargher, R.C.; Brown, J.C.; McKeown, B.A. Further characterization of growth hormone from the chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *General and Comparative Endocrinology*. Volume 60, Issue 1, October 1985, Pages 27-34.
- Wang, W.; Sun, Y.H.; Wang, Y.P.; Zhu, Z.Y. 2003. Expression of grass carp growth hormone in the yeast *Pichia pastoris*. *Yi Chuan Xue Bao*, 30: 301-306p.
- Wang, W.; Wang, Y.P.; Zhu, Z.Y. 2001. Prokaryotic expression of recombinant grass carp growth hormone. *Yi Chuan Xue Bao*, 28(4): 306-12p.
- Werten, M.W.T.; Bosch, T.J.V.D.; Wind, R.D.; Mooibroek, H.; Wolf, F.A. 1999. High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. *Yeast*, 15: 1087-1096p.
- Woynarovich, E. 1986. Tambaqui e pirapitinga: propagação artificial e criação de alevinos. CODEVASF, Brasília. 68p.
- Xu, Q.; Wu, X.; Hou, R.; Liao, M.; Il, K.H.; Shou, J.; Bian, H.; Han, N.; Pan, J.; Zhang, Z.; Zhu, M. 2008. High-level secretory expression, purification and characterization of *Ailuropoda melanoleuca* growth hormone in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 60: 182-187p.
- Yamano, Y.; Oyabayashi, K.; Okuno, M.; Jato, M.; Kioka, N.; Manabe, E.; Hashi, H.; Sakai, H.; Komano, T.; Utsumi, K.; Iritani, A. 1988. Cloning and sequencing of cDNA that encodes goat growth hormone. *FEBS Lett.* 228: 301-304p.

- Yousefian, M.; Shirzad, E. 2011. The review of the effect of growth hormone on immune system, metabolism and osmoregulation of fish. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(5): 467-475p.
- Zaret, K. S.; Sherman, F. 1982. DNA sequence required for efficient transcription termination in yeast. *Cell*, 28: 563-573p.
- Zhang, A.L.; Luo, J.X.; Zhang, T.Y.; Pan, Y.W.; Tan, Y.H.; Fu, C.Y.; Tu, F.Z. 2009. Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. *Mol Biol Rep*, 36: 1611-1619p.
- Zhang, W.; Inan, M.; Meagher, M.M. 2000. Fermentation strategies for recombinant protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, Vol. 5: 275-287p.

## APÊNDICE

### MEIOS DE CULTIVOS PARA *E. coli*

#### Meio LB (*Luria Bertani*): cultivo da cepa de *E. coli* DH10B

Peptona	10 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	5 g/L
Ágar	15 g/L

Os meios foram autoclavados a 120 °C por 15 minutos. A seguir adicionava-se o agente antimicrobiano apropriado: ampicilina, na concentração final de 100 µg/mL, quando necessário.

### MEIOS CULTIVOS PARA *P. pastoris*

#### Meio YPD (*Yeast Extract, Peptone, Dextrose Medium*): manutenção da linhagem *P. pastoris* GS115

Extrato de levedura	10 g/L
Peptona	20 g/L
Glicose	2 %
Ágar	20 g/L

Este meio foi esterilizado por autoclavagem e as soluções de glicose previamente filtrada e ampicilina na concentração de 100 µg/mL foram adicionadas posteriormente.

#### MD (*Minimal Dextrose Medium*): meio mínimo com glicose e sem histidina para seleção de células transformantes de *P. pastoris*

YNB	1,34 %
Biotina	4 x 10 <sup>-5</sup> %
Glicose	2 %
Ágar	20 g/L

O volume da mistura foi completado com água ou ágar estéril, para meio líquido ou sólido, respectivamente e adicionados 100 µg/mL de ampicilina.

#### MM (*Minimal Methanol Medium*): meio mínimo com metanol sem histidina para determinação fenotípica Mut<sup>+</sup> e Mut<sup>s</sup>

YNB	1,34 %
Biotina	4 x 10 <sup>-5</sup> %
Metanol	0,5 %
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 µg/mL.

#### BMGY-U (*Buffered Glycerol Complex Medium*): meio complexo tamponado com glicerol para o aumento de massa celular de *P. pastoris*

Extrato de levedura	10 g/L
Peptona	20 g/L
Tampão fosfato pH 6,0	100 mM

YNB ou Ureia	1,34 %
Biotina	$4 \times 10^{-5}$ %
Glicerol	1 %

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

**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	1,34 %
Biotina	$4 \times 10^{-5}$ %
Metanol	0,5 %

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

As soluções utilizadas na preparação de meios de culturas e todas as outras suspensões ou soluções utilizadas ao longo dos experimentos foram esterilizadas por autoclavagem ou filtração.

**SOLUÇÕES ESTOQUES PARA PREPARO DE MEIO DE CULTIVO PARA *P. pastoris***

**10X YNB**

Yeast Nitrogen Base	3,4 %
Sulfato de amônio	10 %

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.

**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.

**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.

**Glicose (20 %)**

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

**Tampão fosfato 1M, pH 6,0 (100 mL)**

A quantidade de 13,2 mL de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  foram combinados com 86,8 mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . O pH deve ser confirmado e ajustado, se necessário. Foi esterilizado em autoclave a 120 °C por 20 minutos.