



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



EXPRESSÃO ENDÓGENA DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO
DE TABAQUI (*COLOSSOMA MACROPOMUM*) EM *PICHIA*
PASTORIS

REGIANE MONTEIRO LINHARES

MANAUS
2021

Regiane Monteiro Linhares

Expressão endógena do hormônio do crescimento de tabaqui
(*Colossoma macropomum*) em *Pichia pastoris*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho
Coorientador: Prof. Dr. Edson Júnior do Carmo

MANAUS
2021

FICHA CATALOGRÁFICA

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

L755e Linhares, Regiane Monteiro
Expressão endógena do hormônio do crescimento de tabaqui (Colossoma macropomum) em Pichia pastoris : endógena do hormônio do crescimento de tabaqui (Colossoma macropomum) em Pichia pastoris / Regiane Monteiro Linhares . 2021
85 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Spartaco Astolfi Filho
Coorientador: Edson Júnior do Carmo
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Hormônio de crescimento. 2. Expressão intracelular. 3. Expressão heteróloga. 4. PGK1. 5. Tabaqui. I. Astolfi Filho, Spartaco. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Regiane Monteiro Linhares

Expressão endógena do hormônio do crescimento de tabaqui
(*Colossoma macropomum*) em *Pichia pastoris*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em 22 de abril de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho, Presidente
Universidade Federal do Amazonas

Profa. Dra. Elen Bethleen de Souza Carvalho, Membro
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres, Membro
Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido saúde física e mental para poder concluir este trabalho.

Agradeço, em especial, a minha querida irmã Raimara por ter me apoiado e por sempre ter uma palavra de consolo e otimismo, mesmo quando tudo estava dando errado, da mesma forma agradeço ao meu noivo, Jordan pelo apoio emocional durante esse árduo período. Aos meus pais Adriana Nascimento e Reis Diomar pelo apoio e inspiração de pessoas fortes que são.

Agradeço ao meu estimado orientador, Professor Doutor Spartaco Astolfi Filho por ter me aceitado como aluna desde a graduação, pela preciosa orientação, amizade, paciência, apoio e entusiasmo com o trabalho científico, esse entusiasmo encantador que contagia a todos aqueles que têm contato com esse excelente profissional.

Agradeço ao meu coorientador, Professor Doutor Edson Júnior do Carmo pela valiosa orientação, paciência, esforço, compreensão e amizade.

Meus sinceros agradecimentos a todos os servidores e associados ao Centro de Apoio Multidisciplinar- CAM, a Dra. Elen Bethleen de Souza, pela inestimável ajuda no decorrer deste trabalho, bem como agradeço a Dra. Enedina Assunção, ao Dr. Júlio Nino, Dr. Elson Sadalla, Dr. Edmar Vaz, Dra. Isabelle Cordeiro, a MSc. Kerollen Pinto, ao MSc. Diego Patrícia e a técnica Carmem por estarem sempre dispostos a colaborar com esta pesquisa científica.

Aos amigos que o laboratório me presenteou, a Dra. Lorena Motta, MSc. Jander Matos, MSc. Mozanil Pantoja, MSc. Janeth Lara, Laís Maciel e Maria Auxiliadora Pinto agradeço pelas horas de trabalho em que nos intervalos entre as etapas de experimentos havia muita conversa e risadas, companheirismo e a certeza de que daria tudo certo.

Agradeço aos Professores Doutores Fernando Araripe da UnB, Wallice Paxiúba Duncan da UFAM e Gilvan Ferreira da Silva da Embrapa que muito colaboraram fornecendo materiais que sem os quais eu não conseguiria terminar este trabalho.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação no qual estou associada, espero ter colaborado positivamente.

Agradeço ao Conselho Nacional de Pesquisas - CNPq pelo auxílio financeiro, cedendo-me uma bolsa de estudos, sem a qual seria muito difícil a realização deste trabalho científico.

Agradeço a UFAM como um todo por ser um celeiro de pesquisas científicas, com seus inúmeros professores/pesquisadores que inspiram estudantes do nível superior e básico.

Meus sinceros agradecimentos a todos que colaboraram direta ou indiretamente na realização desta pesquisa.

Muito obrigada!

Se você quer os acertos,
esteja preparado para os erros.

Carl Yastrzemski

Terminada a decadência
inicia-se o progresso.

Provérbio chinês

RESUMO

Na região norte, onde há o maior consumo de pescado, o tambaqui (*Colossoma macropomum*) é o peixe mais consumido. Para possibilitar o aumento da produção do tambaqui, é necessária compreensão sobre a fisiologia, ecologia, dentre outros conhecimentos, para uma otimização e padronização de tecnologias a serem aplicadas na produção desse peixe. Recentemente, o cDNA do hormônio de crescimento de tambaqui foi construído por síntese química e expresso em *P. pastoris* sob o controle do promotor pAOX1 dessa levedura. Considerando a toxicidade do indutor deste promotor, este trabalho tem como principal objetivo a expressão heteróloga intracelular do hormônio de crescimento de tambaqui (rtGH) na levedura *Pichia pastoris*, utilizando um promotor constitutivo, o pPGK1. Foram construídos dois vetores para expressão de rtGH, sendo que esses vetores foram linearizados e integrados no genoma de *P. pastoris* linhagem M12 (auxotrófica para o aminoácido leucina). Os clones transformantes foram selecionados inicialmente no meio seletivo MD seguido de uma segunda seleção por crescimento em meio MD com o antibiótico G418. Para confirmação das colônias transformantes, foi realizada identificação do gene rtGH por meio de PCR, enquanto a confirmação da expressão intracelular da proteína foi realizada por imunodot e SDS-PAGE/Western Blotting. Como a expressão do tGH ocorreu em níveis baixos, esforços deverão ser realizados no sentido de se identificar a razão da baixa produção, para que se possa obter a expressão do hormônio em níveis em que se possa utilizar a levedura recombinante para suplementação de ração para peixes.

Palavras-chave: Hormônio de crescimento, expressão intracelular, expressão heteróloga, PGK1, tambaqui.

ABSTRACT

In the northern region, where there is the highest consumption of fish, tambaqui (*Colossoma macropomum*) is the most consumed fish. To enable increased production of tambaqui, it is necessary to understand the physiology, ecology, among other knowledge, for an optimization and standardization of technologies to be applied in the production of this fish. Recently, the cDNA of tambaqui growth hormone was built by chemical synthesis and expressed in *P. pastoris* under the control of the pAOX1 promoter of this yeast. Considering the toxicity of the inducer of this promoter, this work aims at the intracellular heterologous expression of tambaqui growth hormone (rtGH) in the yeast *Pichia pastoris*, using a constitutive promoter, pPGK1. Two vectors were constructed for rtGH expression, and these vectors were linearized and integrated into the genome of *P. pastoris* lineage M12 (auxotrophic for the amino acid leucine). The transforming clones were initially selected in the selective medium MD followed by a second selection by growth in MD medium with the antibiotic G418. To confirm the transforming colonies, the rtGH gene was identified by PCR, while the confirmation of intracellular expression of the protein was performed by immunodot and SDS-PAGE/Western Blotting. As the expression of tGH occurred at low levels, efforts should be made to identify the reason for low production, so that the expression of the hormone can be obtained at levels where recombinant yeast can be used for feed supplementation for fish.

Keywords: Growth hormone, intracellular expression, heterologous expression, PGK1, tambaqui.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de ações metabólicas induzidas pelo GH	10
Figura 2	Vetores comumente utilizados em <i>P. pastoris</i>	14
Figura 3	Mapa estrutural do vetor pPIC9	16
Figura 4	Mapa estrutural do vetor pKId-GFP	17
Figura 5	Simulação do produto de PCR com primer pPGK-GH	34
Figura 6	Simulação do produto de PCR com primer pPGK-GH	35
Figura 7	Extração de plasmídeos pKId-GFP e pUC-rtGH	38
Figura 8	Obtenção dos amplicons rtGHe1 e rtGHe2	39
Figura 9	Digestão analítica do vetor pKId-GFP	40
Figura 10	Digestão analítica dos vetores recombinantes	41
Figura 11	PCR de colônias transformadas com pKId-rtGHe1	42
Figura 12	PCR de colônias transformadas com pKId-rtGHe2	43
Figura 13	Placa de Petri com <i>Pichia pastoris</i> M12	44
Figura 14	Extração de DNA cromossomal de <i>Pichia pastoris</i>	45
Figura 15	PCR de colônias de levedura	45
Figura 16	Cinética do crescimento da <i>P. pastoris</i>	46
Figura 17	Gel de proteína SDS-PAGE	48
Figura 18	<i>Dot blotting</i>	50
Figura 19	<i>Western Blotting</i>	51
Figura 20	Membrana <i>Western Blotting</i>	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros de reação de PCR	28
Tabela 2	Dados dos sistemas de digestão	29
Tabela 3	Composição do sistema de ligação e volumes	30
Tabela 4	Valores de proteínas totais	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP - Adenosina difosfato

AOX - Enzima álcool oxidase

ATP - Adenosina trifosfato

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool (Ferramenta de busca e Alinhamento básico local)

DNA- Ácido desoxirribonucleico

dNTPs - Desoxirribonucleosídeos trifosfato

DTT - Ditioneitol

EDTA - Ácido Etilendiamino tetra acético

H₂O - Água

Kb - Quilobase

kDa - Quilodalton

L - Litro

LB - Meio Luria-Bertani

M - Molar

MD - Meio Mínimo com Dextrose

µL - Microlitro

ng - Nanograma

°C - Graus celsius

OD 600- Densidade ótica

pb - Par de bases

PCR - Polimerase chain reaction ou reação em cadeia da polimerase

PGK1 - Gene que codifica a 3-fosfoglicerato quinase

PMSF - Fluoreto de fenilmetanossulfonil

SDS - Dodecil sulfato de sódio

TA - Temperatura ambiente

TBE - Tris Borato EDTA

TBS - Tampão salino e triton

TEMED - Tetrametiletenodiamina

YPD - Yeast peptone Dextrose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
1.1 O hormônio de crescimento	7
1.2 Expressão de proteínas em <i>Pichia pastoris</i>	13
1.3 Vetores de expressão	14
OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Estratégia experimental para a expressão endógena de rtGH em <i>Pichia pastoris</i>	20
3.2 Hospedeiras	22
3.3 Meios de cultura	23
3.4 Soluções	24
3.5 Vetores utilizados	25
3.6 Oligonucleotídeos	26
3.7 Preparo de hospedeiras de <i>E. coli</i> para transformação genética	28
3.7.1 Transformação da hospedeira com vetores de trabalho	28
3.7.2 Amplificação de rtGH por PCR	29
3.7.3 Digestão enzimática	30
3.7.4 Purificação do pKId e da sequência codificadora do rtGH	30
3.8 Construção dos vetores recombinantes	31
3.8.1 Ligaçã	31
3.8.2 Transformação de <i>Escherichia coli</i> com vetores recombinantes	32
3.8.3 PCR de colônia de <i>E. coli</i> transformadas	32
3.8.4 Sequenciamento dos vetores recombinantes	33
3.8.5 Propagação e extração de pKId-rtGHe1 e pKId-rtGHe2	33
3.9 Preparo de <i>Pichia pastoris</i> eletrocompetentes	33
3.9.1 Transformação de <i>Pichia pastoris</i> com os vetores recombinantes	34
3.9.2 Seleção das leveduras transformantes	34
3.9.3 Crescimento e expressão do rtGH em frascos agitados	36
3.9.4 Rendimento de biomassa celular	36
3.9.5 Análise da expressão endógena do rtGH em <i>Pichia pastoris</i>	37
3.9.6 Detecção do rtGH por <i>Dot Blotting</i>	37
3.9.7 <i>Western Blotting</i>	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 Propagação e extração de pKId-GFP e pUC-rtGH	39
4.2 Isolamento do gene rtGH por PCR	40
4.3 Análise de restrição do vetor pKId-GFP	41

4.4 Análises de restrição dos vetores recombinantes	42
4.5 PCR de colônia	43
4.6 Seleção das leveduras recombinantes	44
4.7 Extração do DNA cromossomal de levedura	45
4.8 – Crescimento celular e rendimento de biomassa	46
4.9 Análise da expressão endógena do rtGH em <i>Pichia pastoris</i>	48
4.10 Análise da Expressão do rtGH por <i>Dot blotting</i>	49
4.11 Análise da Expressão do rtGH por <i>Western Blotting</i>	51
5. CONCLUSÃO	54
6. PERSPECTIVAS	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXO A	72
ANEXO B	74
ANEXO C	75

1. INTRODUÇÃO

O pescado vem se destacando no comércio mundial principalmente por ser um produto alimentício versátil e ter propriedades consideradas saudáveis, porém, os peixes necessitam ser rapidamente manuseados, processados, armazenados e transportados com intuito de reduzir a perda dos valores nutricionais da carne e evitar desperdícios da produção. No ano de 2015 os peixes correspondiam a cerca de 17% da proteína animal consumida mundialmente, as estimativas para os anos de 2016 e 2017 indicaram um aumento per capita do consumo dessa carne, que passou de 20,2 kg (consumo per capita de 2015) para 20,3 kg e 20,5 kg, respectivamente, sendo um aumento significativo, principalmente se comparado ao ano de 1961, em que o consumo per capita era de apenas 9,0 kg (FAO, 2018).

No Brasil, em 2019 foram produzidas 758.006 toneladas de peixes, mostrando um crescimento de 4,9% da produção, se comparado ao ano de 2018, com 722.560t (PEIXE BR, 2020). Apesar desse crescimento positivo, o Brasil ainda não se destaca no mercado mundial de exportação de pescado, tais posições de destaque são ocupadas por China, Noruega e Vietnã segundo dados da FAO (2018). No entanto, ainda segundo dados da Associação Brasileira de Piscicultura, o Brasil tem destaque na produção mundial de tilápia ocupando a 4° posição de maior produtor mundial desse peixe com 432.149 toneladas a produção de tilápia representou cerca de 57% da piscicultura em 2019. Apesar do cenário otimista do país, a adoção da modernização do setor pesqueiro poderia otimizar essa atividade econômica visto que um dos principais motivos do país não se destacar na exportação mundial de pescado é o fato do cultivo dar-se de maneira ainda rudimentar. Os países que se destacam investem regularmente no desenvolvimento e modernização dos processos que resultam no aumento da produtividade do pescado. As tecnologias aplicadas a este setor ainda são escassas em território nacional devido ao desconhecimento técnico e até à tecnologia ultrapassada ainda utilizada. Com relação a peixes nativos ocorrem dificuldades no manejo e na manutenção, a ausência de padronização com relação a quantidade e composição da ração para cada etapa de vida do peixe afeta diretamente seu

crescimento. O despreparo na manutenção e higienização das estruturas que mantêm esses animais resultam em doenças principalmente parasitárias implicando em desnutrição e até a morte desses animais, esses problemas que atingem a piscicultura são sanados pelo desenvolvimento de conjuntos de soluções cujo termo técnico é denominado pela expressão, “pacotes tecnológicos”, esses pacotes são conjuntos de parâmetros e protocolos estabelecidos, adequados para uso com devida espécie de peixe (MERCANTE *et al.*, 2018; MACEDO & SIPAÚBA-TAVARES, 2010).

No Brasil, como visto, o peixe de larga produção na indústria de pescado é a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758. A tilápia do Nilo é um peixe nativo da África, introduzido na América do Sul. Esse peixe tem o registro de ser uma das primeiras espécies a ser cultivada para consumo humano pelos antigos egípcios continuaram a ser peixes apreciados pela indústria de pescado por serem de fácil manejo, visto que os pacotes tecnológicos foram estabelecidos com sucesso para essa espécie. Trata-se de um peixe que apresenta rápido crescimento, seu abate ocorre após o animal alcançar o porte de 12-15 cm, apresenta boa carne, poucas espinhas e é de paladar aceitável (KUBITZA, 2003).

Apesar da intensificação da tilapicultura, é válido reconhecer que o Brasil possui espécies nativas com potencial para cultivo, voltando-se para a região amazônica em que apresenta aproximadamente 2.500 espécies de peixes de água doce, representando cerca de 75% da diversidade de espécies do Brasil (COHEN, 1970; GEISLER *et al.*, 1975). Atualmente, espécies amazônicas como o tambaqui (*Colossoma macropomum*), matrinxã (*Brycon amazonicus*) e o pirarucu (*Arapaima gigas*) têm despertado interesse na indústria do pescado, porém, não há pacotes tecnológicos estabelecidos para essas espécies.

Embora existam problemas com pacotes tecnológicos, padronização de técnicas e difícil acesso a insumos que afeta o ciclo de produção de peixes, no Amazonas a agricultura familiar vem crescendo e esses agricultores vêm se adaptando às condições de cultivo da região. Indicando que a piscicultura é uma atividade que vem se destacando na Amazônia Ocidental, também é observado o aumento no número de produtores registrados como piscicultores familiares e distribuídos em todo o território amazonense, o que possibilita o crescimento socioeconômico, utilizando fontes naturais local como a

abundância hídrica e condições climáticas favoráveis para o cultivo, adequado às espécies de interesse econômico (Arruda, 2017).

Dentre esses peixes, o tambaqui é o mais apreciado na região norte, no entanto, a exploração mais comum é a pesca extrativista que leva constantemente a resultados negativos quanto à oferta e demanda.

Essa situação vem incentivando o investimento no desenvolvimento de pacotes tecnológicos para a espécie visto o interesse do cultivo em larga escala em outras regiões do país. Na região Norte, as espécies mais cultivadas são 92% tambaqui, 5% matrinxã e 2% pirarucu (PANTOJA-LIMA *et al.*, 2015).

Atualmente, o maior consumo de tambaqui é na capital Manaus, cerca de 40.000 t/ano, com necessidade de importação de aproximadamente 20.000 toneladas ao ano, sendo que 80% é oriundo de Rondônia, 18% de Roraima e 2% do Acre (SUFRAMA, 2003).

O tambaqui é uma espécie de peixe pertencente à classe Actinopterygii, ordem Characiformes, família Characidae, subfamília Serrasalminae é originário da América do Sul das bacias do rio Amazonas e Orinoco (ARAÚJO-LIMA & GOMES, 2005). Na natureza, alcança porte máximo em torno de 100 cm e acima de 30 kg de peso, são registrados recordes de peixes com peso de 40 e 44 kg e de tamanho de 108 e 115 cm (MORAIS & O'SULLIVAN, 2017).

Sua resistente dentição permite a quebra de frutos e sementes que fazem parte de sua dieta alimentar, consome insetos, caramujos e ocasionalmente peixes menores, além de ser filtrador de plâncton nas criações, também possui ampla aceitação de alimento, como rações, grãos e resíduos da agroindústria (DAIRIKI *et al.*, 2011; PANTOJA DE JESUS, 2015). Apesar da ampla aceitação de alimentos por parte desse peixe, é importante ressaltar que uma alimentação de má qualidade pode causar sabor e cheiro desagradável à carne, excesso de gordura e crescimento retardatório (MACEDO-VIÉGAS, 2004). O ciclo do tambaqui em cativeiro acontece em um período de 12 meses, desses, 9 meses são necessários para as etapas de recria e engorda, os outros 3 meses são para o processo de despesca (MORAIS & O'SULLIVAN, 2017).

A seleção de espécies nativas de interesse comercial unido ao desenvolvimento de pacotes tecnológicos proporcionará a alta produção de pescado o ano inteiro e em toda região que desenvolva a atividade de cultivo de peixes. Dentre os principais pacotes a serem desenvolvidos, está o de crescimento, pois é de interesse dos piscicultores a redução do ciclo de produção dos peixes, ciclo considerado longo se comparado a outros animais. O uso da tecnologia do DNA recombinante pode gerar um grande avanço no desenvolvimento desses pacotes. O objetivo deste estudo foi a produção do hormônio do crescimento de tambaqui na levedura *Pichia pastoris* de modo que essa expressão seja intracelular usando o promotor constitutivo pPGK1, dispensando a utilização de metanol para indução da expressão possibilitando sua utilização como suplemento de rações para criação de tambaqui e suprimindo a técnica tradicional de aplicação de hormônio a qual se dá pela injeção no peixe.

1.1 O hormônio de crescimento

O hormônio de crescimento (GH) é um hormônio proteico produzido pela glândula pituitária, no início do século 19 já se conhecia a importância dessa glândula para os animais, considerando a execução de alguns experimentos realizados com cães e porcos quando comumente retiravam a hipófise do animal e analisavam seu efeito. Em 1910 por meio de experimentos de hipofisectomia em animais, Aschner mostrou que o efeito mais notável que esta produzia era a estagnação do crescimento, em 1912, esse pesquisador, por meio de seus experimentos que testaram a função da hipófise, demonstrou que uma molécula, o hormônio do crescimento, exercia a ação de promover o crescimento somático dos animais.

Em 1920, experimentos envolvendo a extirpação da hipófise realizados por Houssay (1936), evidenciou a redução da hiperglicemia de diabetes, nos anos seguintes foi demonstrado o fator diabetogênico induzido por extrato de pituitária (EVANS *et al.*, 1931; YOUNG, 1939; YOUNG, 1953; RUSSELL-JONES, 1941). Tal experimento revelou que o GH dificulta o uso de glicose pelo fígado e pelos tecidos periféricos como adiposo e muscular,

contrapondo a ação da insulina, aumentando os níveis de glicose no sangue, além disso, o hormônio do crescimento em condições anormais possui efeitos sob as ilhotas de Langerhans degenerando-as, induzindo a elevados níveis de insulina secretada (BRATUSCH-MARRAIN *et al.*, 1982; FOWELIN *et al.*, 1993; MOLLER *et al.*, 1990; RIZZA *et al.*, 1982; NIELSEN, 1982; NISHAD *et al.*, 2018; PARK *et al.*, 1952).

Estudos mostraram que pacientes acometidos por acromegalia além de resistência aumentada à insulina também possuíam altas taxas de intermediários lipídicos, esses intermediários são facilmente assimilados pelo tecido muscular prejudicando a absorção de glicose desencadeando cetose e acidose. O hormônio do crescimento também induz à alta expressão do receptor de adiponectina 2 no fígado. A adiponectina é um hormônio modulador de processos metabólicos como a regulação da glicemia e catabolismo de ácidos graxos estimulando assim a lipólise e oxidação lipídica (MOLLER *et al.*, 1992; PRESS *et al.*, 1984; NISHAD *et al.*, 2018).

Como visto, há muitas décadas é sabido que o hormônio do crescimento (GH) exerce uma função central ligada a vários processos fisiológicos em vertebrados mamíferos e não mamíferos, envolvendo vias de sinalização celular e indução da produção de proteínas como a IGF-1. Essa característica tem despertado interesse, pois seu uso pode ter aplicações tecnológicas no cultivo de animais para consumo humano (ROTWEIN, 2020).

O desenvolvimento do organismo, seja fetal ou até mesmo o período de maturação sexual está intimamente ligado a um processo biológico conhecido como crescimento somático, inúmeros processos fisiológicos são controlados pelo sistema endócrino bem como o crescimento é modulado pelo hormônio do crescimento (GH), insulina e por fatores de crescimento semelhante à insulina IGF-1, dentre outros com mecanismos menos conhecidos (BECKMAN, 2011).

Apesar das vias de sinalização apresentarem pequenas diferenças entre animais vertebrados mamíferos e não mamíferos quanto a tipos de proteínas envolvidas nas cascatas de reações, sabe-se que essas vias são altamente conservadas desde invertebrados até vertebrados (VOLKOFF, 2019). O hormônio do crescimento é um polipeptídeo de aproximadamente 22 kDa composto de 190 a 204 aminoácidos incluindo o peptídeo sinal, sua estrutura proteica globular é constituída por 4 alfa-hélices antiparalelas com 2 pontes

dissulfeto entre as cadeias e um segmento aminoterminal invariável (KIPNIS, 1997; WALLIS, 1992).

Esse hormônio é produzido por células denominadas somatotrofos presentes no lobo anterior da glândula pituitária e transportado no plasma ligado à proteínas, a secreção do GH não é contínua ocorrendo regularmente geralmente em intervalos de 3 a 5 horas e tem sua principal regulação exercida por dois hormônios hipotalâmicos: o hormônio liberador de GH (GHRH) que promove a secreção do GH e a somatostatina, que é inibidora da liberação do hormônio do crescimento, outros mediadores endócrinos também influem na transcrição do gene do GH como o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), liberado pelo tecido hepático. Quando apresenta altos níveis inibe a secreção de GH por meio de feedback negativo promovendo a liberação da somatostatina, já a regulação positiva ocorre pelos hormônios: tiroxina, os glicocorticóides e a grelina, um hormônio gástrico (RUSSELL-JONES, 1941; NISHAD et al., 2018).

A secreção do hormônio do crescimento não cessa após o término do período normal de crescimento corporal, mas continua ocorrendo em menores taxas ao longo da vida, portanto é esperado que esse hormônio exerça outras funções (RUSSELL-JONES, 1941). São atribuídas ao hormônio do crescimento funcionalidades no metabolismo de glicose, lipídeos e proteínas (Figura 1).

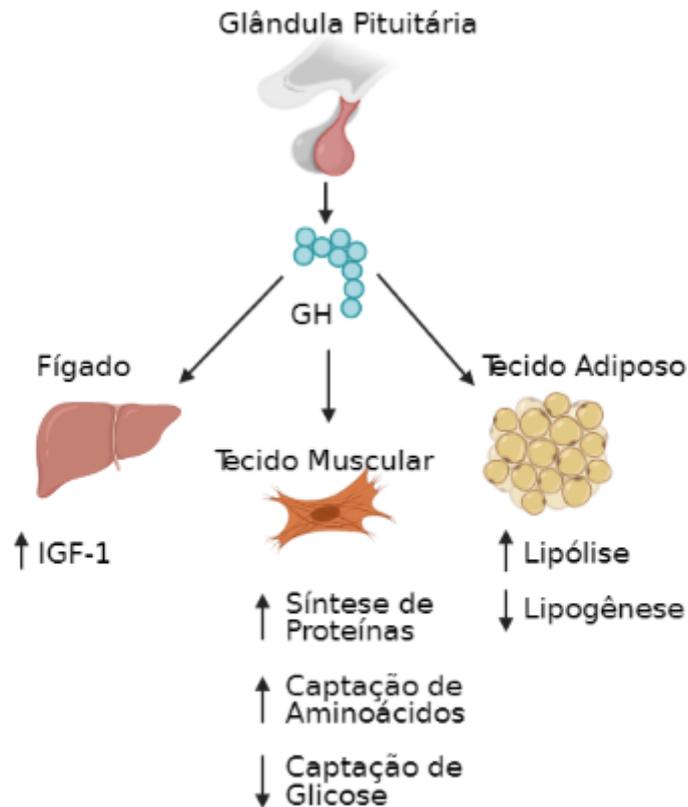


Figura 1: Esquema mostrando ações metabólicas induzidas pelo hormônio de crescimento em que as setas indicam aumento de processos e redução de processos biológicos. (Esquema criado pela autora com o auxílio do programa Bio Render).

O mecanismo molecular responsável por essas funções ainda não é totalmente compreendido, porém, existem três principais vias de sinalização mediadas pelo hormônio do crescimento conhecidas por regular tais efeitos nos organismos são elas: via Jak-STAT implica na expressão de múltiplos genes e na sobrevivência celular; via Ras-Mek/Erk responsável pelo processo de diferenciação e proliferação celular e a via Akt-PI3K que envolve a regulação do metabolismo (SÁNCHEZ-GURMACHES *et al.*, 2013).

A atuação dessa proteína inicia-se após sua ligação ao receptor do hormônio do crescimento (GHR) localizado na membrana celular (ROTWEIN, 2020). O GHR é um tipo de receptor tirosina-quinase, sua estrutura é de uma única passagem pela membrana, a região transmembranar é uma alfa hélice hidrofóbica, possui um domínio extracelular com um sítio de ligação ao ligante, na região citosólica apresenta um domínio com atividade de tirosina-quinase. Esses receptores quando inativos, são monoméricos, após ligação ao ligante tornam-se dímeros funcionais, esta dimerização leva a autofosforilação da

região citosólica do receptor, esta região é rica em prolina, esse aminoácido é essencial para a ligação da tirosina Janus quinase (Jak), principal ponto na etapa de estímulo inicial para ativação do receptor, após ativado, os resíduos fosforilados presentes no domínio citosólico do receptor são usados como locais para o acoplamento de proteínas e moléculas de sinalização recrutadas para o desencadeamento de cascatas de reações (WATERS, 2016).

Um dos principais efeitos do GH no metabolismo de proteínas ocorre por meio da estimulação de vias que resultam no aumento na síntese proteica desencadeada pela redução da degradação no organismo, a captação dos aminoácidos torna-se evidente após análise da excreção urinária, visto a contenção de nitrogênio no corpo (MOLLER *et al.*, 2007; GIBNEY *et al.*, 2007; NISHAD *et al.*, 2018).

Por sua diversa função biológica, bibliotecas de cDNAs de GH de vários animais foram construídas visando suas expressões objetivando o desenvolvimento de produtos biotecnológicos. Algumas dessas sequências são derivadas de humanos, ratos, suínos, bovinos, de galinhas e peixes (KIPNIS, 1997; GOEDEL *et al.*, 1979; SEEBURG *et al.*, 1977; SEEBURG *et al.*, 1983; LAMB *et al.*, 1988; MOMOTA *et al.*, 1988; PAZ & VAL., 2018).

Em 1992 foi publicado o relato do primeiro peixe transgênico, desenvolvido pela inserção em um ovo fertilizado de salmão do Atlântico, um transgene construído a partir do gene do hormônio de crescimento de uma espécie relacionada (*Chinook salmon*), mais tarde um dossiê do então salmão AquAdvantage® foi aberto com o FDA em 1995. Apesar das conclusões do FDA serem favoráveis, existem muitas discussões principalmente com oposição de organizações ativistas anti-OGM e anti-biotecnologia, as quais suscitam constantes discussões e resistência a aceitação de animais geneticamente modificados destinados ao consumo humano (Van Eenennaam & Muir 2011). Apesar dos avanços biotecnológicos, uma parcela dos consumidores ainda apresenta resistência a esses produtos geneticamente modificados, apesar de todos os extensos experimentos de interação celular, além de elementos de biossegurança adotados para conter esses animais incluindo locais de contenção física, biológica e ambiental.

Em vista disso, consideramos outras maneiras de utilização do GH de peixe que após expressão do GH pode-se definir o método de administração

do produto. Geralmente o GH é diluído em água destilada ou em soluções salinas e sua aplicação faz-se tradicionalmente via intramuscular ou intraperitoneal. Apesar da aplicação por injeção ser a mais usual, existem dois métodos alternativos mais favoráveis para a aplicação em larga escala: o uso do hormônio do crescimento como suplemento na alimentação, sendo que outra alternativa seria o hormônio diluído na água onde os peixes seriam mergulhados. Esses modos de administração dispensam a intensiva mão de obra e reduzem o estresse causado ao peixe. Na administração por imersão do animal em tanques contendo hormônio do crescimento dissolvido, a absorção pode ocorrer geralmente por tecidos como a pele, a boca, o intestino ou as brânquias (SCHULTE *et al.*, 1989). Em análises de absorção de pequenas partículas de antígenos, Smith (1982) sugeriu que a absorção ocorreu pela pele, intestino e pelas brânquias em maior quantidade. Fryer and Bern (1979) demonstraram por meio de estudos realizados com espécimes de salmão juvenil que as brânquias possuem sítios de ligação ao hormônio de crescimento (SMITH, 1982; FRYER & BERN, 1979; SCHULTE *et al.*, 1989; TATNER, 1987).

Apesar do intestino conter potentes enzimas proteolíticas parte de proteínas como pequenos peptídeos são absorvidos, esse conhecimento permite o desenvolvimento de técnicas para a administração oral de peptídeos que apesar de passarem pelo intestino ainda realizarão suas funções (MCLEAN *et al.*, 1999; MARTINEZ *et al.*, 2016).

Chen *et al.*, (2008) obtiveram sucesso no experimento em que um plasmídeo contendo o cDNA do hormônio (GH) crescimento dos peixes foi transferido para o protoplasto da microalga marinha *Nannochloropsis oculata* por eletroporação, após o que a microalga transgênica foi incubada com artêmia por 6 horas, da mesma forma como controle microalga do tipo selvagem (não transgênica) foi incubada com artêmia *Artemia nauplius*. Em seguida alimentou-se as larvas de tilápia com artêmia tratada com microalga. Com este experimento Chen e colaboradores obtiveram resultados estatisticamente significativos ($P < 0,05$) sugerindo que o GH produzido pela microalga influencia positivamente tanto no ganho do peso, quanto no aumento do comprimento do corpo do peixe, se comparado ao peixe que foi alimentado com artêmias incubadas com microalga selvagem (Chen *et al.*, 2008).

1.2 Expressão de proteínas em *Pichia pastoris*

Utilizando-se as técnicas moleculares têm-se realizado tentativas de otimização da produção em larga escala do hormônio de crescimento de tambaqui para viabilizar a suplementação de rações para uso na piscicultura com esse fator anabólico. Uma importante etapa nesse processo é a escolha do sistema de expressão, onde tem-se tornado popular a expressão realizada em leveduras, pois esse sistema mostra-se produtivo e eficiente (RABERT, 2013).

A expressão heteróloga utilizando-se a levedura *Komagataella phaffii* (originalmente chamada de como *Pichia pastoris*), tornou-se popular. Essa reclassificada no gênero *Komagataella* foi baseada em trabalhos de análises filogenéticas de 4 genes sequenciados. *P. pastoris* é uma levedura metilotrófica, pertencente a Classe Ascomycetes, são haploides e autofecundadas, apresentam linhagens auxotróficas como a GS115, para histidina, empregada como hospedeiras para vetores que contêm como marca de seleção o gene *HIS4*. Foi primeiramente isolada de exsudato (líquido orgânico) extraído por meio de danos ao tecido vegetal de uma árvore do gênero *Castanea*, família Fagaceae em 1920 (ÇELIK & ÇALIK, 2012; KURTZMAN, 2009; BETANCUR, 2017; GUILLIERMOND, 1920; CREGG *et al.*, 1985).

P. pastoris tem sido mais utilizada por possuir diversas vantagens em comparação a outros sistemas de expressão eucarióticos e procarióticos, como: 1. seu crescimento é rápido e possui capacidade de fermentar até altas densidades celulares, algo em torno de 100g/L de biomassa; 2. altos níveis de rendimento em meios com escassez de proteínas; 3. manipulação genética simples quando realizada com vetores de expressão bem caracterizados; 4. levedura não patogênica; 5. realização de processamentos pós-traducionais complexas como processamento e enovelamento de proteínas (permitindo sua configuração funcional), formação de ligações dissulfeto e glicosilação; 6. produção de proteínas endógenas e exógenas, sendo que as proteínas

secretadas são facilmente purificadas a partir do meio da cultura de crescimento (CREGG *et al.*, 2000; RABERT *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2007).

Além disso, *P. pastoris* é classificada como não patogênica nem toxigênica, estando aprovada pela FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, EUA) como suplementação para alimentação animal (FDA, 1993; CIOFALO *et al.*, 2006; BETANCUR, 2017).

1.3 Vetores de expressão

Comumente, após a determinação da cepa de trabalho, escolhe-se o vetor. Há inúmeros vetores comerciais que podem ser utilizados para a expressão do hormônio do crescimento em *P. pastoris* (Figura 2). A primeira geração de vetores de *P. pastoris* como o pPIC9 apresentava o gene funcional da histidina desidrogenase (*HIS4*) usado como marcador de seleção em cepas que possuem deficiência desse gene, logo a primeira geração de vetores foram inovados adicionando-se o gene de resistência a GS418 nomeando de vetor pPIC9K. Apesar da constante melhoria nos vetores eles apresentavam uma grande quantidade de pares de base algo entre 8 a 9,3 kb o que dificultava a integração ao cromossomo da levedura no processo de transformação genética *in vitro* (LI *et al.*, 2003).

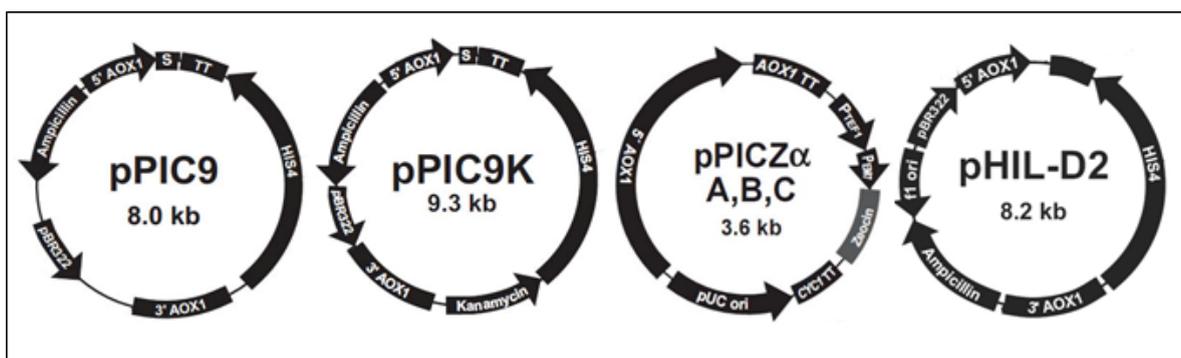


Figura 2: Mostra mapas físicos de vetores que se utilizam do promotor pAOX1. Vetor pPIC9 e pPIC9K são considerados defasados para expressão, sendo atualmente utilizados o vetor pPICZαA, B e C e o vetor pHIL-D2 para expressão de GH em leveduras. Adaptado de Invitrogen 2010 e 2014.

Atualmente, o uso dos vetores pPICZA, B e C tem sido mais recorrente para a expressão de hormônio do crescimento de peixes (WEI *et al.*, 2008; ROTHAN *et al.*, 2014; PORMEHR & POURKAZEMI, 2015). Esses vetores de expressão apresentam 3,3 kb, sua estrutura é composta de um fragmento 5' contendo: o promotor pAOX1 para expressão, fortemente regulada e induzida por metanol, do gene de interesse; gene de resistência Zeocin[™] para seleção em *Escherichia coli* e em *P. pastoris*; peptídeo C-terminal contendo as regiões codificadoras do epítipo c-myc e uma poli-histidina tag (6xHis) para detecção e purificação de proteína de fusão recombinante (INVITROGEN, 2010). Há também vetores de expressão intracelular, como pHIL-D2, que é um vetor integrativo de 8.209 pb de tamanho e que requer um códon ATG inicial em uma sequência de consenso Kozak para uma iniciação da tradução do gene de interesse. A seleção em *Pichia* se dá pelo gene *HIS4*, possui gene de resistência a ampicilina e contém o promotor de forte expressão pAOX1 (INVITROGEN, 2014).

Utiliza-se geralmente o vetor pPIC9 (Figura 3) para expressão e secreção de proteínas heterólogas nessa levedura. Este vetor possui 8023 pb, contém o promotor pAOX1, posterior à região promotora há uma sequência codificadora do peptídeo sinal de secreção (SADALLA-PINTO, 2012; SADALLA-PINTO, 2018).

Os genes *AOX1* e *AOX2* conferem às células alta capacidade de metabolização de metanol, dessa forma, a levedura recombinante possui crescimento acelerado em meio composto por metanol como fonte exclusiva de carbono permitindo que essa cepa possua um crescimento próximo ao da levedura em seu estado selvagem, dessa forma a levedura recombinante possui crescimento em meio contendo metanol como fonte exclusiva de carbono (INVITROGEN 2010).

Portanto, há a necessidade constante de adicionar metanol absoluto para a indução do promotor pAOX1, necessário para ocorrer a expressão gênica (SADALLA-PINTO, 2012; SADALLA-PINTO, 2018). Em 1879 foi apresentada a toxicidade do metanol em humanos, a partir desse acontecimento, estudos verificaram a capacidade do metanol de indução à acidose, toxicidade ocular e cerebral, efeitos esses decorrentes de um

metabólico do metanol, o ácido fórmico (BENNETT *et al.*, 1953; SHAHANGIAN *et al.*, 1986; KOSTIC *et al.*, 2003).

Considerando a toxicidade do indutor do promotor pAOX1, vetores que carregam outros promotores podem substituir o uso do pPIC9, como por exemplo vetores construídos com o promotor do gene de levedura que codifica a enzima glicolítica fosfoglicerato quinase (*PGK1*) para a expressão de proteínas heterólogas em leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae* e a *P. pastoris* (GRAHAM & CHAMBERS 1997).

Esse promotor apresenta expressão máxima em meio contendo glicose. Os vetores construídos com o promotor do gene *PGK1* são de expressão constitutiva e, em *S. cerevisiae*, estão baseados plasmídeos multicópias objetivando potencializar os níveis de expressão da sequência heteróloga de interesse, são considerados fortes e eficientes podendo produzir cerca de 30-40% de proteína celular total. Por outro lado, são relatadas a expressão de sequências heterólogas em baixos níveis nessa levedura utilizando esse promotor, como o gene estrutural HBsAg - proteína de superfície do vírus da hepatite B e o cDNA da quimosina de bezerro, a produção obtida foie de 1 a 5% da proteína total da célula respectivamente (HITZEMAN *et al.*, 1983; MELLOR *et al.*, 1983).

Apesar da possibilidade da expressão em baixos níveis, o vetor baseado no pPGK1 possui características desejáveis como a não utilização de metanol e expressão gênica em condições simples (ALMEIDA *et al.*, 2005; ASSUNÇÃO, 2015).

Posteriormente, a clonagem do gene *PGK1*, os primeiros vetores utilizando esse promotor foram produzidos, eram vetores de expressão básicos como o PGK-basQd, esses vetores além do gene *PGK1*, continham o alelo, origem de replicação e sequências do plasmídeo pBR322 de *E. coli*, esses primeiros vetores baseados no *PGK1* possuíam apenas um sítio de restrição para inclusão da sequência de DNA de interesse, comumente sítios das enzimas *BglII*, *BamHI* ou *EcoRI* (GRAHAM & CHAMBERS 1997). Atualmente, os vetores PGK possuem local de clonagem múltipla na qual abrange uma diversidade de locais de restrição comumente usados para clonagem, utilizando essas regiões, o DNA exógeno pode ser inseridos usando métodos

de clonagem padrão com DNA ligase ou outros métodos, como clonagem livres de ligase.

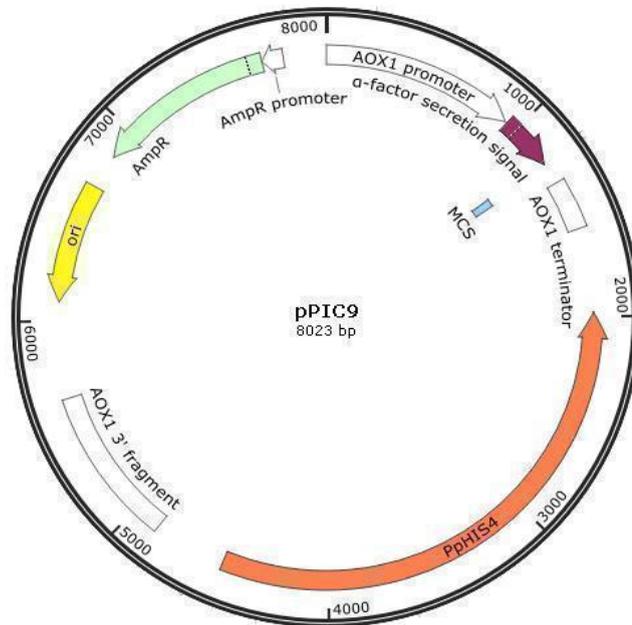


Figura 3. Mapa estrutural do vetor pPIC9, mostrando seus principais componentes. Desenho realizado com auxílio do programa Snapgene® versão 3.2.1 (2004-2019).

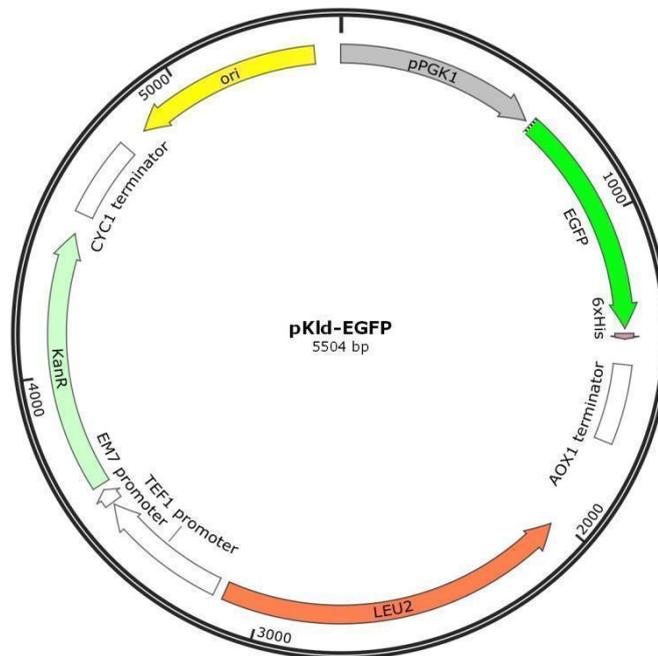


Figura 4. Mapa estrutural do vetor pKId-GFP, mostrando seus principais componentes. Desenho realizado com auxílio do programa Snapgene® versão 3.2.1 (2004-2019).

A possibilidade de utilizar o promotor pPGK1 (considerado de força média em *P. pastoris*) em um cassete de expressão com potencial de integração de um múltiplo número de cópias pelo sistema *leu2-d*, sistema esse desenvolvido baseado em LEU2 defeituoso para estímulo da integração multicópia, ou seja o alelo *leu2-d* de *S. cerevisiae* que apresenta 68% de identidade com o homólogo LEU2 de *P. pastoris* e deve reduzir as chances de recombinação homóloga no locus LEU2 interrompido na cepa M12 (Betancur *et al.*, 2017), esse sistema motivou o uso do vetor pKID-EGFP (Figura 4) nesse trabalho de expressão heteróloga intracelular de rtGH em *P. pastoris*.

1. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Expressão heteróloga intracelular do hormônio de crescimento de tabaqui na levedura *P. pastoris*.

2.2 Objetivos Específicos

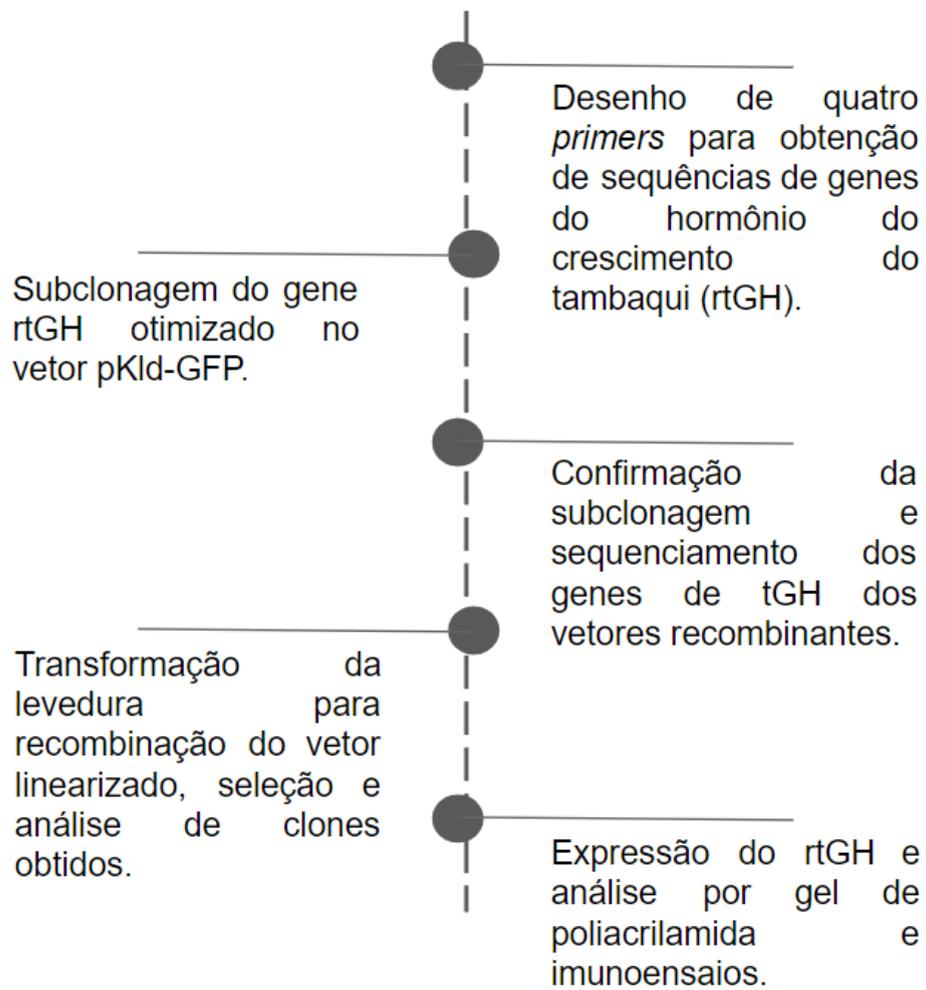
1. Inserção de sítios de enzimas de restrição e a maior parte da sequência consenso de Kozak de *S. cerevisiae* na sequência codificadora do rtGH;
2. Subclonagem da sequência e obtenção de dois vetores recombinantes pKId-rtGHe1 e pKId-rtGHe2;
3. Sequenciamento dos insertos clonados nos vetores e transformação genética de *P. pastoris*;
4. Seleção de clones transformantes da levedura por meio da técnica de PCR;
5. Identificação e confirmação da produção na levedura do rtGH.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estratégia experimental para a expressão endógena de rtGH em *Pichia pastoris*

Este trabalho foi desenvolvido conforme mostrado no esquema a seguir, baseado nas seguintes etapas:

- Desenho de quatro oligonucleotídeos para gerar por PCR duas estratégias sequências de genes do hormônio do crescimento do tabaqui (rtGH) com caudas carreadoras de sítios de enzimas de restrição e a sequência consenso downstream de Kozak.
- Subclonagem do gene rtGH otimizado no vetor pKId-GFP;
- Confirmação da subclonagem e sequenciamento dos genes de tGH dos vetores recombinantes pKId-rtGH;
- Transformação da levedura para recombinação do vetor linearizado ao genoma cromossomal da *P. pastoris*;
- Expressão e análise por gel de poliacrilamida e imunoenaios do hormônio produzido.



3.2 Hospedeiras

Linhagem de *Escherichia coli*: DH5 α

Genótipo:

fhuA2 Δ (*argF-lacZ*)U169 *phoA* *glnV44* Φ 80 Δ (*lacZ*)M15 *gyrA96* *recA1* *relA1* *endA1* *thi-1* *hsdR17*.

Antibióticos utilizados para seleção de plasmídeo (concentrações finais):

Ampicilina, 100 μ g/mL.

Kanamicina, 30 μ g/mL.

Geneticina (G418), 200 μ g/mL.

Pichia pastoris (M12): Uma linhagem mutante auxotrófica deficiente na biossíntese de leucina pela ruptura do gene *LEU2*, desenvolvida por Betancur (2014) e cedida gentilmente pelo Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres - UnB.

3.3 Meios de cultura

Para *Escherichia coli*:

Meio LB (Luria-Bertani)

Composição do meio:

Triptona - 1g

Extrato de Levedura - 0,5g

NaCl - 1g

Completar o volume para 100 mL

Meio LB Ágar (Luria-Bertani)

Composição do meio:

Meio LB (com adição de 1,5% de ágar bacteriológico)

*Meios esterilizados em autoclave a 120°C por 20 minutos.

Para *Pichia pastoris*

Meio YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium)

Composição do meio:

Extrato de levedura 10 g/L

Peptona 20 g/L

Glicose 2 %

Ágar 20 g/L

Meio de cultura MD (Minimal Dextrose Medium)

Composição do meio:

YNB com sulfato amônio 1,34 % (p/v)

Biotina 4×10^{-5} % (p/v)

Glicose 2 % (p/v)

Ágar 20 g/L (p/v)

*YNB com sulfato de amônio foram esterilizados em autoclave a 60°C por 20 minutos

** Glicose e ágar foram esterilizados em autoclave a 120°C por 20 minutos.

3.4 Soluções

10X YNB (Solução de Yeast Nitrogen Base)

Yeast Nitrogen Base (sem aminoácidos) 3,4 %

Sulfato de amônio 10 %

500X Biotina (0,02 %)

Para o preparo desta solução, 20 mg de biotina foi dissolvida em 100 mL de água destilada. A solução deverá ser esterilizada por filtração e estocada a 4 °C.

10X Glicerol (10 %)

Glicerol no volume de 5 mL de glicerol foi misturado a 900 mL de água e esterilizado em autoclave a 120°C por 20 minutos.

10X Glicose (20%)

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

Tampão fosfato 1M, pH 6,0 (100mL)

A quantidade de 13,2 de K_2HPO_4 foram combinados com 86,8 mL de KH_2PO_4 . O pH deve ser confirmado e ajustado, se necessário. Foi esterilizado em autoclave a 120°C por 20 minutos.

Tampão A: Tampão de extração

Tris-HCl 20mM pH 8.0, imidazol 5mM, NaCl 500mM, PMSF 1mM e Triton 1% X100.

Tampão TBS para lavagem: Tris 2,43 g NaCl 22,5g Tween-20 0,5 mL H₂O q.s.p 1000 mL pH ajustado para 7,5.

Tampão de bloqueio: BSA 3%(p/v).

Tampão de Transferência: 25 mM Tris, 192 mM glicina, 10% metanol.

Tampão PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ anidro, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,2-7,4.

3.5 Vetores utilizados

pUC-rtGH: Vetor gentilmente cedido pelos Doutores Elson Antonio Sadalla Pinto e Spartaco Astolfi Filho. Este vetor é derivado do pUC19 com a sequência do gene do hormônio de crescimento de tabaqui feito por síntese química para o desenvolvimento do trabalho de dissertação (Sadalla-Pinto, 2012), a sequência do cDNA do GH de tabaqui foi conseguida de uma biblioteca construída por Sousa (2009) a partir de isolados da hipófise e parte do cérebro do peixe.

pKId-GFP: Vetor gentilmente cedido pelo Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres- UnB, construído no trabalho de tese de Maritza Ocampo Betancur (2017) para a expressão intracelular de GFP contendo o alelo leu-2 como marca de seleção.

pKId-rtGHe1: Vetor recombinante construído neste trabalho para expressão intracelular de hormônio de tabaqui em *P. pastoris* com a marca de seleção alelo leu2-d preservada.

pKId-rtGHe2: Vetor recombinante construído neste trabalho para expressão intracelular de hormônio de tabaqui em *P. pastoris* com a marca de seleção alelo leu2-d preservada.

3.6 Oligonucleotídeos

Foram construídos dois vetores recombinantes utilizando oligonucleotídeos iniciadores para inserir as modificações pela técnica de PCR.

PRIMER E1f

```
5' GAC GGA TCC ATC GAA ACG ATG TCT GAG AAC CAA AGA TTG TTC AAC 3'
```

Este *primer* foi desenhado contendo sequência do sítio da enzima de restrição *Bam*HI e AAACGATG TCT, ou seja, a maior parte da sequência consenso Kozak de *S. cerevisiae* inserida com intuito de melhorar eficiência da tradução do hormônio proteico.

PRIMER E1r

```
5' GTC A GC GGC CGC TTA CAA AGT ACA GTT GGA GTC CAAG 3'
```

Utilizando este oligonucleotídeo o gene *rtGH* é amplificado e suas trincas que originariam a cauda de histidina é excluído por meio da adição de um stop códon e o sítio da enzima de restrição *Not*I antes da sequência de 6 histidinas (HIS₆).

PRIMER E2f

```
5' GAC GGA TCC ATC GAA ACG ATG TCT GAG AAC CAA AGA TTG TTC AAC 3'
```

Este oligonucleotídeo possui as mesmas características do oligo E1f.

PRIMER E2r

```
5' GAT CC G CGG CCG C CT ACTC 3'
```

Utilizando este oligo o gene rtGH é amplificado com uma cauda de histidina oriunda do gene contido no vetor pUC-rtGH, após a região de his-tag foi adicionado o stop códon e o sítio da enzima de restrição *NofI*.

Esses oligonucleotídeos foram utilizados para originar duas estratégias de clonagem do gene do hormônio do crescimento de tabaqui, o rtGHe1 contendo 570 pb e o rtGHe2 contendo 597 pb, contendo a região codificadora de HIS₆ na região 3' do gene. Após o processo de PCR, foram obtidos amplicons com sequências consenso de Kozak e sítios de enzimas de interesse proporcionando a subclonagem do gene no vetor de expressão.

PRIMER PGK-rtGH forward

5'CCACCACACCATCACTGTCA

3'

5'CCACCACACCATCACTGTCA 3'

PRIMER PGK-rtGH reverse

5' CAG TTG GAG CTT CGA TGG AG 3'

Estes *primers* foram desenhados para identificação por meio de PCR dos clones positivos transformantes de *P. pastoris*, a sequência amplificada apresentará um tamanho de 311 pb.

3.7 Preparo de hospedeiras de *E. coli* para transformação genética

A hospedeira *E. coli* da cepa DH5 α foi repicada em meio LB sólido sem antibiótico a partir de uma alíquota criopreservada. A cultura foi incubada em estufa a 37°C por 16 horas. Após a identificação de colônias isoladas, com palito estéril, uma colônia foi inoculada em 5 mL de meio LB em duplicata, esses pré-inóculos foram incubados sob a temperatura de 37 °C, a 180 rpm por 16 horas. Foi transferido 0,3 mL desse pré-inoculo para Erlenmeyer contendo 200 mL de meio LB também sem antibiótico e mantidas em crescimento, a leitura de OD (Densidade Óptica) do inóculo foi acompanhada até atingir a OD₆₀₀ de 0,5. As culturas de células foram centrifugadas sob 4.000 x *g* por 10 minutos a 4 °C, após o descarte do sobrenadante, os pellets foram gentilmente homogeneizados em 10 mL de CaCl₂ 100 mM e glicerol 10% estéril e gelado. Em seguida esse material ressuspensado foi submetido a uma nova centrifugação sob 4.000 x *g* por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante descartado e o sedimento celular gentilmente homogeneizado em 1 mL de CaCl₂ 100 mM com glicerol 10%. Essas células foram alíquotadas em microtubos (50 μ L/tubo) e armazenadas em freezer -80 °C.

3.7.1 Transformação da hospedeira com vetores de trabalho

Esse procedimento foi realizado com a finalidade de propagação/amplificação dos vetores utilizados no trabalho. Alíquotas de células competentes foram retiradas do ultrafreezer e mantidas em gelo por aproximadamente 30 minutos para degelar. Para a transformação adicionou-se 2 μ L de plasmídeo (10 ng/ μ L) diluído em H₂O milliQ em 50 μ L de células eletrocompetentes da cepa DH5 α . A mistura foi mantida em gelo por 20 minutos e posteriormente transferida para cubeta para o processo de eletroporação a 1900 volts sendo mantidas nessa voltagem por milissegundos para ocorrer o processo de abertura de poros na membrana celular da

hospedeira. Em seguida foram adicionados 500 µL de meio líquido Luria-Bertani LB (SAMBROOK *et al.*, 1989) e incubadas por 1 hora a 37 °C com agitação de 150 rpm. Então alíquotas de 50, 100 e 200µL foram semeadas em placas contendo o meio ágar LB com Canamicina (25mg/mL) para os sistemas de células transformadas com o vetor pKId-GFP e em placas contendo meio ágar LB com ampicilina (100 mg/mL) para o pUC-rtGH e mantidas a 37 °C overnight. Esse procedimento foi realizado tanto para sistemas de células eletrocompetentes contendo o vetor pUC-rtGH quanto para os sistemas de células eletrocompetentes contendo o vetor pKId-GFP.

3.7.2 Amplificação de rtGH por PCR

Após propagação e obtenção do vetor pUC-rtGH, foi realizada a técnica de PCR com a finalidade de se inserir no gene do hormônio de crescimento do tabaqui além da sequência consenso downstream de Kozak, sítios das enzimas *Bam*HI e *Not*I. Esta reação (tabela 1) foi feita em 25 ciclos com temperatura padronizada em 54 °C utilizando a enzima *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* da Invitrogen.

Tabela 1: Tabela evidenciando reagentes, concentrações e volumes usados na reação de PCR.

H ₂ O		13 uL
Tp10X		2,5 uL
MgCl 2	50 mM	1,5 uL
dNTPs	2,5 mM	2,5 uL
primer forward	5 pMol/uL	2,0 uL
primer reverse	5 pMol/uL	2,0 uL
Taq DNA polimerase	5U/uL	0,5 uL
DNA	50 pg/uL	1,0 uL
	Volume Final	25 uL

3.7.3 Digestão enzimática

Após propagação e obtenção do vetor pKId-GFP, foi realizada digestão enzimática simples e dupla tanto do vetor pKId-GFP, quanto dos amplicons rtGHe1 e rtGHe2 utilizando as enzimas *Bam*HI e *Not*I. A digestão do vetor resultou na liberação do fragmento da GFP e nos *amplicons*, a digestão originou extremidades *sticky ends*, favoráveis ao processo de ligação no vetor. Os sistemas de digestão mostrados na tabela 2 foram incubados a 37°C em banho seco por 2 horas.

Tabela 2: Dados dos sistemas de digestão realizados.

Sistema pKId-GFP (uL)		Sistema rtGHe1/ rtGHe2 (uL)		Controle (uL)	
H ₂ O	36	H ₂ O	36	H ₂ O	35
Tp 10X	5	Tp 10X	5	Tp 10X	5
DNA	4 (30,5 ng/uL)	DNA	4 (22,5 ng/uL)	DNA	10 (30,5 ng/uL)
<i>Not</i> I	2,5 (10 U/uL)	<i>Not</i> I	2,5 (10 U/uL)	-----	
<i>Bam</i> HI	2,5 (10 U/uL)	<i>Bam</i> HI	2,5 (10 U/uL)	-----	
Volume Final = 50		Volume Final = 50		Volume Final = 50	

3.7.4 Purificação do pKId e da sequência codificadora do rtGH

O fragmento de DNA (pKId) do sistema de digestão foi purificado em gel de agarose 1%, após separação dos fragmentos digeridos pelas enzimas *Bam*HI e *Not*I a banda que possuía o fragmento de interesse no gel foi cortada com auxílio de bisturi estéril e transferidas para microtubos de 1,5 mL previamente pesados e identificados. Os microtubos contendo as bandas de gel foram submetidos a banho seco sob temperatura de 60 °C até o gel se dissolver. Seguiu-se a purificação do material oriundo do sistema de digestão pKId-GFP e do sistema ErtGHe1/ ErtGHe2 por meio dos kits Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) e Illustra GFX PCR DNA. Após purificados, esses materiais foram quantificados em Nanodrop. Os dados obtidos foram: Amplicons 23,3 e 22,5 ng/μl; pKId 30,5 ng/μl.

3.8 Construção dos vetores recombinantes

3.8.1 Ligação

O sistema de ligação foi realizado usando-se uma proporção de 3 moléculas de inserto rtGHe1/ rtGHe2 para 1 de moléculas de vetor pKId sob uma temperatura de 16°C por 16 horas, na tabela 3 é evidenciada a composição do sistema.

Tabela 3: Composição do sistema de ligação.

Sistema de ligação	Volume
Vetor pKId- 200 ng/μL	6,5 μL
Inserto rtGHe1/ rtGHe2 - 63 ng/μL	3 μL
<i>T4 ligase</i> (200U/uL)	0,5 μL
Tp 10X	1,5 μL
H ₂ O	3,5 μL

Volume Final =	15 μ L
----------------	------------

3.8.2 Transformação de *Escherichia coli* com vetores recombinantes

Alíquotas eletrocompetentes degeladas de *E. coli* da linhagem DH5 α foram utilizadas para a transformação com o vetor recombinante pKId-rtGHe1 e pKId-rtGHe2, foram feitos três sistemas de transformação: no primeiro foi acrescentado 50 μ L de *E. coli* e 1,5 μ L pKId-rtGHe1; no segundo 50 μ L de *E. coli* e 1,5 μ L pKId-rtGHe2 e no terceiro microtubo substituiu-se o DNA por 1,5 μ L de água. Esses sistemas foram mantidos em gelo por 20 minutos, transferidos para cubetas e eletroporados a 1900 volts. Após o choque elétrico foi adicionado 500 μ L de meio LB em cada sistema e mantidos sob agitação a 37 °C por 1 hora para recuperação de vigor celular e expressão da marca de seleção dominante. Em seguida os sistemas foram semeados em alíquotas de 50, 100 e 200 μ L em placas previamente preparadas com meio LB sólido contendo kanamicina como antibiótico seletivo e mantidas invertidas *overnight* em incubadora a 37 °C.

3.8.3 PCR de colônia de *E. coli* transformadas

Foi realizada PCR direto de 30 colônias previamente selecionadas, 15 colônias oriundas da transformação com vetor pKId-rtGHe1 e 15 colônias da transformação com vetor pKId-rtGHe2 para confirmação da subclonagem no vetor de expressão. Uma parcela de cada colônia foi retirada com auxílio de palito estéril e inoculadas em tubos de 600 μ L contendo 10 μ L de água Milli-Q os tubos foram levados para banho seco por 10 minutos a 95 °C para o rompimento das células e liberação de seu material genético. Após a centrifugação a 12000 g por 5 min foram retirados 2 μ L dos sobrenadantes para serem usados como *templates* na amplificação.

Das colônias que amplificaram, foram selecionadas 18 colônias recombinantes e inoculadas em tubos contendo 5 mL de meio LB com

kanamicina (30 ug/mL) incubado em shaker a 37° C overnight para extração plasmidial.

3.8.4 Sequenciamento dos vetores recombinantes

Das colônias transformantes de *E. coli* com resultado positivo na PCR foram selecionadas 6 colônias para sequenciamento do vetor na plataforma Sanger (SANGER et al., 1977) as sequências foram analisadas por programa disponível no site [Electropherogram quality analysis](#).

3.8.5 Propagação e extração de pKId-rtGHe1 e pKId-rtGHe2

Na transformação genética feita em células eletrocompetentes de DH5 α , adicionou-se 2 μ L de plasmídeo (10 ng/ μ L) diluído em H₂O milliQ em 50 μ L de células eletrocompetentes degeladas da cepa DH5 α . Prosseguiu-se o protocolo padrão de transformação bacteriana já descrito. A extração plasmidial foi realizada por meio do kit Fast-n-Easy Plasmid-Prep Cellco, seguindo instruções do fabricante.

3.9 Preparo de *Pichia pastoris* eletrocompetentes

Células da hospedeira *P. pastoris* linhagem M12 foram crescidas em placas de Petri contendo meio YPD ágar por aproximadamente 48 horas, colônias isoladas foram selecionadas para pré-inóculo em Erlenmeyer de 120mL contendo 10 mL de YPD, a cultura foi incubada a 30 °C por 24 horas. Após 24 horas de incubação foi retirado 150 μ L do pré-inóculo adicionados a 200 mL do meio YPD em frascos Erlenmeyer de 1L e incubados a 30°C em agitador com 200 rpm com sucessivas leituras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm até atingir uma densidade ótica (O.D.) entre 1,3 e 1,5. Em seguida a cultura foi transferida para tubos Falcon de 50 mL as células foram coletadas por centrifugação a 4000 rpm durante 10 min a 4°C e ressuspensas em 30 mL de água deionizada esterilizada gelada. Uma segunda centrifugação foi realizada nas mesmas condições do passo anterior e

as células foram ressuspensas em 15 mL de água deionizada esterilizada e gelada. Outra centrifugação a 4000 rpm/ 10 min a 4°C foi feita e as células depositadas foram ressuspensas em 10 mL de sorbitol 1M gelado e novamente centrifugadas e ressuspensas em 1 mL de sorbitol gelado a 1M. Esse material foi aliqotado em um volume de 80 µL em microtubos e estocadas em freezer -80 para posterior utilização.

3.9.1 Transformação de *Pichia pastoris* com os vetores recombinantes

Para transformação das células eletrocompetentes de *P. pastoris* M12, os vetores pKId-rtGHe1 e pKId-rtGHe2 foram digeridos com a enzima *SacI* para linearização sob as seguintes condições: tampão NEB 1.1 1X, 10U de *SacI*, 10 µg de DNA em volume final de 20 µL para ambos os vetores, essa reação foi incubada a 37 °C por 2 horas. Após o resultado do sistema ser visualizado em gel de agarose (0.8%), esse material foi precipitado com glicogênio (2 ug/uL) e NaCl 3M e 2,5X do volume de etanol, passando por incubação por 4 horas a -80 °C, posteriormente o material foi centrifugado por 1 hora a 14000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com etanol 70% gelado, em seguida, com o pellet já seco, foi adicionado 10 uL de H₂O milliQ. Para a eletroporação foram utilizados 80 µL de células eletrocompetentes misturadas com 10 µg do DNA linearizado. O sistema de transformação foi transferido para uma cubeta de eletroporação de 2 mm previamente resfriada em gelo, em seguida foram submetidas à eletroporação com voltagem de 1500 milivolts em eletroporador. Imediatamente após as células foram ressuspensas em 1 mL de sorbitol 1M. Após a ressuspensão, as células foram transferidas para microtubos de 1,5 mL estéreis e volumes de 50 e 100 µL foram semeados em placas de Petri contendo meio MD (Minimal Dextrose) com ausência do aminoácido leucina, as placas foram incubadas a 30 °C por 72 horas para o aparecimento de colônias.

3.9.2 Seleção das leveduras transformantes

Nessa etapa, um número amostral de oito clones de *P. pastoris* transformadas com os vetores recombinantes pKId-rtGHe1 e pKId-rtGHe2, foram repicadas em placas de Petri contendo meio de crescimento MD e incubadas. As leveduras transformantes puderam ser facilmente identificadas por apresentarem a marca de seleção auxotrófica, nesta linhagem, o marcador é Leu-, as colônias crescidas em MD passaram por uma segunda seleção, elas foram repicadas em placas contendo meio MD e o antibiótico G418, visto que o pKId carrega para o cromossomo da levedura o gene de resistência ao G418. Após crescimento de colônias crescidas nesta segunda seleção foi realizado extração de DNA total seguindo protocolo adaptado (mostrado no apêndice). Com o DNA cromossomal extraído foi realizada reação PCR com os primers pPGK-GHf e pPGK-GHr (Figura 5 e 6), sendo que a obtenção dos produtos foi previamente simulada utilizando o software SnapGene ® versão 3.2.1. Com os resultados da PCR foi possível a identificação e seleção das colônias recombinantes. As colônias que amplificaram uma banda de 311 pb correspondente a parte do gene do promotor pPGK1 e parte do gene rtGH, inseridos no DNA cromossomal da levedura no processo de transformação foram inoculadas em frascos agitados a 150 rpm contendo meio YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% D-glucose).

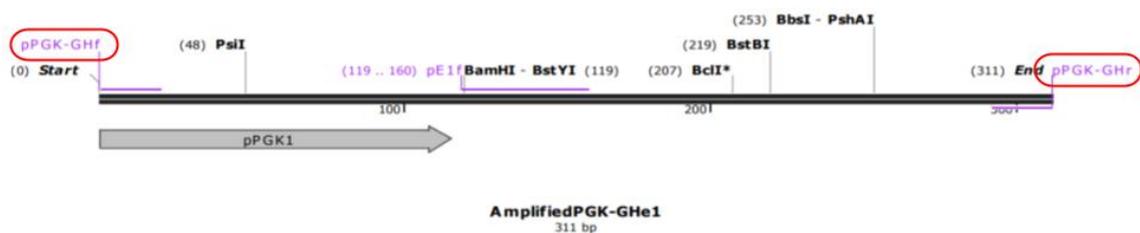


Figura 5: Simulação do produto de PCR esperado a partir do anelamento do *primer* pPGK-GH (circulado em vermelho) a região considerada a integração do vetor recombinante pKId-rtGHe1 ao cromossomo de *P. pastoris*. Desenho realizado com auxílio do programa Snapgene ® versão 3.2.1 (2004-2019).

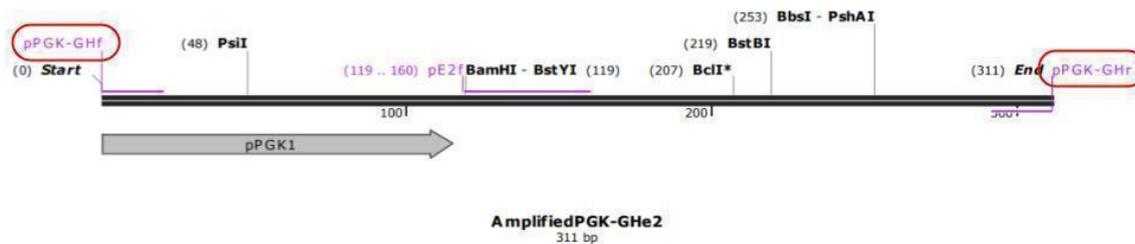


Figura 6: Simulação do produto de PCR esperado a partir do anelamento do *primer* pPGK-GH (circulado em vermelho) a região considerada a integração do vetor recombinante pKId-rtGHe2 ao cromossomo de *P. pastoris*. Desenho realizado com auxílio do programa Snapgene® versão 3.2.1 (2004-2019).

3.9.3 Crescimento e expressão do rtGH em frascos agitados

Foi feito pré-inóculo de uma colônia de levedura transformada com o vetor pKId-rtGHe1 e uma transformada com o pKId-rtGH2, cada colônia foi inoculada em 5 mL de meio YPD e incubadas a 30°C sob agitação de 200 rpm por 16 horas. Após as 16h de crescimento 300 µL dessa cultura foi transferida para Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio YPD que foram incubadas a 30° sob agitação de 200 rpm. Decorridas 24h de crescimento, alíquotas foram retiradas para leitura de absorbância a OD600nm, quando lâminas frescas das culturas foram feitas para verificação de eventual contaminação e morfologia celular, em seguida foi adicionado de 1,3 mL de glicose 20% (m/v). Esses passos foram repetidos após 48h de crescimento, após se completar 52 h alíquotas dessas culturas foram transferidas para microtubos de 2 mL e centrifugadas a 12000 g por 5 minutos e os *pellets* foram estocados em freezer a -80 °C para posterior análise.

3.9.4 Rendimento de biomassa celular

A cinética de crescimento microbiano foi avaliada através dos parâmetros de rendimento em biomassa (Y_x/s) durante cultivo em quimiostato em meio YPD considerando glicose como substrato. Durante o crescimento foram tomadas amostras para determinação da densidade óptica em

espectrofotômetro e determinação do peso celular. O consumo de glicose ao longo tempo foi acompanhado aplicando o método glicose oxidase que determina a concentração de glicose no meio. De posse destes dados foi possível determinar a taxa específica de crescimento (μ), o rendimento de biomassa ($Y_{x/s}$) e o tempo de geração (t).

3.9.5 Análise da expressão endógena do rtGH em *Pichia pastoris*

A análise da expressão foi realizada a partir do sistema SDS-PAGE, o pellet foi preparado a partir de 2 mL de cultura e ressuspendido em 200 μ L de tampão de extração (Tp.A), após ressuspensão foram realizados 3 ciclos de ultrassom (potência 70) de 2 minutos cada com intervalos de 30 segundos entre cada pulso. Após a sonicação, as amostras foram centrifugadas sob a seguinte condição: 40 minutos a 12000 rpm em 4°C. Posterior a centrifugação as duas frações da amostra foram separadas e reservadas, a insolúvel (pellet) foi ressuspensa em (Tp.A) no mesmo volume obtido na fração solúvel (sobrenadante), ambas as amostras foram analisadas em gel de poliácridamida, em microtubos previamente identificados foram separados 40 μ L de cada amostra e adicionado 10 μ L de tampão de amostra 5X contendo beta mercaptoetanol, a seguir essas amostras foram fervidas por 5 min/ 100°C e aplicadas no gel de SDS-PAGE.

3.9.6 Detecção do rtGH por *Dot Blotting*

As amostras de proteínas contendo foram pipetadas na membrana de nitrocelulose 0,45 Amersham Hybond membranes. Após secagem, a membrana foi bloqueada com BSA 3% em TBS durante 1 hora, sob agitação, à temperatura ambiente. A membrana foi lavada com TBST durante 5 minutos esse procedimento foi repetido por 3 vezes. Em seguida, a membrana foi incubada por 1 hora com o anticorpo monoclonal HisTag produzido em camundongo (diluído 1:5000 em TBS/BSA 1%). A membrana foi lavada com TBST durante 5 minutos e esse procedimento foi repetido por 3 vezes. Nessa etapa a membrana foi incubada por 1 hora com o anticorpo secundário (peroxidase ou fosfatas leite desnatado a 5% em TBST e incubada durante 1

hora. A membrana foi novamente lavada com TBST durante 5 minutos e procedimento repetido por 3 vezes, para finalizar a membrana foi incubada na solução de revelação.

3.9.7 Western Blotting

Para este experimento, a placa de cerâmica da INVITROGEN - *semidry* foi previamente umedecida com tampão de transferência 1x. Após a eletroforese, os papéis filtro, a membrana e o gel foram incubados por aproximadamente 2 minutos, o procedimento de transferência foi realizado utilizando uma voltagem fixa de 20 V, 700 mA, 150 W por 90 minutos, ao final deste procedimento a membrana foi incubada em solução bloqueadora, composta por: PBS e leite desnatado 5% por 1 hora, decorrido o tempo, incubou-se com o anticorpo primário 1:1000 (PBS + leite desnatado 5% + 0.05% Tween 20) durante 1 hora sob agitação à temperatura ambiente.

Após, a membrana foi lavada 3x com (PBS + 0.05% Tween 20) cada lavagem teve duração de 5 minutos. Em seguida a membrana foi incubada por 30 minutos com anticorpo secundário, sob agitação à temperatura ambiente, o procedimento de lavagem foi realizado novamente. Em seguida foi realizada a revelação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Propagação e extração de pKId-GFP e pUC-rtGH

Na figura 7 a seguir é possível observar o resultado da extração dos vetores de interesse pKId-GFP e pUC-rtGH realizado após extração, o perfil eletroforético evidenciou integridade do material, o que possibilitou a estimativa em ng/uL do material genético para prosseguir com a etapa de digestão enzimática do pKId-GFP para a excisão do gene GFP utilizando as enzimas *BamHI* e *NotI* e o procedimento de PCR para o pUC-rtGH com os pares de oligonucleotídeos (pE1f:pE1r e pE2f:pE2r).

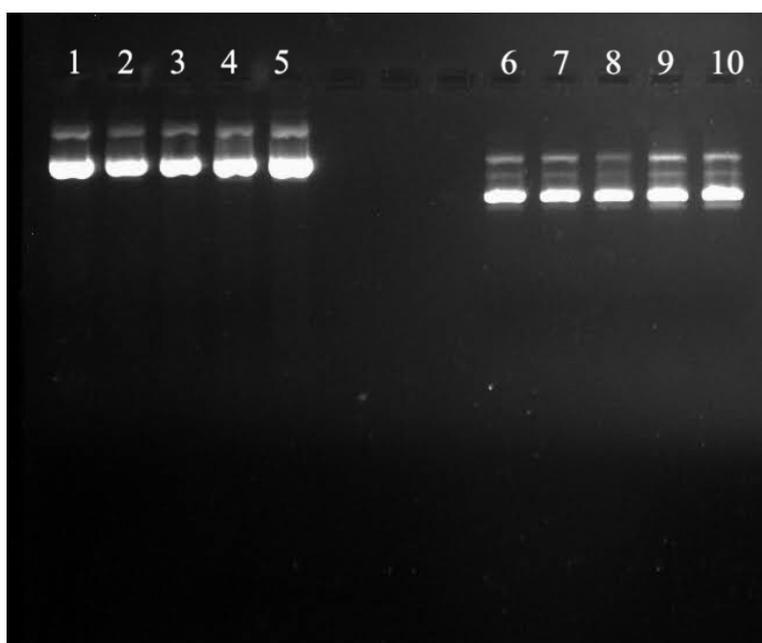


Figura 7: Análise eletroforética em gel de agarose 0.8% dos plasmídeos recombinantes. Canaleta (poços) 1-5: pKId-GFP: canaletas 6-10: pUC-GH.

4.2 Isolamento do gene rtGH por PCR

A partir da purificação do plasmídeo pUC-rtGH foi possível realizar a técnica de reação de polimerase em cadeia PCR para isolamento do gene rtGH. Na (Figura 8) são visualizados os amplicons obtidos por meio de PCR do pUC-rtGH utilizando os oligonucleotídeos pE1f e pE1r que amplificam 570 pb e os oligonucleotídeos pE2f e pE2r amplificam 597 pb originando os amplicons rtGHe1 e rtGHe2 com tamanho em pares de base esperado, esses amplicons possuem a sequência consenso de Kozak e extremidades *stick end* ao vetor pKId cujo gene da GFP foi excisado. A sequência ATG TCT foi adicionada no início do gene rtGH visto que esta é reconhecida como sendo a sequência consenso de Kozak das leveduras e é reportada em *P. pastoris* (HAMILTON *et al.*, 1987).

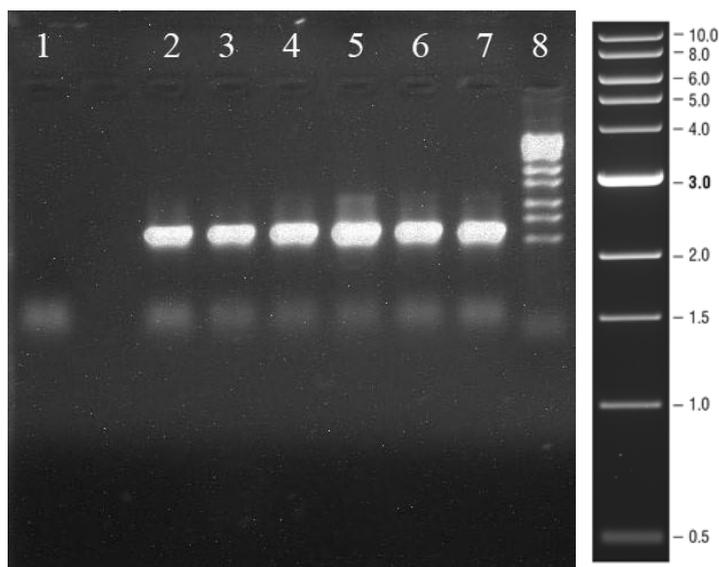


Figura 8: Análise eletroforética em gel de agarose 0.8%. Poço 1 - controle da PCR sem DNA; Poço 2, 3 e 4 - amplicons de rtGHe1 com 570 pb; Poço 5, 6 e 7 - amplicons de rtGHe2 com 597 pb; Poço 8 - marcador de massa molecular 1kb DNA Ladder NEB.

A sequência de Kozak pode gerar um impacto de 2 a 3 vezes na eficiência de iniciação da tradução no sistema de expressão heteróloga em levedura (INVITROGEN, 2010), com isso é esperado um impacto positivo na expressão do hormônio do crescimento de tabaqui. Diferentes organismos eucariotos superiores e inferiores podem possuir variações de número e tipos de nucleotídeos da sequência consenso de Kozak, porém essas sequências

são bem preservadas e quando há uma mutação, esta pode afetar positiva ou negativamente o início da tradução (KOZAK, 1986; LI et al., 2017).

4.3 Análise de restrição do vetor pKId-GFP

A digestão enzimática gerou extremidades coesivas nos sítios das enzimas *BamHI* e *NotI*, possibilitando a ligação do tipo *sticky ends* entre o vetor pKId e os amplicons do gene rtGH (Figura 9), porém para fins de confirmação e segurança o vetor foi digerido com três enzimas, nas digestões simples com *BamHI*, *NotI* e *EcoRI* o vetor pKId-GFP foi linearizado, a digestão dupla com as enzimas *BamHI* e *NotI* leva a excisão do gene da GFP de 735 pb, a dupla digestão com *EcoRI* e *NotI* resulta na liberação de um fragmento de 1115 pb referente ao poço 7 na figura 9 onde é possível observar os resultados dessa análise.

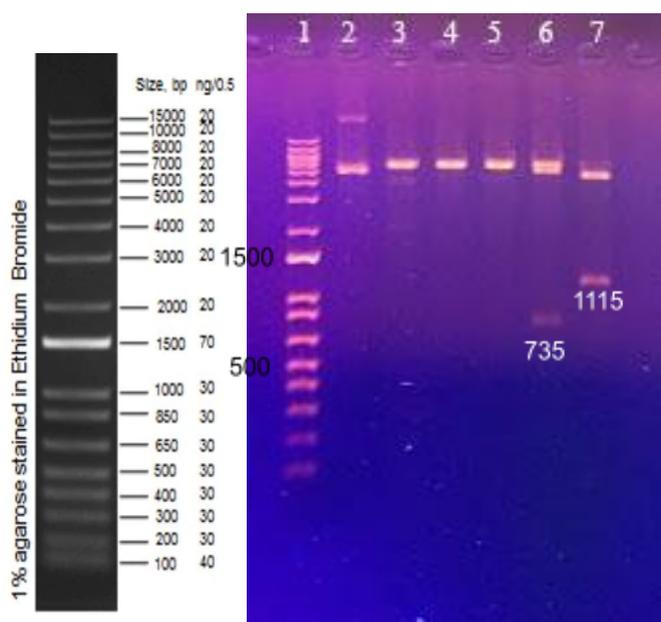


Figura 9: Análise eletroforética dos produtos de digestão do pKId-GFP em gel de agarose 0.8%. Poço 1- Marcador de massa molecular Invitrogen 1 Kb Plus DNA Ladder; Poço 2 - Controle sem enzima; Poço 3 - sistema de digestão simples com *BamHI*; Poço 4 - sistema de digestão simples com *EcoRI*; Poço 5 - sistema de digestão simples com *NotI*; Poço 6 - sistema de digestão dupla com *BamHI* e *NotI*; Poço 7 - sistema de digestão dupla com *EcoRI* e *NotI*.

4.4 Análises de restrição dos vetores recombinantes

Os vetores recombinantes pKId-rtGHe1 e pKId-rtGHe2 foram digeridos para a confirmação de sua construção e consequente ligação da região estrutural do gene tGH ao vetor de expressão. A digestão enzimática realizada com três enzimas *Bam*HI, *Not*I e *Eco*RI possibilitou as análises de restrição. A digestão simples do pKId-rtGHe1 com *Bam*HI foi aparentemente parcial, já com as enzimas *Eco*RI e *Not*I houve linearização total do vetor. Nos resultados de dupla digestão obteve-se as bandas esperadas de aproximadamente 570 pb na digestão com *Bam*HI e *Not*I e 1115 pb na dupla digestão com *Eco*RI e *Not*I. A digestão simples do pKId-rtGH2 com *Bam*HI também foi considerada parcial, já com as enzimas *Eco*RI e *Not*I obteve-se linearização total do vetor. As duplas digestões de *Bam*HI e *Not*I originaram uma banda de aproximadamente 580 pb e 1115 pb para a digestão com *Eco*RI e *Not*I como esperado e pode ser visualizada na Figura 10.

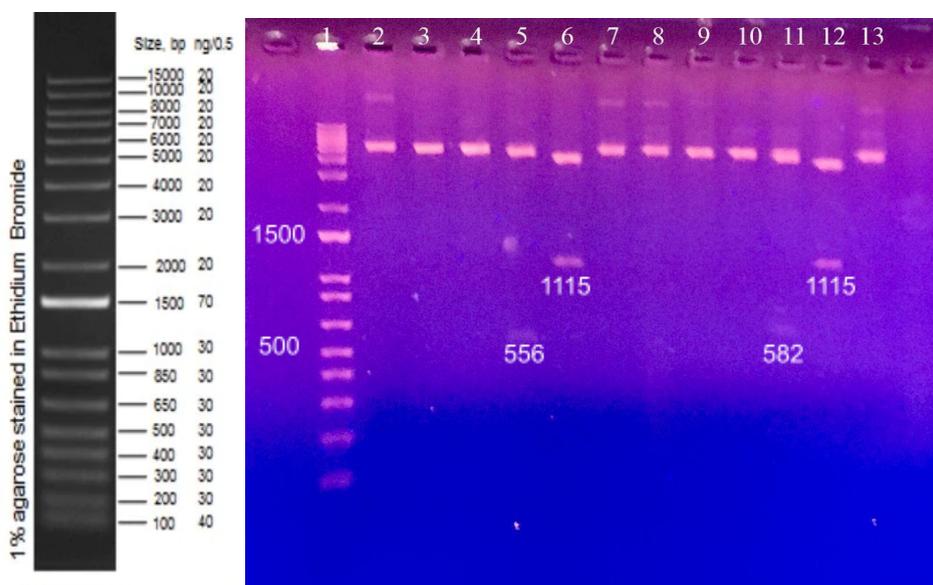


Figura 10: Análise de eletroforese em gel de agarose 0.8%. Poço 1- marcador molecular Invitrogen 1 Kb Plus DNA Ladder; Poço 2 - digestão simples de pKId-rtGHe1 com *Bam*HI; Poço 3 - digestão simples de pKId-rtGHe1 com *Eco*RI; Poço 4 - digestão simples de pKId-rtGHe1 com *Not*I; Poço 5 - dupla digestão de pKId-rtGHe1 com *Bam*HI e *Not*I; Poço 6 - dupla digestão de pKId-rtGHe1 com *Eco*RI e *Not*I; Poço 7 - controle de pKId-rtGHe1 sem enzima; Poço 8 - digestão simples de pKId-rtGHe2 com *Bam*HI; Poço 9 - digestão simples de pKId-rtGHe2 com *Eco*RI; Poço 10 - digestão simples de pKId-rtGHe2 com *Not*I; Poço 11 - dupla digestão de pKId-rtGHe2 *Bam*HI e

NotI; Poço 12 - dupla digestão de pKId-rtGHe2 com *EcoRI* e *NotI*; Poço 13 - controle de pKId-rtGHe2 sem enzima.

4.5 PCR de colônia

Após transformação de *E. coli* DH5 α com os vetores recombinantes pKId-rtGHe1 (sem cauda de histidina) e pKId-rtGHe2 (com cauda de histidina C-terminal), 14 clones de cada estratégia (totalizando 28) foram selecionados para realização de PCR de colônia verificando a clonagem do gene do hormônio de crescimento de tabaqui utilizando os pares de primers: pE1f-pE1r e pE2f e pE2r. Dos 14 clones transformados com o vetor pKId-rtGHe1 (Figura 11) selecionados em 10 houve amplificação do gene do rtGHe1 e os outros 4 (amostras 7, 9, 11 e 13) não amplificaram e dos 14 clones transformados com o vetor pKId-rtGHe2 (Figura 12) 12 amplificaram o gene rtGHe2 e nos outros 2 (amostras 9 e 13) não identificou-se amplificação.

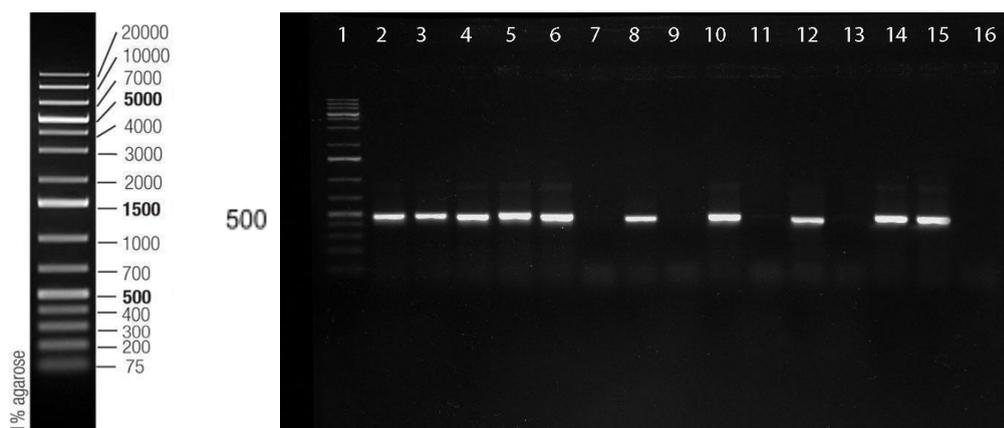


Figura 11: Análise do perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% mostrando ampliações de PCR realizadas direto de colônias. Poço 1 - marcador molecular GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; Poços 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15 - clones transformados com o vetor recombinantes pKId-rtGHe1 selecionados; Poço 16 - controle sem DNA.

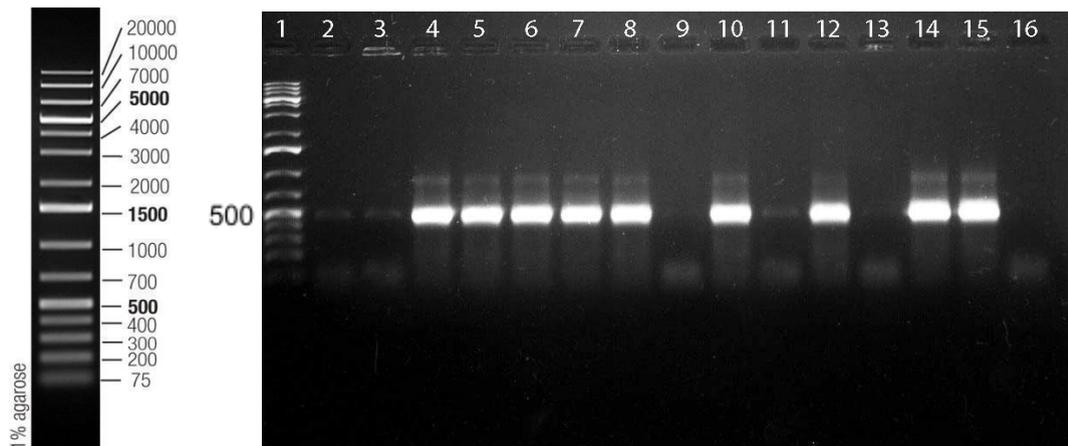


Figura 12: Perfil eletroforético de gel de agarose 0.8% evidenciando resultados de amplificação de PCR de colônia. Poço 1 - marcador molecular GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; Poços 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15 - clones transformados com o vetor recombinante pKId-rtGHe2 selecionados; Poço 16 branco.

4.6 Seleção das leveduras recombinantes

Após a transformação de *P. pastoris* linhagem M12 (*leu2*) por eletroporação (HIGGINS & CREGG 1998) obteve-se colônias após 72 h, apesar de que geralmente as colônias dessa levedura começam a aparecer a partir de 48 h (RUBINI, 2009) entendeu-se que a demora no crescimento das colônias seria devido ao fato de se tratar de uma linhagem defectiva para o gene da leucina, considera-se que o número de cópias integrados no cromossomo da levedura no processo de transformação e recombinação por homologia está relacionado a estabilidade, crescimento e eficiência das leveduras transformantes (BETANCUR, 2017; BETANCUR *et al.*, 2017; MARX *et al.*, 2009).

Foi realizada dupla seleção das leveduras transformantes, primeiro crescendo os clones em meio mínimo MD com ausência do aminoácido leucina. As colônias crescidas em MD foram repicadas em forma de grid em placas contendo MD e antibiótico G418, forçando as transformantes a produzir leucina e a degradar o antibiótico, superando as duas pressões, para poder sobreviver e crescer na placa em que foram semeadas, como se observa na figura 13.

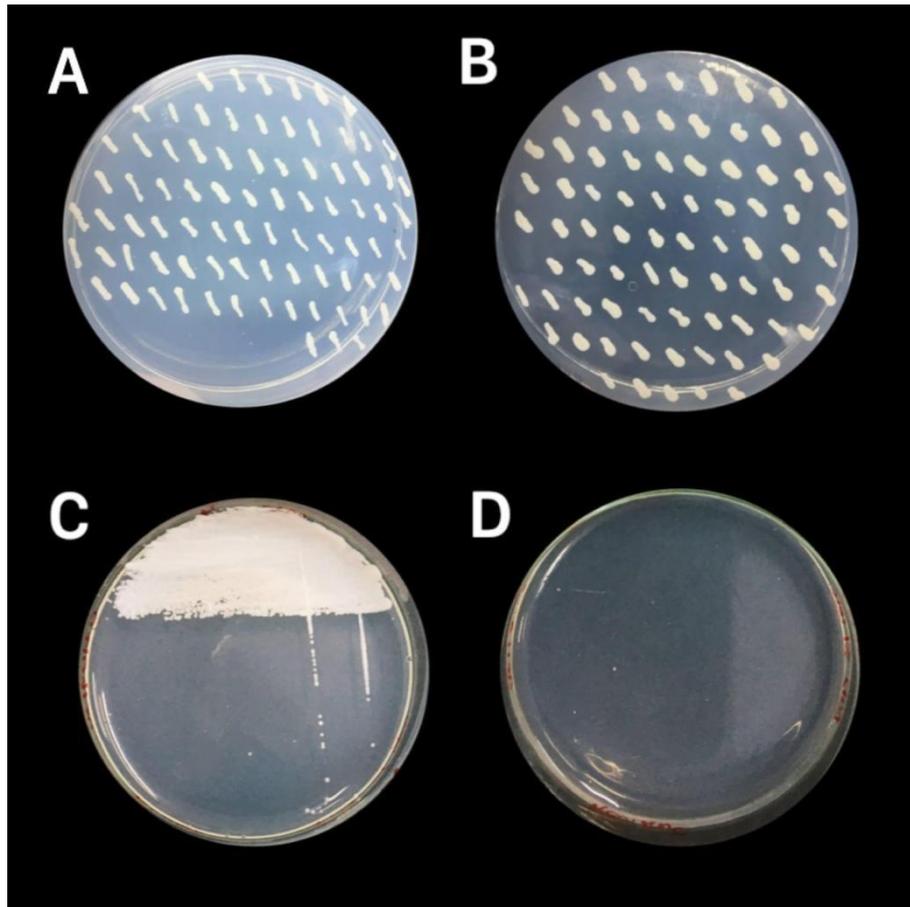


Figura 13: Análise de seleção dos clones de *P. pastoris* recombinantes. (A) Placa de Petri contendo grid de *Pichia pastoris* M12 transformadas com o vetor pKId-rtGHe1 cultivadas em meio MD com antibiótico G418; (B) Placa de Petri contendo grid de *Pichia pastoris* M12 transformadas com o vetor pKId-rtGHe2 cultivadas em meio MD com antibiótico G418; (C) Placa de Petri contendo M12 cultivada em meio MD com leucina; (D) Placa de Petri com meio MD sem leucina, M12 não cresceu.

4.7 Extração do DNA cromossomal de levedura

Foram extraídos o DNA cromossomal de oito clones da levedura *P. pastoris* M12 transformados com os vetores recombinantes (Figura 14), após extração, a integração do vetor recombinante ao cromossomo foi confirmada por meio de PCR (Figura 15) utilizando os oligonucleotídeos pPGK-rtGH *forward* e *reverse*.



Figura 14: Perfil eletroforético do DNA total das leveduras recombinantes em gel de agarose 0.8%. Poço 1 - DNA cromossomal da hospedeira M12 não transformada; Poço 2 DNA cromossomal da M12 transformada com pKId-GFP; Poço 3, 4 e 5 - DNA cromossomal de clones de M12 transformados com o vetor recombinante pKId-rtGHe1; Poço 6, 7 e 8 - DNA cromossomal da M12 transformada com pKId-rtGHe2.

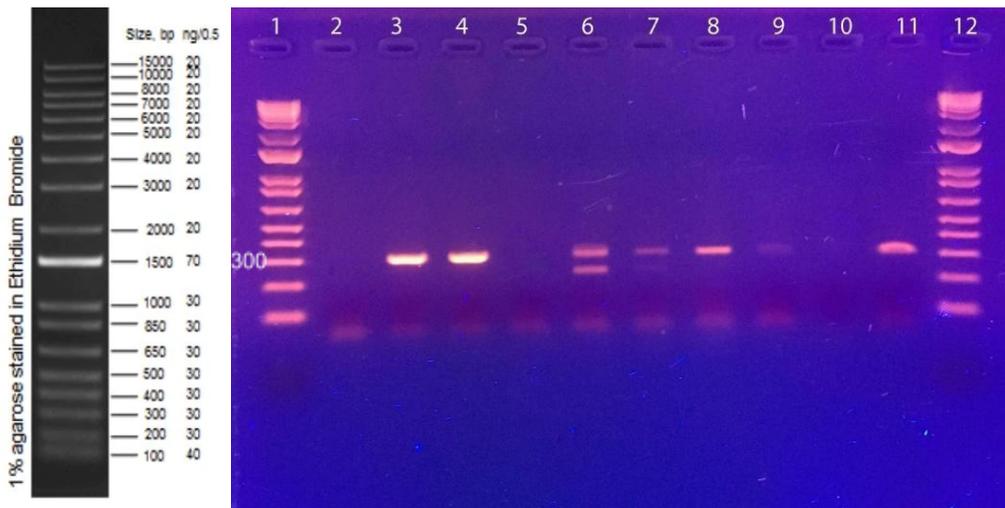


Figura 15: Perfil eletroforético de gel de agarose 0.8% mostrando produtos de PCR obtidos a partir do DNA extraído da levedura M12 utilizando os primers pPGK-GHf e pPGK-GHr. Poço 1 - marcador molecular Invitrogen 1 Kb Plus DNA Ladder; Poço 2 - controle sem DNA; Poço 3 - controle positivo vetor pKId-rtGHe1 amplificado com o primer pPGK-GH; Poço 4 - controle positivo vetor pKId-rtGHe2 + pPGK-GH; Poço 5 - PCR com PGK-GH utilizando o DNA cromossomal 30ng da M12 vazia; Poços 6, 7 e 8 - PCR utilizando o DNA cromossomal 30ng da M12 transformada com pKId-rtGHe1 colônia 1, colônia 2 e colônia 3; Poços 9, 10 e 11 - PCR utilizando o DNA cromossomal 30ng da M12 transformada com pKId-rtGHe2 colônia 4, colônia 5 e colônia 6; Poço 12 - marcador molecular.

4.8 – Crescimento celular e rendimento de biomassa

Na figura 16 em que é apresentado o gráfico do crescimento das culturas celulares é possível notar que não há uma diferença significativa entre as três culturas, apenas no tempo 48h a levedura transformada com o vetor pKId-rtGHe2 apresenta um leve aumento na densidade óptica se comparada às demais, porém, após esse intervalo de tempo, ambas apresentam ODs semelhantes. Quanto à adição de glicose no meio, a quantidade utilizada não demonstrou influência significativa no crescimento da levedura, porém a adição pode ter relação com o resultado obtido no método de Bradford.

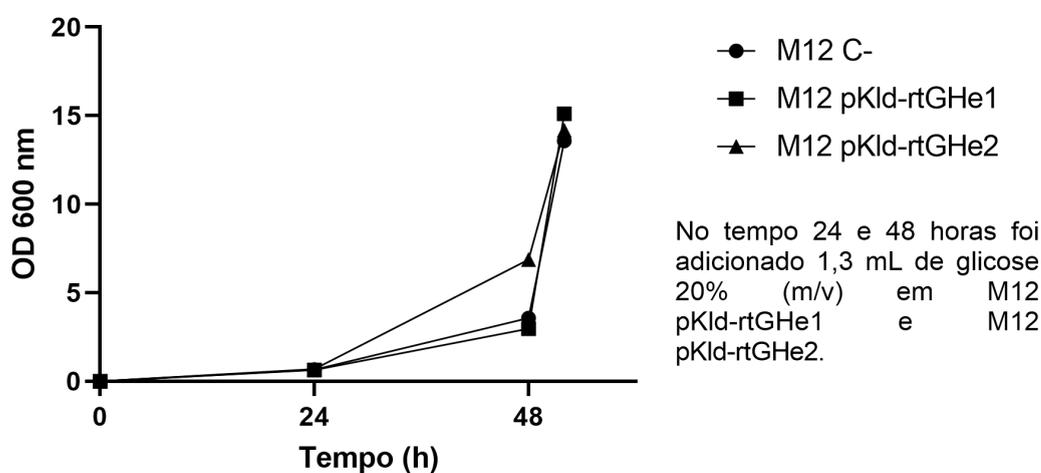


Figura 16: Gráfico da cinética do crescimento de clones de *Pichia pastoris* M12 transformada com os vetores pKId-rtGHe1 e pKId-rtGHe2, cultivadas em meio YPD, M12 C- corresponde ao controle negativo (levedura não transformada com vetor). Gráfico realizado com auxílio do programa GraphPad Prism® versão 9.1.10 (2021).

As proteínas totais foram obtidas pelo rompimento de 100 uL das células de levedura. Neste experimento, foram utilizados 2 clones recombinantes de *P. pastoris*/tGH e da hospedeira M12. As quantificações de proteínas foram realizadas empregando o método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão para estabelecimento de uma curva padrão de concentração de proteínas.

As colônias 3 e 6 da levedura M12 foram utilizadas para esta quantificação, a M12 não transformada seguiu como padrão a ser comparado com os resultados obtidos nos clones transformados com o gene rtGH, os resultados obtidos encontra-se na tabela 4, em que é possível observar que as

colônias recombinantes possuem cerca do dobro de proteínas totais em mg/mL se comparadas com a levedura M12 não transformada.

Tabela 4: Valores de proteínas totais obtidos em espectrofotômetro utilizando o método de Bradford.

	Abs1	Abs2	Média	mg/mL
E1	0,339	0,366	0,353	10,44
E2	0,425	0,432	0,428	12,70
M12	0,172	0,161	0,166	4,93

4.9 Análise da expressão endógena do rtGH em *Pichia pastoris*

As colônias 3 e 6 que foram positivas para PCR com o par de *primer* pPGK-GH foram selecionadas para análise de suas proteínas por SDS-PAGE (Figura 17) da expressão intracelular do hormônio do crescimento recombinante do tabaqui em *P. pastoris*. Nas colônias recombinantes pode-se visualizar uma banda de aproximadamente 22 kDa, que corresponderia a massa molecular esperada do GH (RANKE et al., 2018), porém como a levedura tem milhares de proteínas, somente por esse gel não é possível de confirmar ser a proteína o rtGH. Além disso não foi possível identificar a proteína GFP pela sua fluorescência na fração solúvel, quando a amostra foi aplicada no gel sem ferver antes, isso indica que se houve expressão da proteína controle ela ocorreu em baixos níveis, ou a GFP ficou na fração insolúvel. A baixa expressão da GFP no controle negativo também foi verificada, irradiando-se a cultura com luz negra e também observando o gel em transluminador (filtro 300 nm).

Em alguns estudos de expressão de hormônio de crescimento recombinante é visualizada uma banda de 23 kDa, isso pode acontecer em decorrência de possível glicosilação da proteína no decorrer de processamentos pós-traducionais na via secretória, em um trabalho realizado

por Sekine e colaboradores (1985), foram identificadas dois potenciais sítios de N-glicosilação (Asn-Xaa-Ser ou Asn-Xaa-Thr) na estrutura do hormônio do crescimento do salmão (*Oncorhynchus keta*), no entanto sabe-se que a presença dessas sequências é uma condição necessária, mas não suficiente para a glicosilação na estrutura do hormônio de crescimento (SADALLA-PINTO 2012), apesar de não ter sido observada alteração significativa em relação a kDa do rtGH expresso neste estudo, sabe-se que esses sítios potenciais de glicosilação estão presentes na sequência de aminoácidos do tGH.

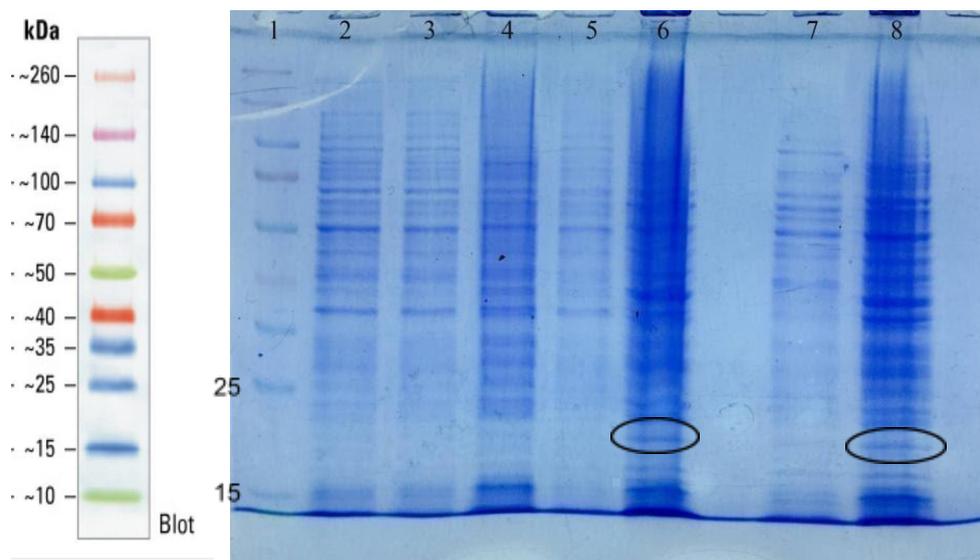


Figura 17: Análise eletroforética de proteínas em gel SDS-PAGE 15% corado com cromassie Poço 1 - marcador molecular Thermo Fisher Spectro-multicolor Broad Range Protein Ladder; Poço 2 - M12 transformada com pKId-GFP controle negativo fração solúvel não fervida; Poço 3 - M12 transformada com pKId-GFP controle negativo fração solúvel fervida; Poço 4 - M12 transformada com pKId-GFP controle negativo fração insolúvel; Poço 5 - M12 transformada com vetor pKId-rtGHe1 fração solúvel fervida; Poço 6 - M12 transformada com vetor pKId-rtGHe1 fração insolúvel fervida; Poço 7 - M12 transformada com vetor pKId-rtGHe2 fração solúvel fervida; Poço 8 - M12 transformada com vetor pKId-rtGHe2 fração insolúvel fervida.

4.10 Análise da Expressão do rtGH por *Dot blotting*

Ensaio imunoenzimático são sistemas de detecção/ mensuração de anticorpos ou antígenos em fluidos biológicos utilizando atividade enzimática como amplificação/repórter de reação (BASTOS, 2015), ocorrendo a mudança

de coloração indicando os resultados positivos devido à ação da enzima sobre o substrato cromogênico.

Para confirmar se a *P. pastoris* transformada com o vetor pKId-rtGH produz o hormônio do crescimento utilizou-se do método de imunodot com anticorpos anti- HIS₆ (Figura 18). Como controle positivo foi utilizada a proteína N (N cov 1) do vírus SARS CoV 2 em diferentes concentrações e quantidades, de 1 uL, 2 uL, 3 uL, 4 uL e 5 uL, observa-se que a quantidade de 3 uL e 4 uL das amostras E2- 0,9 mg/mL; E2- 0,4 mg/mL e Ncov1 - 0,4 mg/mL são as que apresentam coloração mais intensa, resultado da maior conversão do substrato cromogênico. Quando as manchas obtidas nos controles positivos foram comparadas às da amostra de E2 observamos a diferença na coloração, em E2 a coloração é bem menos intensa, isso deve-se em princípio ao rtGH estar em baixa concentração, sem deixar de considerar que o fato de não estar purificado o rtGH (extrato celular), e que as contaminações poderiam interferir na reação enzimática e na coloração resultante (ARAGÃO, 2007).

Comparando-se as raia E1 com E2, não é possível identificar-se reação (cor) na raia E1 e isso se deve ao fato do gene do rtGH clonado no plasmídeo pKId-rtGHe1 não ter a região codificadora da cauda de HIS₆, por outro lado a coloração na raia E2 mesmo sendo fraca indica uma reação específica com anticorpo anti-6xHis nas proteínas expressas pelo clone recombinante contendo o plasmídeo pKId-rtGHe2, confirmando a presença do hormônio de crescimento recombinante de tambaqui nesse clone de levedura.

vol	E1 1mg/mL	E2 0,9mg/mL	E1 0,2mg/mL	E2 0,4mg/mL	Ncov 1 0,4mg/mL
1µL					
2µL					
3µL					
4µL					
5µL					

Figura 18: Fotografia da membrana de nitrocelulose após reação imunoquímica com anticorpos anti-HIS₆. As amostras da raia E1 contém proteínas da levedura contendo o plasmídeo pKId-rtGHe1, as amostras da raia E2 contém proteínas da levedura contendo o plasmídeo pKId-rtGHe2. A raia NCov1 contém a proteína N do SASRS CoV usada como controle positivo da reação.

4.11 Análise da Expressão do rtGH por *Western Blotting*

O *Dot Blotting* foi realizado com anticorpo anti-histidina, as manchas obtidas, mesmo que fracas, indicam a presença do rtGH no clone portador do plasmídeo pKId-rtGHe2. Na técnica de *Western Blotting* (Figura 19) houve a detecção da presença de uma banda bem pouco intensa referente a amostra E2 de tamanho aproximado a 22 KDa (vide a seta na Figura 20), que contém proteínas da colônia transformada com o plasmídeo pKId-rtGHe2 rtGH portador da região codificadora de his tag (HIS₆) o que indica e expressão em baixo nível do rtGH nesse clone de levedura. Essa indicação é reforçada pelo fato dessa fraca banda não poder ser identificada no clone cujo gene do rtGH não tem a sequência codificadora de HIS₆, ou seja, o clone transformado com o plasmídeo pKId-rtGHe1.

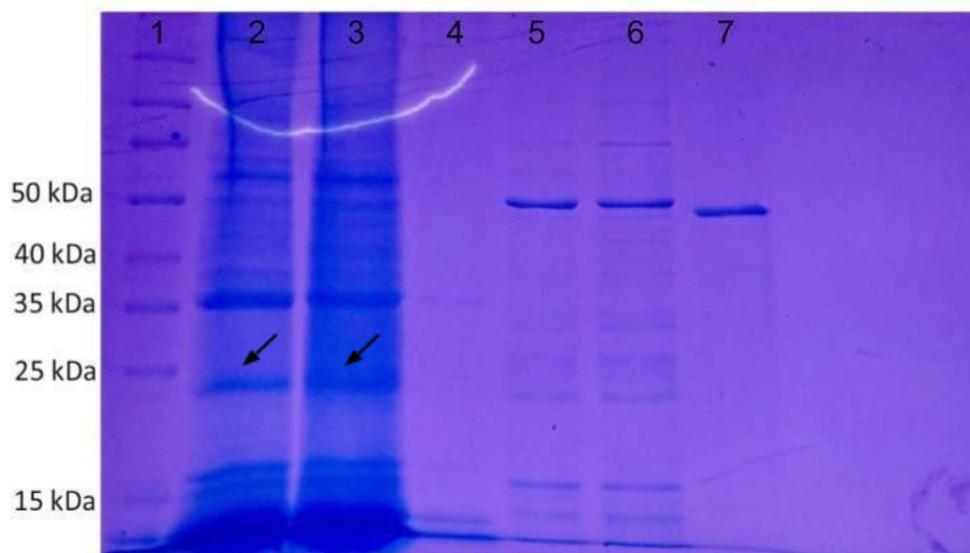


Figura 19: Fotografia do gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% réplica do usado na transferência para a membrana de imunodeteccção. 1 - Marcador Molecular Thermo Fisher Spectro-multicolor Broad Range Protein Ladder. Canaleta 2 - extrato de M12 transformada com vetor pKId-rtGHe1; Canaleta 3 - extrato de M12 transformada com vetor pKId-rtGHe2; Canaleta 4 - extrato de *Pichia pastoris* M12 não transformada; Canaleta 5 - proteína N de orthohantavirus - cepa amazônica; Canaleta 6 - proteína N de orthohantavirus - cepa andina; Canaleta 7 - proteína N do SARS CoV 2.

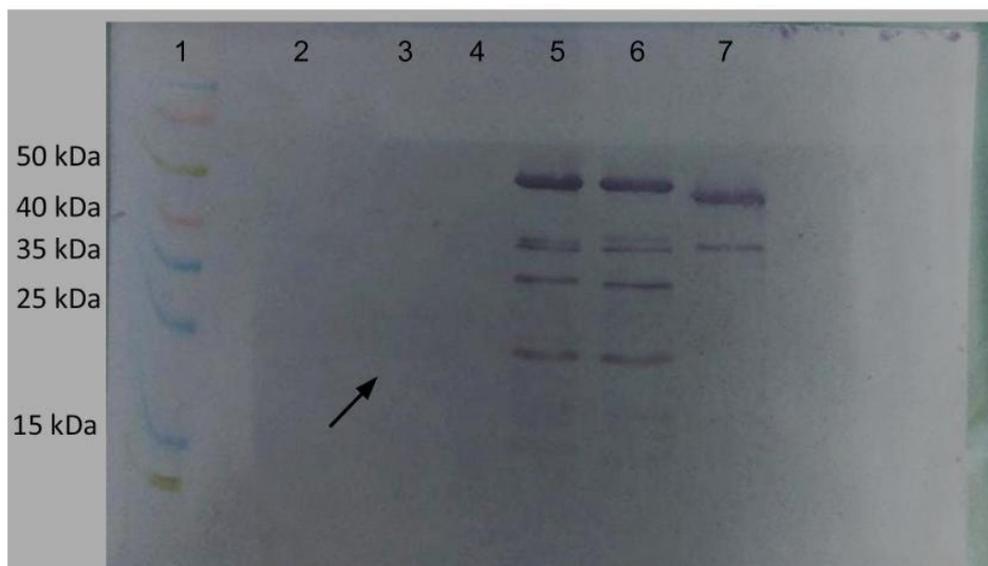


Figura 20: Imunodeteccção do hormônio de crescimento recombinante do tambaqui (rtGH) por Western Blot. Canaleta 1 - Marcador Molecular; Canaleta 2 - extrato de M12 transformada com vetor pKId-rtGHe1; Canaleta 3 - extrato de M12 transformada com vetor pKId-rtGHe2; Canaleta 4 - extrato de *P. pastoris* M12 não transformada; Canaleta 5 - proteína N de orthohantavirus - cepa amazônica; Canaleta 6 - proteína N de orthohantavirus - cepa andina; Canaleta 7 - proteína N do SARS CoV 2.

O promotor PGK é considerado um dos promotores constitutivos de força média em *P. pastoris*, apesar da utilização deste promotor neste trabalho, a expressão da proteína de interesse ocorreu em baixos níveis, isso pode ser devido:

- Às variáveis como o tempo de incubação e crescimento, tipo e disponibilidade da fonte de carbono, aeração, pH do meio, dentre outros fatores que influenciam positiva ou negativamente a produção de proteínas, a otimização do processo de produção da proteína seria necessária para a obtenção em maiores níveis do produto de interesse; ou

- Às estruturas moleculares dos plasmídeos pKId-rtGHe1 e pKId-rtGHe2 não serem compatíveis com expressão em altos níveis devido a um ou mais desses fatores: o promotor nesse contexto não funcionar bem, a região 5' não traduzida do mRNA não estar otimizada, houver estruturas secundárias no mRNA que estejam atrapalhando a tradução, a região 3' não traduzida não estar funcionando adequadamente.

- A inclusão de apenas parte da região consenso da sequência Kozak de *S. cerevisiae* na construção genética, pode não ter sido o suficiente para uma maior expressão do hormônio. Para melhorar a expressão poder-se-ia identificar a própria região consenso Kozak da *P. pastoris*, a partir da sequência do genoma dessa levedura, e introduzir a sequência consensual nas construções genéticas apresentadas nessa dissertação.

Essas possibilidades levantadas a respeito da não expressão do rtGH em altos níveis deverão ser testadas, dando continuidade a esse trabalho no futuro.

5. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho de pesquisa demonstram que, embora todas as etapas de clonagem tenham ocorrido adequadamente como apresentado, os clones recombinantes de leveduras transformados geneticamente com os plasmídeos pKId-rtGHe1 e pKId-rtGHe2 não foram capazes de expressar rtGH em níveis que permitam suas utilizações para o propósito deste trabalho, que seria de enriquecer rações de peixes, em especial o tambaqui com rtGH para um crescimento mais vigoroso e rápido.

6. PERSPECTIVAS

- Otimização do meio de cultivo e do processo fermentativo para obtenção do rtGH em altos níveis;
- Analisar o número de cópias do cassete de expressão que estão integradas nos clones de leveduras recombinantes;
- Testar em que nível a expressão da sequência codificadora do rtGH está sendo prejudicada (transcrição, tradução – em suas diversas etapas)
- Construir um clone de *P. pastoris* “super-produtor” endógeno de rtGH.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J. R. M.; MORAES, L. M. P.; TORRES, F. A. G. MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE PHOSPHOGLYCERATE KINASE (PGK1) FROM THE METHYLOTROPHIC YEAST PICHIA PASTORIS. YEAST. 22:725-737. 2005.

ARAGÃO, M. A. C. DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DO DOT-ELISA PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA MAEDI-VISNA. 92 F. DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS) – FACULDADE DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ, FORTALEZA, 2007.

ARAÚJO-LIMA, C. E GOMES, L. TAMBAQUI COLOSSOMA MACROPOMUM. IN: BALDISSEROTO, B. E GOMES, L. ESPÉCIES NATIVAS PARA PISCICULTURA NO BRASIL. SANTA MARIA: EDITORA UFSM, 2005, 1 ED., PP. 175-202.

ARRUDA, M.C.F. AVALIAÇÃO DOS INDICADORES DA POLÍTICA DE PESCA DO PROGRAMA ZONA FRANCA VERDE: PERSPECTIVAS ECONÔMICAS E AMBIENTAIS. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. UFAM: MANAUS, 2017.

ASCHNER B. UBER DIE FUNCTION DER HYPOPHYSE. PFLUGERS ARCH; 146: 1, 1912.

ASSUNÇÃO EN. PRODUÇÃO DE PRO-INSULINA RECOMBINANTE EM PICHIA PASTORIS UTILIZANDO O PROMOTOR DO GENE PGK. TESE DE DOUTORADO. UFAM: MANAUS, 2015.

BASTOS CR. PADRONIZAÇÃO DO TESTE DOT BLOTTING E COMPARAÇÃO ENTRE TESTES DE DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE EM BOVINOS. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. UNESP:SP, 2015.

BECKMAN, B.R., PERSPECTIVES ON CONCORDANT AND DISCORDANT RELATIONS BETWEEN INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR 1 (IGF1) AND GROWTH IN FISHES. GENERAL AND COMPARATIVE ENDOCRINOLOGY, 170 (2): 233-52. DOI: 10.1016 / J.YGCEN.2010.08.009. 2011.

BENNETT IL, CARY FH, MITCHELL GL, COOPER MN. ACUTE METHYL ALCOHOL POISONING: A REVIEW BASED ON EXPERIENCES IN AN OUTBREAK OF 323 CASES. MEDICINE; 32:431–433. 1953.

BETANCUR, M. O. DESENVOLVIMENTO DE LINHAGEM AUXOTRÓFICA DE PICHIA PASTORIS PARA O METABOLISMO DE LEUCINA. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, PROGRAMA DE PÓSGRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR. UNB. BRASÍLIA, F-104, 2014.

BETANCUR, OM. ESTRATÉGIAS PARA INTEGRAÇÃO MÚLTIPLA DE CASSETES DE EXPRESSÃO NO GENOMA DE KOMAGATAELLA PHAFFII. TESE DE DOUTORADO. UNB. BRASÍLIA, 2017.

BETANCUR, M.O., REIS, V.C.B., NICOLA, A.M. J.L., DE MARCO, L.M.P., MORAES & F.A.G., TORRES. MULTICOPY PLASMID INTEGRATION IN *KOMAGATAELLA PHAFFII* MEDIATED BY A DEFECTIVE AUXOTROPHIC MARKER *MICROB CELL FACT* 16, 99. [HTTPS://DOI.ORG/10.1186/S12934-017-0715-8](https://doi.org/10.1186/S12934-017-0715-8), 2017.

BRATUSCH-MARRAIN PR, SMITH D, DEFRONZO RA. THE EFFECT OF GROWTH HORMONE ON GLUCOSE METABOLISM AND INSULIN SECRETION IN MAN. J CLIN ENDOCRINOL METAB.; 55:973–982, 1982.

ÇELIK, E., ÇALIK, P. PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEINS BY YEAST CELLS, BIOTECHNOLOGY ADVANCES. 30, 1108-1118. INVITED REVIEW. 2012.

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)*. *JOURNAL OF PHYCOLOGY*, 44(3), 768–776. DOI:10.1111/J.1529-8817.2008.00508.X. 2008.

CIOFALO, V.; BARTON, N.; KREPS, J.; COATS, I.; E SHANAHAN, D. SAFETY EVALUATION OF A LIPASE ENZYME PREPARATION, EXPRESSED IN PICHIA PASTORIS, INTENDED FOR USE IN THE DEGUMMING OF EDIBLE VEGETABLE OIL. *REGULATORY TOXICOLOGY AND PHARMACOLOGY*. 45(1), 1–8. DOI:10.1016/J.YRTPH.2006.02.001. 2006.

CLAUDIA RABERT, DANIEL WEINACKER, ADALBERTO PESSOA JR AND JORGE G. FARIÁS. RECOMBINANTS PROTEINS FOR INDUSTRIAL USES: UTILIZATION OF PICHIA PASTORIS EXPRESSION SYSTEM. *BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY* 2013. 44, 2, 351-356.

COHEN, D.M. 1970. HOW MANY RECENT FISHES ARE THERE? *PROC. CALIF ACAD. SCIENCES*, SER. 4, 38:341-346.

CREGG, J. M.; BARRINGER, K. J.; HESSLER, A. Y.; E MADDEN, K. R. PICHIA PASTORIS AS A HOST SYSTEM FOR TRANSFORMATIONS. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*. 5(12), 3376–3385. DOI:10.1128/MCB.5.12.3376.UPDATED. 1985.

CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L.; SHI, J.; E HIGGINS, D. R. RECOMBINANT PROTEIN EXPRESSION IN PICHIA PASTORIS. *MOLECULAR BIOTECHNOLOGY*. 16(1), 23–52. DOI:10.1385/MB:16:1:23. 2000.

CREGG, J. M. PICHIA PROTOCOLS. HUMANA PRESS. 2ED. DOI: 10.1007/978-1-59745-456-8. 2007.

CROWE SJ, CUSHING H, HOMANS J. EXPERIMENTAL HYPOPHYSECTOMY. *BULL JOHN HOPKINS HOSP* 1910; 21: 127.

MARTINEZ, R., CARPIO, Y., MORALES, A., LUGO, J.M., HERRERA, F., ZALDÍVAR, C., CARRILLO, O., ARENAL, A., PIMENTEL, E., AND ESTRADA, M.P. ORAL ADMINISTRATION OF THE GROWTH HORMONE SECRETAGOGUE-6 (GHRP-6) ENHANCES GROWTH AND NON-SPECIFIC IMMUNE RESPONSES IN TILAPIA (*OREOCHROMIS SP.*). AQUACULTURE. VOLUME 452, 1 FEBRUARY , PAGES 304-310. 2016.

CROWE SJ, CUSHING H, HOMANS J. EXPERIMENTAL HYPOPHYSECTOMY. BULL JOHN HOPKINS HOSP 1910; 21: 127.

DAIRIKI, J. & SILVA, T.B.A.. REVISÃO DE LITERATURA: EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS DO TAMBAQUI – COMPILAÇÃO DE TRABALHOS, FORMULAÇÃO DE RAÇÃO ADEQUADA E DESAFIOS FUTUROS. – MANAUS: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL, 2011.44 P. - (EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL. DOCUMENTOS; 91).

DU, S. J., GONG, Z., FLETCHER, G. L., SHEARS, M. A., KING, M. J., IDLER, D. R., & HEW, C. L. *GROWTH ENHANCEMENT IN TRANSGENIC ATLANTIC SALMON BY THE USE OF AN “ALL FISH” CHIMERIC GROWTH HORMONE GENE CONSTRUCT. NATURE BIOTECHNOLOGY, 10(2), 176–181. DOI:10.1038/NBT0292-176. 1992.*

EVANS HM, MEYER K, SIMPSON ME, REICHART FL. DISTURBANCE OF CARBOHYDRATE METABOLISM IN NORMAL DOGS INJECTED WITH THE HYPOPHYSEAL GROWTH HORMONE. PROC SOC EXP BIOL N.Y. 1931-2; 29: 857-8. 5.

FAO. 2018. THE STATE OF WORLD FISHERIES AND AQUACULTURE 2018 - MEETING THE SUSTAINABLE DEVELOPMENT GOALS. ROME. LICENCE: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

FRYER, JN., BERN, HA. GROWTH HORMONE BINDING IN TISSUES OF NORMAL AND STUNTED JUVENILE COHO SALMON, *ONCORHYNCHUS KISUTCH* J FISH BIOL., 15, PP. 527-533. 1979.

FOWELIN J, ATTVAL S, LAGER I, BENGTSSON B-A. EFFECTS OF TREATMENT WITH RECOMBINANT HUMAN GROWTH HORMONE ON INSULIN SENSITIVITY AND GLUCOSE METABOLISM IN ADULTS WITH GROWTH HORMONE DEFICIENCY. *METABOLISM* ;42:1443–1447, 1993.

FRYER, JN., BERN, HA. GROWTH HORMONE BINDING IN TISSUES OF NORMAL AND STUNTED JUVENILE COHO SALMON, *ONCORHYNCHUS KISUTCH* J FISH BIOL., 15 (1979), PP. 527-533.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FOOD ADDITIVES PERMITTED IN FEED AND DRINKING WATER OF ANIMALS. *PICHIA PASTORIS* DRIED YEAST. 1993.

GIBNEY J *ET AL.* PROTEIN METABOLISM IN ACROMEGALY: DIFFERENTIAL EFFECTS OF SHORT- AND LONG-TERM TREATMENT. *J CLIN ENDOCRINOL METAB.*;92(4):1479-84. 2007.

GEISLER, R; KNÖPPEL, HA. ; SIOLI, H. THE ECOLOGY OF FRESHWATER FISHES IN AMAZONIA, PRESENT STATUS AND FUTURE TASKS FOR RESEARCH. *APPI SCI. DEVELOP.*, 2:144-162, 1975.

GOEDDEL DV, KLEID DG, BOLIVAR F, HEYNEKER HL, YANSURA DG, CREA R, HIROSET, KRASZEWSKI, ITAKURA K, RIGGS AD. EXPRESSÃO EM *ESCHERICHIA COLI* DE GENES QUIMICAMENTE SINTETIZADOS PARA INSULINA HUMANA. *ANAIS DA ACADEMIA NACIONAL DE CIÊNCIAS*, JANEIRO DE 1979, 76 (1) 106-110; DOI: 10.1073 / PNAS.76.1.106. 1979.

GRAHAM, I. R., & CHAMBERS, A. (N.D.). CONSTITUTIVE EXPRESSION VECTORS: PGK. *RECOMBINANT GENE EXPRESSION PROTOCOLS*, 159–170. DOI:10.1385/0-89603-480-1:159, 19, 1997.

GUILLIERMOND, A. ZYGOSACCHAROMYCES PASTORI, NOUVELLE ESPÈCE DE LEVURES COPULATION HÉTÉROGAMIQUE. BULLETIN DE LA SOCIÉTÉ MYCOLOGIQUE DE FRANCE.. 36, 203–211. 1920.

HAMILTON, R., WATANABE, C. K. AND DE BOER, H. A. COMPILATION AND COMPARISON OF THE SEQUENCE CONTEXT AROUND THE AUG START CODONS IN SACCHAROMYCES CEREVISIAE MRNAS. NUCLEIC ACIDS RES. 15, 3581– 3593. 1987.

HIGGINS D.R., CREGG J.M. INTRODUCTION TO *PICHIA PASTORIS*. IN: HIGGINS D.R., CREGG J.M. (EDS) *PICHIA* PROTOCOLS. METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY™, VOL 103. HUMANA PRESS. [HTTPS://DOI.ORG/10.1385/0-89603-421-6:1](https://doi.org/10.1385/0-89603-421-6:1), 1998.

HITZEMAN RA, CHEN CY, HAGIE FE, ET AL. EXPRESSION OF HEPATITIS B VIRUS SURFACE ANTIGEN IN YEAST. *NUCLEIC ACIDS RES.* 1983;11(9):2745-2763. DOI:10.1093/NAR/11.9.2745, 1983.

HOUSSAY BA. THE HYPOPHYSIS AND METABOLISM. N ENG J MED 214: 961-86. 4, 1936.

INVITROGEN *PICHIA* EXPRESSION VECTORS FOR SELECTION ZEOCIN™ AND PURIFICATION OF RECOMBINANT PROTEINS CATALOG NO. V190-20 REV. DATE: 7 JULY 2010.

INVITROGEN CATALOG NUMBER K1710-01 REVISION A.0 PUBLICATION NUMBER MAN0000012, 2014.

KIPNIS, A. CLONAGEM DE CDNA DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO SUÍNO E CONSTRUÇÃO DE SISTEMAS PARA SUA EXPRESSÃO EM *ESCHERICHIA COLI*. DISSERTAÇÃO APRESENTADA À UNB COMO REQUISITO PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE, 1997.

KOSTIC, M. A., & DART, R. C. *RETHINKING THE TOXIC METHANOL LEVEL. JOURNAL OF TOXICOLOGY: CLINICAL TOXICOLOGY*, 41(6), 793–800. DOI:10.1081/CLT-120025344. 2003.

KOZAK M. POINT MUTATIONS DEFINE A SEQUENCE FLANKING THE AUG INITIATOR CODON THAT MODULATES TRANSLATION BY EUKARYOTIC RIBOSOMES. *CELL*. 1986 JAN 31;44(2):283-92. DOI: 10.1016/0092-8674(86)90762-2. PMID: 3943125.

KUBITZA, F. A EVOLUÇÃO DA TILAPICULTURA NO BRASIL: PRODUÇÃO E MERCADOS. PANORAMA DA AQUICULTURA, RIO DE JANEIRO, V. 13, N. 76, P. 25-35, 2003.

KURTZMAN, C. P. BIOTECHNOLOGICAL STRAINS OF KOMAGATAELLA (PICHIA) PASTORIS ARE PICHIA PASTORISAS DETERMINED FROM MULTI GENE SEQUENCE ANALYSIS. *JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*. 36, 1435–1438. DOI:10.1007/S10295-009-0638-4. 2009.

LAMB, IC., GALEHOUSE, DM. AND FOSTER, DN. CHICKEN GROWTH HORMONE CDNA SEQUENCE. *NUCL. ACIDS RES*. 16: 9339. 1988.

LI Y, BAI J, JIAN Q, YE X, LAO H, LI X, LUO J, LIANG X. EXPRESSION OF COMMON CARP GROWTH HORMONE IN THE YEAST PICHIA PASTORIS AND GROWTH STIMULATION OF JUVENILE TILAPIA (OREOCHROMIS NILOTICUS). *AQUACULTURE* 216 329 – 341. 2003.

LI P, ANUMANTHAN A, GAO XG, ILANGO VAN K, SUZARA VV, DÜZGÜNES N, RENUGOPALAKRISHNAN V. EXPRESSION OF RECOMBINANT PROTEINS IN PICHIA PASTORIS. *APPL BIOCHEM BIOTECHNOL* 142 : 105-124 . 2007.

LI J, LIANG Q, SONG W, MARCHISIO MA. NUCLEOTIDES UPSTREAM OF THE KOZAK SEQUENCE STRONGLY INFLUENCE GENE EXPRESSION IN

THE YEAST *S. CEREVISIAE*. *J BIOL ENG*. 11:25. PUBLISHED 2017 AUG 21.
DOI:10.1186/S13036-017-0068-1. 2017.

MACEDO, C.F. E SIPAÚBA-TAVARES, L. H. EUTROFIZAÇÃO E QUALIDADE DA ÁGUA NA PISCICULTURA: CONSEQUÊNCIAS E RECOMENDAÇÕES 2 BOL. INST. PESCA, SÃO PAULO, 36(2): 149 – 163, 2010.

MACEDO-VIEGAS, E. M.; SOUZA, M. L. R. PRÉ-PROCESSAMENTO E CONSERVAÇÃO DO PESCADO PRODUZIDO EM PISCICULTURA. IN: CYRINO, J. E. P. *ET AL*. TÓPICOS ESPECIAIS EM PISCICULTURA DE ÁGUA DOCE TROPICAL INTENSIVA. SÃO PAULO: TECART. 2004. CAP. 14, P. 405-480.

MARX, H.; MECKLENBRÄUKER, A.; GASSER, B.; SAUER, M.; E MATTANOVICH, D. DIRECTED GENE COPY NUMBER AMPLIFICATION IN *PICHIA PASTORIS* BY VECTOR INTEGRATION INTO THE RIBOSOMAL DNA LOCUS. *FEMS YEAST RESEARCH* 9(8), 1260–1270. DOI:10.1111/J.1567-1364.2009.00561.X. 2009.

MCLEAN, E., RØNSHOLDT, B., STEN, C., NAJAMUDDIN. GASTROINTESTINAL DELIVERY OF PEPTIDE AND PROTEIN DRUGS TO AQUACULTURED TELEOSTS. *AQUACULTURE*, 177, PP. 231-247. 1999.

MELLOR, J , DOBSON, M. J., ROBERTS, N. A., TUIE, M F , EMTAGE, J S , WHITE, S , LOWE, P A , PATEL, T , KMGSMAN, A J , AND KINGSMAN, S M (1983) EFFICIENT SYNTHESIS OF ENZYMATICALLY ACTIVE CALF CHYMOSIN IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. *GENE* 24, 1-14, 1983.

MERCANTE, CACILDA THAIS JANSON *ET AL*. LIMNOLOGY OF NILE TILAPIA POND: DIURNAL ASSESSMENT WITH THE AIM OF BEST PRACTICES FOR MANAGEMENT. *BOLETIM DO INSTITUTO DE PESCA*, [S.L.], V. 37, N. 1, P. 73-84, JULY 2018. ISSN 1678-2305.

MOLLER N, JORGENSEN JOL, SCHMITZ O, MOLLER J, CHRISTIANSEN JS, ALBERTI KGMM, ORSKOV H. EFFECTS OF A GROWTH HORMONE PULSE ON TOTAL AND FOREARM SUBSTRATE FLUXES IN HUMANS. AM J PHYSIOL 258 (1:1) : E86–E91, 1990.

MOLLER N *ET AL.* EFFECTS OF A PHYSIOLOGICAL GROWTH HORMONE PULSE ON SUBSTRATE METABOLISM IN INSULIN-DEPENDENT (TYPE 1) DIABETIC SUBJECTS. J CLIN ENDOCRINOL METAB.;75(2):432-6, 1992.

MOLLER N *ET AL.* GROWTH HORMONE EFFECTS ON PROTEIN METABOLISM. ENDOCRINOL METAB CLIN NORTH AM.;36(1):89-100. 2007.

MOMOTA, H., KOSUGI, R., OHGAI, H., HARA, A. AND ISHIOKA, H. AMINO ACID SEQUENCE OF FLOUNDER GROWTH HORMONE DEDUCED FROM A CDNA SEQUENCE. NUCLEIC ACIDS RES. 16: 10362-10365. 1988.

MORAIS, I. S. E O’SULLIVAN, F. L. A. BIOLOGIA, HABITAT E CULTIVO DO TAMBAQUI COLOSSOMA MACROPOMUM (CUVIER, 1816) SCIENTIA AMAZONIA, V. 6, N. 1, P. 81-93, 2017.

MORIYAMA, H. YAMAMOTO, S. SUGIMOTO, T. ABE, T. HIRANO, H. KAWAUCHI ORAL ADMINISTRATION OF RECOMBINANT SALMON GROWTH HORMONE TO RAINBOW TROUT ONCORHYNCHUS MYKISS. 1993. AQUACULTURE, 112, PP. 99-106.

NIELSEN JH. EFFECTS OF GROWTH HORMONE, PROLACTIN AND PLACENTAL LACTOGEN ON INSULIN CONTENT AND RELEASE, AND DEOXYRIBONUCLEIC ACID SYNTHESIS IN CULTURED PANCREATIC ISLETS. ENDOCRINOLOGY.;110:600–606, 1982.

NISHAD, R, MUKHI, D, MENON, RK, PASUPULATI, AK. GROWTH HORMONE AND METABOLIC HOMEOSTASIS. EMJ DIABET.; 6[1]: 78-87, 2018.

PANTOJA-LIMA, J.; SANTOS, S.M.; OLIVEIRA, A.T.; ARAUJO, R.L.; SILVA-JUNIOR, J.A.L.; ARIDE, P.H.R. PRÓ-RURAL AQUICULTURA: RELATOS DAS PRINCIPAIS AÇÕES DE EXTENSÃO TECNOLÓGICA E UM PANORAMA DO SETOR AQUÍCOLA DO ESTADO DO AMAZONAS, BRASIL. NEXUS - REVISTA DE EXTENSÃO DO IFAM, V. 1, N.1, P. 36-46, 2015A

PANTOJA DE JESUS, R. PRODUÇÃO DE SOPA INSTANTÂNEA COM RESÍDUOS DE TAMBAQUI (COLOSSOMA MACROPOMUM). DISSERTAÇÃO APRESENTADA À UFAM COMO REQUISITO PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE, 2015.

PARK CR ET AL. THE EFFECT OF GROWTH HORMONE ON GLUCOSE UPTAKE BY THE ISOLATED RAT DIAPHRAGM. J BIOL CHEM.;197(1):151-66, 1952.

PAZ, ARLAN DE LIMA E VAL, ADALBERTO LUIS. MANIPULAÇÃO DO CRESCIMENTO DO PEIXE AMAZÔNICO TAMBAQUI, COLOSSOMA MACROPOMUM (CHARACIFORMES: SERRASALMIDAE): ANÁLISE DE ASPECTOS FISIOLÓGICOS E ZOOTÉCNICOS. ACTA AMAZONICA , 48 (3), 197-206. [HTTPS://DOI.ORG/10.1590/1809-4392201800181](https://doi.org/10.1590/1809-4392201800181). 2018.

PEIXE BR, ANUÁRIO BRASILEIRO DA PISCICULTURA 2020. WWW.PEIXEBR.COM.BR

PORMEHR LA, POURKAZEMI M. PRODUCTION OF RECOMBINANT GREAT STURGEON (HUSOHUSO, LINNAEUS, 1758) GROWTH HORMONE (GH) BY PICHIA PASTORIS (GUILLIERM, 1956). J. APPL. ICHTHYOL. 31, 609–613. 2015.

PRESS M *ET AL*. IMPORTANCE OF RAISED GROWTH HORMONE LEVELS IN MEDIATING THE METABOLIC DERANGEMENTS OF DIABETES. N ENGL J MED.;310(13):810-15, 1984.

RABERT, CLAUDIA, WEINACKER, DANIEL, PESSOA JR, ADALBERTO E FARIÁS, JORGE G . PROTEÍNAS RECOMBINANTES PARA USO INDUSTRIAL: UTILIZAÇÃO DO SISTEMA DE EXPRESSÃO DE PICHIA PASTORIS. BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY , 44 (2), 351-356. EPUB 20 DE AGOSTO DE 2013. [HTTPS://DOI.ORG/10.1590/S1517-83822013005000041](https://doi.org/10.1590/S1517-83822013005000041). 2013.

RANKE, M., WIT, J. GROWTH HORMONE — PAST, PRESENT AND FUTURE. *NAT REV ENDOCRINOL* 14, 285–300. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/NREND0.2018.22](https://doi.org/10.1038/NREND0.2018.22). 2018.

RIZZA RA, MANDARINO LJ, GERICH JE. EFFECTS OF GROWTH HORMONE ON INSULIN ACTION IN MAN. MECHANISMS OF INSULIN RESISTANCE, IMPAIRED SUPPRESSION OF GLUCOSE PRODUCTION AND IMPAIRED STIMULATION OF GLUCOSE UTILIZATION. *DIABETES*; 31:663–669, 1982.

ROTHAN, A.H., HUY, T.S. E MOHAMED, Z. EFEITO DA OTIMIZAÇÃO DO CÓDON NA PRODUÇÃO DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO DE PEIXES RECOMBINANTE EM PICHIA PASTORIS. HINDAWI PUBLISHING CORPORATION E SCIENTIFIC WORLD JOURNAL VOLUME, ARTICLE ID 514835 [HTTPS://DOI.ORG/10.1155/2014/514835](https://doi.org/10.1155/2014/514835). 2014.

ROTWEIN, P., REGULATION OF GENE EXPRESSION BY GROWTH HORMONE. *MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY*. DOI: [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.MCE.2020.110788](https://doi.org/10.1016/J.MCE.2020.110788). 2020.

RUBINI, M.R. CLONAGEM, EXPRESSÃO HETERÓLOGA E UMA CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE UMA ENDOGLICANASE DE *PENICILLIUM ECHINULATUM*. TESE DE DOUTORADO. UNB. 2009.

RUSSELL-JONES DL.THE METABOLIC EFFECTS OF GROWTH HORMONE (GH). *MED J.*; (VOL 2) 4225: 897-901, 1941.

SADALLA-PINTO, E.A. CLONAGEM E EXPRESSÃO DO CDNA CODIFICADOR DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO DE TAMBAQUI (COLOSSOMA MACROPOMUM) NA LEVEDURA PICHIA PASTORIS. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. UFAM: MANAUS, 2012.

SADALLA-PINTO, E.A. HORMÔNIO DE CRESCIMENTO RECOMBINANTE DE TAMBAQUI (COLOSSOMA MACROPOMUM): UMA INOVAÇÃO BIOTECNOLÓGICA PARA O CULTIVO DE PEIXES AMAZÔNICOS. TESE DE DOUTORADO. UFAM: MANAUS, 2018.

SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH, & MANIATIS. T. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ND ED., P. 1.25-1.31. COLD SPRING HARBOR LABORATORY, COLD SPRING HARBOR, N.Y.1989.

SÁNCHEZ-GURMACHES, J., CRUZ-GARCIA, L., IBARZ, A., FERNÁNDEZ-BORRÁS, J., BLASCO, J., GUTIÉRREZ, J., NAVARRO, I. INSULIN, IGF-I, AND MUSCLE MAPK PATHWAY RESPONSES AFTER SUSTAINED EXERCISE AND THEIR CONTRIBUTION TO GROWTH AND LIPID METABOLISM REGULATION IN GILTHEAD SEABREAM. DOMESTIC ANIMAL ENDOCRINOLOGY, VOLUME 45, 145-153, DOI: [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.DOMANIEND.2013.08.001](https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2013.08.001).2013.

SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR. DNA SEQUENCING WITH CHAIN-TERMINATING INHIBITORS. *PROC NATL ACAD SCI USA*. 74(12):5463-5467. DOI:10.1073/PNAS.74.12.5463. 1977.

SEEBURG, PH., SHINE, J., MARTIAL, JA., BAXTER, JD. & GOODMAN, HM. NUCLEOTIDE SEQUENCE AND AMPLIFICATION IN BACTERIA OF STRUCTURAL GENE FOR RAT GROWTH HORMONE. *NATURE*. 270, 486–494, 1977.

SEEBURG, PH., SIAS, S., ADELMAN, J., HERMAN, AB., HAYFLICK, J., JHURANI, P., GOEDEL, DV. AND HEYNECKER, HL. EFFICIENT

BACTERIAL EXPRESSION OF BOVINE AND PORCINE GROWTH HORMONES. DNA, 2: 37-45. 1983.

SEKINE S, MIZUKAMI T, NISHI T, KUWANA Y, SAITO A, SATO M, ITOH S, KAWAUCHI H. CLONING AND EXPRESSION OF CDNA FOR SALMON GROWTH HORMONE IN ESCHERICHIA COLI. PROC NATL ACAD SCI USA. JUL;82(13):4306-10. DOI: 10.1073/PNAS.82.13.4306. PMID: 16593578; PMCID: PMC390402.1985.

SCHULTE, P.M., N.E. (TED) DOWN, DONALDSON, E.M. E SOUZA, L.M. ADMINISTRAÇÃO EXPERIMENTAL DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO BOVINO RECOMBINANTE NA TRUTA ARCO-ÍRIS JUVENIL (SALMO GAIRDNERI) POR INJEÇÃO OU IMERSÃO. AQUACULTURE, 76, EDIÇÕES 1-2 [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/0044-8486\(89\)90259-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90259-7). 1989.

SHAHANGIAN S, ASH KO. FORMIC AND LACTIC ACIDOSIS IN A FATAL CASE OF METHANOL INTOXICATION. CLIN CHEM; 32(3):395-397. 1986.

SILVA, SUELEN DIAS DA. CLONAGEM E EXPRESSÃO DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO DE COLOSSOMA MACROPOMUM EM ESCHERICHIA COLI.. 2012. 32 F. DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA) - INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA, MANAUS, 2012.

SOUZA BRA. ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DE ETIQUETAS DE SEQUÊNCIAS EXPRESSAS DA HIPÓFISE E PARTE DO CÉREBRO DE TAMBAQUI (COLOSSOMA MACROPOMUM) E EXPRESSÃO DO CDNA DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO EM PICHIA PASTORIS. TESE DE DOUTORADO. INPA. MANAUS, 2009.

SMITH, PD. ANALYSIS OF THE HYPEROSMOTIC AND BATH METHODS FOR FISH VACCINATION: COMPARISON OF UPTAKE OF PARTICULATE AND NON-PARTICULATE ANTIGENS. DEV. COMP. IMMUNOL. SUPPL., 2, PP. 181-186. 1982.

SUFRAMA- RELATÓRIO ELABORADO PELA CÂMARA SETORIAL DA AGROINDÚSTRIA DA ZONA FRANCA DE MANAUS SUPERINTENDÊNCIA DA ZONA FRANCA DE MANAUS. 2003.

TATNER, MF. THE QUANTITATIVE RELATIONSHIP BETWEEN VACCINE DILUTION, LENGTH OF IMMERSION TIME AND ANTIGEN UPTAKE, USING A RADIOLABELLED *AEROMONAS SALMONICIDA* BATH IN DIRECT IMMERSION EXPERIMENTS WITH RAINBOW TROUT, *SALMO GAIRDNERI*. *AQUACULTURE*, 62, PP. 173-185. 1987.

VAN EENENNAAM, A. L., & MUIR, W. M. *TRANSGENIC SALMON: A FINAL LEAP TO THE GROCERY SHELF? NATURE BIOTECHNOLOGY*, 29(8), 706–710. DOI:10.1038/NBT.1938. 2011.

VOLKOFF, H., FISH AS MODELS FOR UNDERSTANDING THE VERTEBRATE ENDOCRINE REGULATION OF FEEDING AND WEIGHT. *GENERAL AND COMPARATIVE ENDOCRINOLOGY* , VOLUME 497. DOI: [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.MCE.2019.04.017](https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.04.017). 2019.

WALLIS, M. THE EXPANDING GROWTH HORMONE/PROLACTIN FAMILY. *J. MOL. ENDO.*; 9: 185-188. 1992.

WATERS, J.M. THE GROWTH HORMONE RECEPTOR GROWTH HORMONE & IGF RESEARCH, VOLUME 28 26-10. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.GHIR.2015.06.001](https://doi.org/10.1016/j.ghir.2015.06.001). 2016.

WEI C, ZHOU X, ZHANG Y. IMPROVING INTRACELLULAR PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEIN IN *PICHTIA PASTORIS* USING AN OPTIMIZED PREINDUCTION GLYCEROL-FEEDING SCHEME. *APPL MICROBIOL BIOTECHNOL* 78:257–264 DOI 10.1007/S00253-007-1315-Z. 2008.

YOUNG FG. ANTERIOR PITUITARY FRACTION AND CARBOHYDRATE METABOLISM I; THE PREPARATION AND PROPERTIES OF DIABETOGENIC EXTRACTS. J ENDOCRINOL 1: 339-54. 6, 1939.

YOUNG FG. THE GROWTH HORMONE AND DIABETES. RECENT FROG HORM RES. 8: 471-510, 1953.

ANEXO A

Protocolo de Extração de DNA de Levedura (Adaptado)

1. Crescer as leveduras em 5mL de meio YPD a 30°C por aproximadamente 48 horas.
2. Centrifugar as células por 5 minutos a 12000 rpm em temperatura ambiente 20°C.
3. Adicionar 250 uL de tampão TM.
4. Adicionar 20uL de Lysing Trichoderma, incubar a 37°C por 30 min, 1 ou 2 horas (obtivemos bons resultados com 2h para Pichia).
5. Adicionar 25uL de SDS 10% misturar bem (manualmente).
6. Extrair com fenol (1V), verter bem, centrifugar por 5 minutos a 4000 rpm passar sobrenadante para tubo novo de 1,5.
7. Adicionar 295 uL de clorofórmio e agitar bem manualmente por 2 minutos.
8. Centrifugar a 12000 rpm por 3 minutos em temperatura ambiente (TA).
9. Recuperar o sobrenadante e adicionar 2,5V de etanol 100% (gelado), misturar bem.
10. Incubar a -20°C por 10 minutos.
11. Centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos temperatura ambiente (TA).
12. Descartar o sobrenadante e lavar o pellet de DNA com 600 uL de etanol 70% (gelado).
13. Centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos em TA, descartar o sobrenadante.
14. Deixar o pellet secar bem em Temperatura Ambiente.
15. Ressuspender o DNA em 50 uL de tampão R.
16. Adicionar 1uL de RNase e incubar por 30 minutos a 37°C.
17. Fazer análise em gel de agarose.

Soluções:

Tampão TM

50 mM NaCl

50 mM de EDTA pH 7,5 ou 8,0

10mM Tris-HCl pH 8,0

Tampão R

10mM Tris-HCl pH 8,0

EDTA 0,1 mM

Lysing Trichoderma

Enzimas de lise de *Trichoderma harzianum*

Contém atividades β -glucanase, celulase, protease e quitinase

ANEXO B

rtGH

GAC GGA TCC ATC GAA ACG ATG TCT GAG AAC CAA AGA TTG TTC AAC
AAC GCT GTC ATT AGA GTT CAA CAC TTG CAT CAA TTA GCT GCC AAG
ATG ATC ACT GAC TTC GAA GAG TCT CTG TTG CCA GAA GAG AGA AGA
CAA TTG TCC AAG ATT TTC CCA CTG TCT TTC TGT AAC TCT GAC TCC
ATC GAA GCT CCA ACT GGA AAG GAT GAG ACT CAA AAG TCT TCC GTT
TTG AAA CTT CTG CAT ATC TCT TAC AGA CTG ATT GAG TCC TGG GAG
TAC CCA TCC AGA ATC TTG GGT AAC CCA AAC CAA ATC ACT GAA AAG
TTG GCT GAC TTG AAA GTT GGT ATC TCT GTC TTG ATC AAG GGT TGT
TTG GAT GGA CAG CCA AAC ATG GAC GAC AAC GAA TCT TTG CCA CTT
CCT TTT GAA GAC TTC TAC CAA ACT TTG GGA GAT GGT AAC TTG AGA
AAG TCT TTC AGA TTG CTT GCT TGT TTC AAG AAA GAT ATG CAT AAG
GTT GAA ACT TAC TTG AGA GTT GCT AAC TGT AGA AGA TCC TTG GAC
TCC AAC TGT ACT TTG CAT CAC CAT CAC CAT CAC TAA TTG AGT AGG
CGG CCG CCG ATC CAG

Primer E1

forward: GAC GGA TCC ATC GAA ACG ATG TCT GAG AAC CAA AGA TTG
TTC AAC

reverse: ' GTC A GC GGC CGC TTA CAA AGT ACA GTT GGA GTC CAAG 3'

Primer E2

forward: GAC GGA TCC ATC GAA ACG ATG TCT GAG AAC CAA AGA TTG
TTC AAC 3'

reverse: 5' GAT CC G CGG CCG C CT ACTC 3'

XXX Sítio enzimático *BamHI*

XXX Sítio enzimático *NotI*

XXX Sequência consenso de Kozak

XXX Região de homologia dos primer E1 e E2 forward

XXX Região de homologia do primer E1 reverse

XXX Região de homologia do primer E2 reverse

XXX Stop códon

ANEXO C

Quadro mostrando a expressão heteróloga de GH de diversas espécies de peixes.

Sistema de expressão	Espécie	Referência
<i>Escherichia coli</i> e outras bactérias	“chum salmon” <i>Oncorhynchus keta</i>	Sekine <i>et al.</i> (1985)
	“rainbow trout” <i>Salmo gairdneri</i>	Agellon & Chen (1986); Tsai & Tseng (1992); Agellon <i>et al.</i> , 1988b; Rentier-Delrue <i>et al.</i> (1989b)
	“japanese eel” <i>Anguilla japonica</i>	Saito <i>et al.</i> (1988)
	“tuna” <i>Thunnus thynnus</i>	Sato <i>et al.</i> , (1988, 1989); Kimura (1991)
	“tilapia” <i>Oreochromis niloticus</i>	Rentier-Delrue <i>et al.</i> (1989a)
	“grass carp” <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	Ho <i>et al.</i> (1991); Wang <i>et al.</i> , 2001
	“common carp” <i>Cyprinus carpio</i>	Fine <i>et al.</i> (1993); Bai <i>et al.</i> (1999)
	“striped bass” <i>Morone saxatilis</i>	Cheng <i>et al.</i> , 1995
	“goldfish” <i>Carassius auratus</i>	Mahmoud <i>et al.</i> (1998)
	“rabbitfish” <i>Siganus guttatus</i>	Ayson <i>et al.</i> (2000)
	“indian catfish” <i>Heteropneustes fossilis</i>	Anathy <i>et al.</i> (2001)
	“rohu” <i>Labeo rohita</i>	Venugopal <i>et al.</i> (2002)
	“mrigal” <i>Cirrhina mrigala</i> e “catla” <i>Catla catla</i>	Venugopal & Pandian (2002)
	“giant catfish” <i>Pangasianodon gigas</i>	Promdonkoy <i>et al.</i> (2004)
	“tambaqui” <i>Colossoma macropomum</i>	Silva, (2012)
	“yellowfin porgy” <i>Acanthopagrus latus</i>	Tsai <i>et al.</i> (1994a, 1995, 1997)
	“flounder” <i>Paralichthys olivaceus</i>	Jeh <i>et al.</i> , (1998)
	“rabbitfish” <i>Siganus guttatus</i>	Funkenstein <i>et al.</i> (2005)
	“pejerrey” <i>Odontesthes bonariensis</i>	Arranz <i>et al.</i> , (2008)
	“rainbow trout” <i>Salmo gairdneri</i>	Agellon <i>et al.</i> , (2011)
“tubarão-iridescente” <i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	Megarajan <i>et al.</i> , (2015)	
“garoupa-gigante” <i>Epinephelus lanceolatus</i>	Chung <i>et al.</i> , (2015)	
“tilápia” <i>Oreochromis hornorum</i>	Alan <i>et al.</i> , (2016)	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	“tuna” <i>Thunnus thynnus</i>	Hayami, (1989)
	“carpa” <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	Monteiro, (2011)
	“rainbow trout” <i>Salmo gairdneri</i>	Tsai <i>et al.</i> , (1994); Ma <i>et al.</i> , (1999); Jin <i>et al.</i> , (1999)
<i>Pichia pastoris</i>	“giant catfish” <i>Pangasianodon gigas</i>	Piyaviriyakul <i>et al.</i> , (2002)
	<i>Lateolabrax japonicus</i>	Chen <i>et al.</i> , (1998)
	“common carp” <i>Cyprinus carpio</i>	Li <i>et al.</i> , (2001); (2003)
	“grass carp” <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	Wang <i>et al.</i> , (2003)
	“tilapia” <i>Oreochromis sp.</i>	Acosta <i>et al.</i> , (2007)
	“carpa” <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	Monteiro, (2011)
Insetos/Baculovírus	“tambaqui” <i>Colossoma macropomum</i>	Sadalla-Pinto, (2012)
	“esturção-branco” <i>Huso huso</i>	Pormehr and Pourkazemi (2015)
	“grass carp” <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	Ho <i>et al.</i> , (1998)

Algas	"yellowfin porgy" <i>Acanthopagrus latus</i>	Tsai <i>et al.</i> , (1994)
	"yellowfin porgy" <i>Acanthopagrus latus</i>	Chen <i>et al.</i> , (2008)
	"flounder" <i>Paralichthys olivaceus</i>	Liu <i>et al.</i> , (2008)

Fonte: Sadalla-Pinto, (2012) *o quadro foi atualizado.