



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**EXPRESSÃO DE HORMÔNIO FOLÍCULO  
ESTIMULANTE BOVINO (bFSH) COM AS DUAS  
SUBUNIDADES FUSIONADAS EM *PICHIA PASTORIS***

**PATRÍCIA BASILIO MEDEIROS**

BRASÍLIA

2011

**EXPRESSÃO DE HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE  
BOVINO (bFSH) COM AS DUAS SUBUNIDADES  
FUSIONADAS EM *PICHIA PASTORIS***

PATRÍCIA BASILIO MEDEIROS

Dissertação apresentada ao  
Departamento de Biologia Celular do  
Instituto de Biologia da Universidade  
de Brasília, como requisito parcial à  
obtenção de título de Mestre em  
Biologia Molecular.

ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIA  
SUELI SOARES FELIPE

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr.  
FERNANDO ARARIPE TORRES

BRASÍLIA

2011

**PATRÍCIA BASILIO MEDEIROS**

**EXPRESSÃO DE HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE BOVINO  
(bFSH) COM AS DUAS SUBUNIDADES FUSIONADAS EM *PICHIA  
PASTORIS***

Dissertação submetida à comissão avaliadora como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em biologia Molecular.

06 de abril de 2011.

**COMISSÃO AVALIADORA**

Profa. Dra. Maria Sueli Soares Felipe  
Universidade de Brasília  
Presidente – Orientadora

Profa. Dra. Andrea Maranhão  
Universidade de Brasília  
Membro efetivo

Profa. Dra. Beatriz Magalhães  
Universidade Católica de Brasília  
Membro efetivo

Prof. Dr. João Alexandre  
Universidade Católica de Brasília  
Suplente

**Para Mãe, Pai, Rafa e Lucas, pelo  
amor, carinho, apoio e  
compreensão imensuráveis.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade, por guiar e iluminar meus passos para que eu pudesse chegar até aqui.

A meus queridos e amados pais e irmãos, por terem me incentivado a entrar no mestrado e por terem me apoiado tanto nesse percurso. Sou grata pelos conselhos, pelas palavras de carinho e de conforto, pelo amor e compreensão, pelas risadas e momentos de distração. Agradeço todos os dias por fazerem parte da minha vida!

Agradeço à professora Sueli por ter me acolhido ainda no começo da graduação quando bati à sua porta pedindo um estágio. Desde então ela acompanha minha trajetória e caminhada, me ajudando a crescer e a me desenvolver no ambiente acadêmico e científico. Agradeço pelos ensinamentos, pela perseverança e paciência, e por sempre acreditar no meu potencial!

Ao professor Fernando, meu co-orientador, por ter dado tantas idéias para o projeto e por ter me ajudado tanto nos experimentos e na discussão de resultados pelo corredor.

Aos demais professores e funcionários do laboratório pelo auxílio prestado e pela colaboração para o bom funcionamento do nosso ambiente de trabalho. Agradecimentos especiais à Profa. Lídia, pela ajuda nos experimentos de transformação e seleção de clones positivos de *Pichia pastoris*, e à Dona Fátima, Dona Ivonildes, Thompson e Aldáide, pois sem eles o laboratório não anda!

À Profa Bia, pela imensa ajuda com os experimentos de purificação e caracterização de proteínas e pelo auxílio quando eu achava que não tinha mais saída!

A todos os colegas de laboratório: Mari, Zé, Ana Karina, Marcus, Larissa Bruno, Waltinho, Fabi, Luíza, Marinez, Adriane. Agradeço pela convivência diária;

pelas conversas e risadas; pelos auxílios com os experimentos, artigos, disciplinas; e por ouvirem meus desabafos quando os experimentos davam errado! Agradecimentos especiais à Érika, que desde que entrou no lab 4, tomou conta de tudo e de todos como uma mãe! Agradeço muito pelo convívio e pelos auxílios prestados, principalmente nas horas mais desesperadoras.

Ao pessoal do lab 2, principalmente Janice, Juliana, Viviane, Fernanda e Paula que me socorreram tantas vezes nos momentos críticos. Agradeço à paciência e disposição para me ajudar todas as vezes em corri ao lab 2 (e foram muitas!) cheia de dúvidas.

Aos avós, tios e tias, primos e primas pela presença, apoio, incentivo, carinho e por tantas reuniõezinhas familiares tão prazerosas.

Às grandes amigas de mestrado e da vida, Gabi e Rê (e a Lu acaba entrando de brinde nesse grupo também!). Agradeço muito pela nossa amizade e companheirismo, pelas conversas, conselhos e crises de riso! Agradeço pela força em todos os momentos e questões da minha vida. Agradeço pelos lanches, almoços, jantares, barzinhos, baladinhas, domingos de sol no clube, viagens, enfim, por todos os momentos de distração. Vocês são muito importantes e especiais para mim!

Não poderia deixar de agradecer a todos meus queridos amigos e amigas. Foram muitos os que colaboraram nesses últimos dois anos com sua amizade e vibrações positivas. Se fosse agradecer a cada um não caberia aqui! Sou muito privilegiada por ter tantos amigos! Vocês me ajudaram das mais variadas formas fazendo com que eu não enlouquecesse nesse processo todo!

Agradeço à empresa Ouro Fino, pela iniciativa do projeto. Agradecimentos especiais a Ricardo e Flávia, pelos experimentos de fermentação.

Por último, mas não menos importante, ao CNPq, pela concessão de bolsa para a realização desse projeto.

*“A esperança não murcha,  
ela não cansa,  
também como ela não sucumbe à crença.  
Vão-se sonhos nas asas da descrença,  
voltam sonhos nas asas da esperança.”*

Augusto dos Anjos

## RESUMO

O hormônio folículo estimulante (FSH) pertence à família das gonadotrofinas. Esse hormônio glicoprotéico é um heterodímero formado pela associação não-covalente de duas subunidades,  $\alpha$  e  $\beta$ . As duas subunidades possuem ligações dissulfeto internas e sítios para N-glicosilação. A formação do dímero, com a estruturação quaternária da proteína, é essencial para ligação ao receptor e para a atividade biológica de FSH. O FSH é responsável por uma série de processos reprodutivos, como estimulação de funções testiculares e ovarianas, regulação da gametogênese e síntese de estrógeno. O FSH possui aplicações na veterinária, sendo utilizado em processos de transferência de embriões, sincronização de ciclo estral e superovulação de vacas. O rebanho bovino brasileiro é o maior rebanho comercial do mundo, sendo que o Brasil é o maior exportador mundial de carne bovina. Uma das estratégias utilizadas para aumentar a produtividade do gado brasileiro é a tecnologia de transferência de embriões, utilizando FSH. O FSH para uso veterinário é purificado a partir de extratos hipofisários de porcos. Esse método apresenta desvantagens como produtividade, purificação e questões sanitárias. A tecnologia do DNA recombinante poderia superar essas limitações. O sistema de expressão em *Pichia pastoris* é vantajoso devido à sua manipulação genética fácil e rápida e ao baixo custo e fácil escalonamento da produção. O objetivo deste trabalho foi expressar FSH bovino recombinante (bFSH) em *Pichia pastoris*. Três construções gênicas foram arquitetadas: 1) fusão  $\beta\alpha$  (bFSH-fus); 2) fusão  $\beta\alpha$  separada por um peptídeo conector (bFSH-L); fusão  $\beta\alpha$  separada pelo peptídeo CTP de gonadotrofina coriônica equína (bFSH-CTP). Os genes foram clonados no vetor de expressão pPIC9 e utilizados para transformação de *Pichia pastoris*, linhagem GS115. Clones positivos foram selecionados e utilizados para a indução da expressão em frasco. A expressão das proteínas de fusão em frasco foi eficiente, mas o nível de produção foi baixo. A expressão das proteínas em fermentador está sendo otimizada juntamente com a indústria Ouro Fino.



## ABSTRACT

Follicle-stimulating hormone (FSH) belongs to the family of gonadotropins. This glycoprotein hormone is a heterodimer of non-covalently associated  $\alpha$  and  $\beta$  subunits. There are five intra-chain disulfide bridges in the  $\alpha$ -subunit and six in the  $\beta$ , each containing two N-linked oligosaccharides. The association of the two subunits and the structural conformation of the whole molecule are essential for receptor binding and biological activity. FSH is responsible for several reproductive processes such as stimulation of testicular and ovarian functions, regulation of gametogenesis and steroid hormone synthesis. In veterinary medicine, FSH has been used for genetic improvement of cattle, in processes such as embryo transfer, superovulation and estrous cycle synchronization. The Brazilian livestock is very expressive making this country a great meat exporter. One of the strategies used to increase the productivity of Brazilian cattle is the embryo transfer technology. FSH for veterinary use is purified from pig pituitary extracts. This method presents obstacles associated with productivity, purification, and sanitary issues. Recombinant DNA technology can overcome these difficulties by heterologous expression in microbial hosts. The yeast *Pichia pastoris* expression system shows many advantages as easy genetic manipulation, simple and cheap growth media, and easy scale-up. This work aimed at the production of recombinant bovine FSH (bFSH) in *Pichia pastoris*. Three constructs were made: 1) direct  $\beta\alpha$  fusion (bFSH-fus); 2)  $\beta\alpha$  fusion separated by a synthetic linker (bFSH-L); 3)  $\beta\alpha$  fusion separated by the CTP sequence from equine chorionic gonadotropin (bFSH-CTP). The fusion genes were cloned into pPIC9 expression vector and used for *Pichia pastoris* (GS115 strain) transformation. Expression of the heterologous proteins was efficiently done in shake-flask cultures, but the protein levels were low. Expression in fermenter cultures has been done together with Ouro Fino industry for the achievement of higher protein expression levels.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Morfologia dos folículos primordial, primário, secundário e maduro, presentes no ovário em diferentes fases de seu desenvolvimento.
- Figura 2.** Corte transversal de túbulo seminífero, mostrando as células de Sertoli e as células da linhagem germinativa ou espermatogênica (espermátides e espermatócitos).
- Figura 3.** Alinhamento das sequências de aminoácidos das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  do FSH de diversas espécies de mamíferos.
- Figura 4.** Nó de cisteína.
- Figura 5.** Glicosilação em FSH.
- Figura 6.** Estrutura cristalina de FSH.
- Figura 7.** Estrutura do receptor de FSH, mostrando os domínios extracelulares, transmembranosos e intracelulares.
- Figura 8.** Vetor pPIC9 da Invitrogen.
- Figura 9.** Esquema dos genes sintéticos *bFSH-fus*, *bFSH-L* e *bFSH-CTP*.
- Figura 10.** Estratégia de construção dos vetores de expressão.
- Figura 11.** Análise de restrição para a confirmação da ligação dos insertos *bFSH-fus*, *bFSH-L* e *bFSH-CTP* ao vetor pPIC9.
- Figura 12.** *Imuno blot* de colônia.
- Figura 13.** *Dot blot* do sobrenadante.
- Figura 14.** A) Curva de crescimento do clone *bFSH-fus* 6. B) *Western blot*.
- Figura 15.** A) Curva de crescimento do clone *bFSH-L* 13. B) *Western blot*.
- Figura 16.** A) Curva de crescimento do clone *bFSH-CTP* 57. B) *Western blot*.
- Figura 17.** A) Curva de crescimento de *bFSH-CTP* 57. B) *Western blot*. C) Gel de poliacrilamida desnaturante.
- Figura 18.** *Western blot* do sobrenadante concentrado e dialisado.
- Figura 19.** Cromatografia de exclusão molecular.
- Figura 20.** Cromatografia de fase reversa.
- Figura 21.** Perfil do cultivo de *bFSH-CTP* 80 em fermentador, destacando os valores de pH, peso seco em g/mL, densidade óptica em comprimento de onda de 600 nm e concentração de proteína total em mg/L.

**Figura 22.** *Western blot* das amostras da indução do clone bFSH-CTP 80 em fermentador.

## LISTA DE ABREVIATURAS

Å	angstrom
° C	graus Celsius
µF	microfaraday
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrometro
Ω	ohm
ACN	acetonitrila
AOX1	gene que codifica a álcool oxidase 1
AOX2	gene que codifica a álcool oxidase 2
APS	persulfato de amônio
Asn	asparagina
bFSH	hormônio folículo estimulante bovino
BSA	albumina sérica bovina
C-	controle negativo
C+	controle positivo
CaSO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	sulfato de cálcio dihidratado
CG	gonadotrofina coriônica
CHO	célula de ovário de hãmsster
cm	centímetro
CoCl <sub>2</sub>	cloreto de cobalto
CTP	peptídeo C-terminal
Cys	cisteína
DNA	ácido desoxirribonucléico
DO	oxigênio dissolvido
eCG	gonadotrofina coriônica equína
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EUA	Estados Unidos da América
FeSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O	sulfato ferroso pentahidratado
FSH	hormônio folículo estimulante
g	grama

GalNAc	N-acetil-galactosamina
GlcNAc	N-acetil-glucosamina
h	hora
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ácido sulfúrico
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	ácido bórico
hCG	gonadotrofina coriônica humana
HCl	ácido clorídrico
hFSH	hormônio folículo estimulante humano
<i>HIS4</i>	gene que codifica a histidinol desidrogenase
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	sulfato de potássio
kb	quilobase
kDa	quilodalton
kV	quilovolt
L	litro
LH	hormônio luteinizante
M	molar
Man	manose
MF- $\alpha$	<i>mating factor</i> $\alpha$
mg	miligrama
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	sulfato de magnésio heptahidratado
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	sulfato de manganês monohidratado
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
ms	milissegundos
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	molibdato de sódio bihidratado
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	fosfato de sódio dibásico
NaCl	cloreto de sódio
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	fosfato de sódio monobásico
ng	nanograma
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	sulfato de amônio
nm	nanometro
OD <sub>600</sub>	densidade ótica a 600 nm

p/v	partes por volume
pb	pares de base
PDB	Protein Data Bank
PDI	proteína dissulfeto isomerase
<i>PGK1</i>	gene que codifica a 3-fosfoglicerato quinase
pH	potencial de hidrogênio
<i>PH01</i>	gene que codifica a fosfatase ácida
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecilsulfato de sódio
Ser	serina
TCA	ácido tricloroacético
TE	tris-EDTA
TEB	tris-EDTA-borato
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletlenodiamina
TFA	ácido trifluoracético
Thr	treonina
TSH	hormônio tireoestimulante
U	unidade
V	volts
v/v	volume por volume
vvm	volume de ar por volume de meio por minuto
<i>x g</i>	força gravitacional
YNB	base nitrogenada de levedura (yeast nitrogen base)
ZnCl <sub>2</sub>	cloreto de zinco

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1.1 Bovinocultura brasileira .....	17
1.2 Hormônio folículo estimulante (FSH) .....	20
1.2.1 Função e aplicação.....	20
1.2.2 Estrutura .....	23
1.2.3 Produção comercial .....	32
1.3 Expressão heteróloga em <i>Pichia pastoris</i> .....	36
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
2.1 Objetivo geral .....	43
2.2 Objetivos específicos .....	43
<b>3. MATERIAIS.....</b>	<b>44</b>
3.1 Microorganismos.....	44
3.1.1 Bactérias.....	44
3.1.2 Leveduras .....	44
3.2 Meios de cultura.....	44
3.2.1 Meios para cultivo de bactérias .....	44
3.2.2 Meios para cultivo de leveduras .....	45
3.3 Soluções .....	47
3.3.1 Soluções para extração de DNA plasmidial.....	47
3.3.2 Soluções para eletroforese de DNA em gel de agarose.....	47
3.3.3 Soluções para precipitação de proteínas.....	48
3.3.4 Soluções para eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE).....	48
3.3.5 Soluções para coloração de gel com <i>comassie blue</i> .....	49
3.3.6 Soluções para coloração de gel com prata.....	49
3.3.7 Soluções para <i>imuno blot, dot blot e western blot</i> .....	50
3.3.8 Soluções para diálise.....	51
3.3.9 Soluções para cromatografia de exclusão molecular .....	51
3.3.10 Soluções para cromatografia de fase reversa .....	51
3.3.11 Soluções para espectrometria de massa .....	52

3.4 Vetores.....	52
3.5 Enzimas .....	53
3.6 Marcadores .....	53
3.7 Anticorpos .....	53
3.8 Proteína comercial .....	54
3.9 Membrana de nitrocelulose .....	54
3.10 Kits .....	54
3.11 Unidades de filtração .....	54
3.12 Colunas cromatográficas.....	55
3.13 Placa para MALDI-TOF/TOF.....	55
<b>4. MÉTODOS .....</b>	<b>56</b>
4.1 Digestão de DNA com enzimas de restrição.....	56
4.2 Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	56
4.3 Purificação de DNA a partir do gel de agarose .....	57
4.4 Ligação de fragmentos de DNA .....	57
4.5 Preparo de células bacterianas competentes para choque térmico.....	57
4.6 Transformação de <i>E. coli</i> por choque térmico.....	58
4.7 Extração de DNA plasmidial em pequena escala ( <i>miniprep</i> ) .....	58
4.8 Extração de DNA plasmidial em grande escala ( <i>midiprep</i> ) .....	59
4.9 Tratamento do DNA para transformação de <i>Pichia pastoris</i> .....	59
4.10 Transformação de <i>Pichia pastoris</i> por eletroporação.....	60
4.11 Análise dos transformantes por <i>imuno blot</i> de colônia.....	61
4.12 Indução em placas <i>deep-well</i> .....	62
4.13 Análise dos transformantes por <i>dot blot</i> do sobrenadante .....	62
4.14 Indução da expressão de recombinantes em frasco .....	63
4.15 Precipitação de proteínas com TCA e acetona .....	63
4.16 Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE).....	64
4.17 Coloração do gel de poliacrilamida com <i>comassie blue</i> .....	64
4.18 Coloração do gel de poliacrilamida com prata .....	65
4.19 <i>Western blot</i> .....	65
4.20 Concentração e diálise do sobrenadante .....	66
4.21 Quantificação de proteínas pelo ensaio de Bradford .....	67
4.22 Cromatografia de exclusão molecular.....	67



4.23 Cromatografia de fase reversa.....	67
4.24 Espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF .....	68
4.25 Indução da expressão de recombinantes em fermentador (realizado pela empresa Ouro Fino) .....	69
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>71</b>
5.1 Síntese dos genes <i>bFSH-fus</i> , <i>bFSH-L</i> e <i>bFSH-CTP</i> .....	71
5.2 Construção dos vetores de expressão .....	73
5.3 Transformação de <i>Pichia pastoris</i> e detecção de clones positivos para a expressão das proteínas desejadas.....	76
5.4 Indução da expressão dos clones positivos em frasco .....	79
5.5 Purificação de bFSH-CTP .....	84
5.6 Indução da expressão dos clones de bFSH-CTP em fermentador (realizado em colaboração com a empresa Ouro Fino).....	89
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>92</b>
<b>7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>101</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>102</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>108</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Bovinocultura brasileira

O rebanho bovino brasileiro é o maior rebanho comercial do mundo, sendo composto de aproximadamente 190 milhões de cabeças de gado (ABIEC, 2011). Animais de raças zebuínas (*Bos indicus*) compõem 80% do rebanho brasileiro e animais de raças taurinas (*Bos taurus*), 20%. O gado zebuino é de origem asiática, principalmente indiana, e está distribuído por todo o território brasileiro. É um gado que se adapta bem ao clima tropical e é bastante tolerante a parasitas. A raça Nelore é de destaque, representando cerca de 90% do rebanho zebuino do país. O gado taurino é de origem européia, principalmente britânica, e está concentrado majoritariamente na região sul do Brasil, que permite maior adaptação climática desses animais. Os taurinos são conhecidos por sua precocidade sexual, o que adianta o início da vida reprodutiva, sendo vantajosos para o produtor. Hereford, Shorthorn e Angus são exemplos de raças taurinas (BARROS; BARCELOS; NOGUEIRA, 2006).

A bovinocultura de corte representa a maior fatia do agronegócio brasileiro, gerando um faturamento de mais de 50 bilhões de reais por ano e oferecendo cerca de 7,5 milhões de empregos (ABIEC, 2011). O Brasil é o segundo maior produtor mundial de carne bovina, produzindo mais de 9 milhões de toneladas de carne por ano. Os Estados Unidos produzem cerca de 11 milhões de toneladas, sendo os maiores produtores mundiais (ABIEC, 2011). Desde 2005, o Brasil lidera o ranking mundial de exportação de carne, superando outros países como Austrália, Índia, Nova Zelândia e Canadá. O Brasil exporta por ano cerca de 2 milhões de toneladas de carne, o que equivale a aproximadamente 5 bilhões de dólares anuais (ABIEC, 2011). Em 2010, por exemplo, o Brasil exportou 1,23 milhões de toneladas de carne, faturando 4,8 bilhões de dólares (ABIEC, 2011). Esses valores representam uma participação de 28% do comércio internacional, exportando para mais de 170 países, sendo que a Rússia, o Irã e o Egito estão entre os principais importadores (ABIEC, 2011).

Apesar de ser o líder mundial em exportação de carne, o Brasil não exporta para os mercados de maior valor agregado. Isso se deve ao risco de febre aftosa por parte de alguns rebanhos e à qualidade da carne, considerada ruim por alguns importadores (SIQUEIRA *et al*, 2007). A dureza da carne, por exemplo, leva a uma perda econômica de 7,64 dólares por animal ou perda anual de 217 milhões de dólares para a indústria bovina norte-americana (SMITH *et al*, 1995 *apud* ALVES; MANCIO, 2007). A bovinocultura brasileira tem, portanto, o desafio de transformar sua carne em produto destacado, com valor agregado, a fim de se manter como líder mundial e de ganhar novos mercados. Para atender às necessidades de alta qualidade é essencial a adequação dos sistemas de produção para a oferta de um produto que apresente características qualitativas como maciez, suculência, gordura e sabor (SIQUEIRA *et al*, 2007).

Com relação à bovinocultura de leite, o Brasil tem passado por inúmeras transformações no setor produtivo e vem ganhando destaque mundial nos últimos anos. Na década de 90, o Brasil se destacava como grande importador de produtos lácteos, chegando a registrar déficits anuais de quase 500 milhões de dólares devido às importações (CARVALHO, 2010). Melhorias na cadeia produtiva, incorporação de novas tecnologias e um cenário mundial favorável levaram o Brasil a passar de país importador para exportador de laticínios em 2004 (CARVALHO, 2010). De 2000 a 2008, a produção mundial de leite de vaca apresentou um crescimento médio de 2,1% ao ano, enquanto que no Brasil esse crescimento foi de 4% (CARVALHO, 2010). Somente em 2008, a produção nacional apresentou um crescimento de 5,5% quando comparada com a de 2007 (ALVES *et al*, 2010). Atualmente o Brasil é o sexto maior produtor de leite do mundo, produzindo mais de 27 bilhões de litros por ano. Os EUA lideram esse ranking, produzindo aproximadamente 86 bilhões de litros por ano (ALVES *et al*, 2010).

Apesar de ter se tornado um país exportador de leite, o Brasil precisa superar grandes desafios competitivos para se consolidar no mercado internacional. Os índices de produtividade do gado leiteiro brasileiro são baixos quando comparados aos de outros países. Uma vaca brasileira produz em média pouco mais de quatro litros de leite por dia. Isso equivale a 7,5 vezes menos do que a produção diária de uma vaca americana ou a apenas 20% do que uma vaca francesa produz (ALVES *et al*, 2010). Além disso, mesmo com os recentes avanços nos sistemas de produção,

a qualidade do leite brasileiro está muito abaixo dos padrões de outros países, como Nova Zelândia, Estados Unidos e Inglaterra (CARVALHO, 2010). Comparando-se a Contagem Bacteriana Total (CBT) do leite brasileiro com a de outros países, o número chega a ser 36 vezes superior no Brasil, indicando falta de cuidados básicos de higiene no processamento dos laticínios (CARVALHO, 2010). O teor de sólidos do leite brasileiro também é precário. O leite da nova Zelândia, por exemplo, possui 17% a mais de sólidos do que o leite brasileiro (CARVALHO, 2010). É necessário um incremento de sólidos no leite, pois isso torna a indústria de laticínios mais competitiva no mercado internacional (CARVALHO, 2010). O Brasil possui características únicas que o potencializam a ser um bom produtor de leite, mas a eficiência da indústria de laticínios ainda precisa ser melhorada (ALVES *et al*, 2010).

Estratégias que visem o melhoramento genético dos rebanhos podem potencializar o Brasil a atender as exigências do mercado externo, tanto em relação à carne quanto ao leite. Inseminação artificial e transferência de embriões são tecnologias de reprodução importantes para o melhoramento genético do gado brasileiro (BARROS; NOGUEIRA, 2004; BARROS; BARCELOS; NOGUEIRA, 2006).

A inseminação artificial consiste em depositar o sêmen do macho no útero da fêmea utilizando meios artificiais em lugar da cópula natural. Por trás desse processo está toda uma logística direcionada à produção e conservação do sêmen e à escolha de características genéticas desejáveis para serem transmitidas de geração em geração.

A transferência de embriões consiste na obtenção de embriões de uma fêmea doadora, de características genéticas desejáveis, a fim de transferi-los para uma fêmea receptora que completará o ciclo de gestação. Essa técnica é utilizada em programas de reprodução bovina há mais de 20 anos e o Brasil se destaca mundialmente pela grande quantidade de embriões transferidos (BARROS; NOGUEIRA, 2004). Quando aliada a duas outras metodologias de produção, superovulação e sincronização do ciclo estral, a implementação de programas de transferência de embriões é facilitada e a eficiência do processo se torna muito maior (BARBOSA; MACHADO, 2008; KANITZ *et al*, 2002). A sincronização do ciclo estral permite que as fêmeas doadoras e receptoras permaneçam na mesma fase do ciclo no momento da transferência dos embriões, o que beneficia todo o processo de gestação. A superovulação consiste na indução de ovulação múltipla de uma

fêmea doadora, a fim de obter o número máximo possível de embriões transferíveis (MAPLETOFT; STEWARD; ADAMS, 2002).

A sincronização de ciclo estral e a superovulação são alcançadas por meio de tratamentos hormonais das fêmeas, sendo que diversos tipos de tratamentos estão disponíveis para utilização em bovinos. Dentre as preparações hormonais disponíveis no mercado destacam-se a gonadotrofina coriônica (CG) purificada a partir do soro de eqüinos; e o hormônio folículo estimulante (FSH) extraído de glândulas pituitárias de suínos, ovinos e eqüinos (BARROS; NOGUEIRA, 2004; MAPLETOFT; STEWARD; ADAMS, 2002). A utilização do FSH como agente indutor de superovulação tem sido extensivamente estudada, sendo que diversas preparações e metodologias de administração já foram testadas, apresentando eficácias diferentes (BARROS; BARCELOS; NOGUEIRA, 2006). A utilização de FSH como agente indutor de superovulação é, portanto, uma alternativa atraente para auxiliar os processos de melhoramento genético de bovinos brasileiros.

## **1.2 Hormônio Folículo Estimulante (FSH)**

### **1.2.1 Função e aplicação**

O hormônio folículo estimulante (FSH) está envolvido na regulação de uma série de processos reprodutivos como estimulação das funções ovarianas e testiculares e gametogênese (PIERCE; PARSONS, 1981). Esse hormônio é produzido e secretado pela hipófise anterior e é transferido pela circulação sanguínea até suas células-alvo, que se encontram nos ovários e testículos. As células da granulosa presentes nos folículos ovarianos e as células de Sertoli do testículo são as principais células-alvo do FSH, sendo as únicas a apresentarem receptores para esse hormônio (SIMONI; GROMOLL; NIESCHLAG, 1997). A atividade de FSH ocorre quando essa proteína se liga ao seu receptor específico, desencadeando uma cascata de sinalização que culmina nos efeitos biológicos típicos do hormônio.

Nos ovários, o FSH é responsável pela estimulação do crescimento e do amadurecimento folicular e estimula as células da granulosa a secretarem

estrógeno. Juntamente com o hormônio luteinizante (LH), o FSH também regula o processo de ovulação (PIERCE; PARSONS, 1981; RYAN *et al*, 1988; HARTREE; RENWICK, 1992).

O ovário contém em seu córtex folículos ovarianos, que por sua vez contêm ovócitos primários. Durante a vida intra-uterina, os folículos ovarianos são denominados de folículos primordiais e consistem de um ovócito primário envolto por uma única camada de células da granulosa (a estrutura dos folículos ovarianos está esquematizada na figura 1). Na vida fetal e após o nascimento, esses folículos primordiais começam a crescer e a se desenvolver em folículos primários, que por sua vez se desenvolvem em folículos secundários, processos que ainda não dependem de atividade hormonal. Durante toda a infância, o ovário está repleto de folículos primários e secundários. Os folículos primários consistem de um ovócito envolto por diversas camadas de células da granulosa, separadas do ovócito pela zona pelúcida. Os folículos secundários são constituídos de ovócito, zona pelúcida, diversas camadas de células da granulosa, uma cavidade em formação chamada de antro primário e um envoltório externo primário, ou teca primária. Na puberdade, ocorre a maturação dos folículos secundários em folículos maduros, processo que é dependente do FSH. Os folículos maduros possuem estrutura mais complexa constituída de ovócito, zona pelúcida, camadas de células da granulosa, antro, cúmulus oophorus (células da granulosa que envolvem e prendem o ovócito ao resto da estrutura folicular) e teca organizada em teca interna e externa. Os folículos maduros se rompem e liberam os ovócitos, que serão colhidos pelas tubas uterinas, no processo denominado de ovulação, regulado tanto pelo FSH quanto pelo LH (JUNQUEIRA; CARNEIRO, c1999).

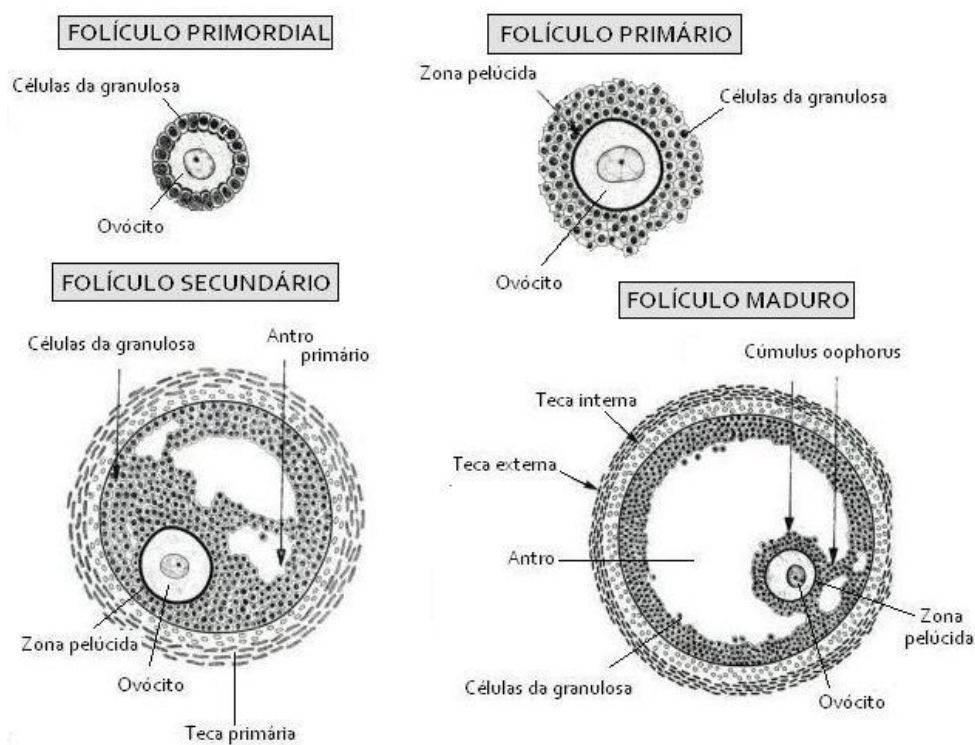


Figura 1. Morfologia dos folículos primordial, primário, secundário e maduro, presentes no ovário em diferentes fases de seu desenvolvimento. Adaptado do site <http://rge.fmrp.usp.br> (acesso em agosto de 2010).

Nos testículos, o FSH regula as funções das células de Sertoli, provendo correto desenvolvimento e maturação de espermatozóides (PIERCE; PARSONS, 1981; RYAN *et al*, 1988; HARTREE; RENWICK, 1992).

Os testículos são divididos em diversos compartimentos piramidais chamados de lóbulos testiculares. Estes são ocupados por um a quatro túbulos seminíferos, que contêm células de Sertoli e células da linhagem espermatogênica ou seminal (Figura 2). Nesses túbulos ocorre a espermatogênese. O processo se inicia com a mitose de espermatogônias, sendo que as células geradas podem seguir dois caminhos: sofrer novas mitoses sendo fonte de novas espermatogônias ou parar de se dividir a fim de crescer e se desenvolver em espermatócitos primários. Estes se dividem por meiose e, com a primeira divisão meiótica geram os espermatócitos secundários. A partir da segunda divisão meiótica surgem as espermátides. Nas espermátides termina a fase de divisões celulares da espermatogênese e se inicia um processo de modificações complexas, chamado de espermiogênese, que leva à formação dos espermatozóides. As células de Sertoli, sob controle do FSH,

fornece suporte e nutrição aos espermatozoides em formação, captam restos metabólicos e citoplasmáticos liberados na espermatogênese e secretam proteínas de ligação a andrógenos e estrógenos e um fluido que leva os espermatozoides à luz do túbulo seminífero (JUNQUEIRA; CARNEIRO, c1999).

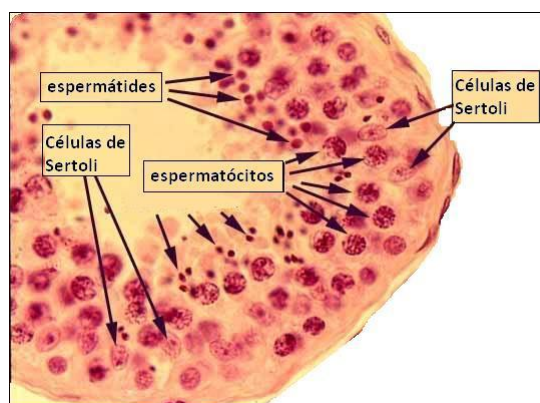


Figura 2. Corte transversal de túbulo seminífero, mostrando as células de Sertoli e as células da linhagem germinativa ou espermatogênica (espermatídeos e espermatócitos). Adaptado do site <http://anatomyforme.blogspot.com> (acesso em agosto de 2010).

Devido a suas funções reprodutivas, o FSH apresenta importantes aplicações na medicina e na veterinária, sendo que o mercado para esse hormônio é bastante significativo. Em humanos, o FSH é utilizado para o tratamento de infertilidade e desordens reprodutivas. Na veterinária, é usado para melhoramento genético de animais, em metodologias de superovulação de fêmeas, sincronização de ciclo estral, transferência de embriões e fertilização *in vitro* (KONING *et al*, 1994; QIAN *et al*, 2009; DIAS, 2005).

### 1.2.2 Estrutura

O hormônio folículo estimulante (FSH) é membro da família dos hormônios glicoprotéicos ou das gonadotrofinas, que também inclui o hormônio luteinizante (LH), a gonadotrofina coriônica (CG) e o hormônio tireoestimulante (TSH) (PIERCE; PARSONS, 1981). Todos os hormônios glicoprotéicos possuem estruturas químicas similares, que são as estruturas mais complexas já vistas dentre os hormônios



protéicos (RYAN *et al*, 1988). Cada gonadotrofina consiste de um heterodímero formado pela associação não-covalente de duas subunidades,  $\alpha$  e  $\beta$ . As duas subunidades são glicosiladas em resíduos específicos e possuem ligações dissulfeto internas (PIERCE; PARSONS, 1981; RYAN *et al*, 1988; GHARIB *et al*, 1990). A subunidade  $\alpha$  é comum a todos os hormônios glicoprotéicos e é altamente conservada entre diferentes espécies. A subunidade  $\beta$  é específica a cada hormônio e, portanto, determina a especificidade hormonal. No entanto, apesar de ser específica, ela apresenta alguns resíduos conservados entre os quatro hormônios de uma mesma espécie e também mostra homologia para um mesmo hormônio entre espécies diferentes (PIERCE; PARSONS, 1981; RYAN *et al*, 1988). A atividade do hormônio se expressa após a interação das duas subunidades e a formação da estrutura quaternária da proteína, sendo que subunidades livres praticamente não exibem atividade. O dímero interage com seu receptor específico e desencadeia uma cascata de sinalização que por fim gera o sinal biológico (PIERCE; PARSONS, 1981; RYAN *et al*, 1988; HARTREE; RENWICK, 1992).

As sequências de aminoácidos das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  do FSH de diversas espécies de mamíferos, mostrando os resíduos conservados e os resíduos envolvidos nas ligações dissulfeto e nas glicosilações, estão representadas na figura 3, a seguir.

## A

### Subunidade alfa

<i>Bos taurus</i>	<u>MDYYRKYAAVILAILSLFLQILHS</u> FPDGEFTMQGCPECKLKENKYFSKPDAPIYQCMGCC	60
<i>Bos indicus</i>	<u>MDYYRKYAAVILAILSLFLQILHS</u> FPDGEFTMQGCPECKLKENKYFSKPDAPIYQCMGCC	60
<i>Ovis aries</i>	<u>MDYYRKYAAAILAILSLFLQILHS</u> FPDGEFTMQGCPECKLKENKYFSKPDAPIYQCMGCC	60
<i>Rattus norvegicus</i>	<u>MDYYKRYAAVILVMSLFLHILHS</u> LPDGDFFIIQGCPECKLKENKYFSKLGAPIYQCMGCC	60
<i>Equus caballus</i>	<u>MDYYRKHAAVILATLSVFLHILHS</u> FPDGEFTTQDCPECKLRENKYFFKLGVPPIYQCKGCC	60
<i>Homo sapiens</i>	<u>MDYYRKYAAIFLVTLSVFLHILHS</u> APD---VQDCPECTLQENPFSSQPGAPIYQCMGCC	56
<i>Macaca fascicularis</i>	<u>MDYYRKYAAVILVTLSVFLHILHS</u> FPDGEFTMQDCPECKPRENKFFSKPGAPIYQCMGCC	60
	****:.*:* :*. **:*:*:*** ** *.*****. :** :* :..** ** **	
<i>Bos taurus</i>	FSRAYPTPARSKKTMLVPK <b>N</b> ITSEATCCVAKAFTKATVMGNVRVEN <b>NHTECHC</b> STCYHKS	120
<i>Bos indicus</i>	FSRAYPTPARSKKTMLVPK <b>N</b> ITSEATCCVAKAFTKATVMGNVRVEN <b>NHTECHC</b> STCYHKS	120
<i>Ovis aries</i>	FSRAYPTPARSKKTMLVPK <b>N</b> ITSEATCCVAKAFTKATVMGNVRVEN <b>NHTECHC</b> STCYHKS	120
<i>Rattus norvegicus</i>	FSRAYPTPARSKKTMLVPK <b>N</b> ITSEATCCVAKAFTKATVMGNARVEN <b>NHTECHC</b> STCYHKS	120
<i>Equus caballus</i>	FSRAYPTPARSRKTMLVPK <b>N</b> ITSESTCCVAKAFIRVTVMGNIKLE <b>NHTQCYC</b> STCYHKKI	120
<i>Homo sapiens</i>	FSRAYPTPLRSKKTMLV <b>Q</b> K <b>N</b> VTSESTCCVAKSYNRVTVMGGFKVEN <b>NHTACHC</b> STCYHKS	116
<i>Macaca fascicularis</i>	FSRAYPTPLRSKKTMLV <b>Q</b> K <b>N</b> VTSESTCCVAKSLTRVMVMGNVRVEN <b>NHTQCHC</b> STCYHKE	120
	***** **:****** **:*:*:*****: :. ***. ::* ** *:******:**	

## B

## Subunidade beta

<i>Homo sapiens</i>	-MKT <u>IQ</u> FFFLFCCWKAICCN <u>SC</u> ELT <u>NI</u> ITIAIEKEE <u>CR</u> FCISIN <u>TT</u> WCAGYCYTRDLVYKD 59
<i>Macaca fascicularis</i>	-MKT <u>IQ</u> FCFLFCCWKAICCN <u>SC</u> ELT <u>NI</u> ITIAIEKEE <u>CR</u> FCISIN <u>TT</u> WCAGYCYTRDLVYKD 59
<i>Equus caballus</i>	-MKS <u>VQ</u> FCFLFCCWKAICCN <u>SC</u> ELT <u>NI</u> ITIAVEKEE <u>CG</u> FCISIN <u>TT</u> WCAGYCYTRDLVYKD 59
<i>Ovis aries</i>	-MKS <u>VQ</u> FCFLFCCWRAICCR <u>SC</u> ELT <u>NI</u> ITITVEKEE <u>CS</u> FCISIN <u>TT</u> WCAGYCYTRDLVYKD 59
<i>Bubalus bubalis</i>	-MKS <u>VQ</u> FCFLFCCWRAICCR <u>SC</u> ELT <u>NI</u> ITITVEKEE <u>CG</u> FCISIN <u>TT</u> WCAGYCYTRDLVYRD 59
<i>Bos taurus</i>	-MKS <u>VQ</u> FCFLFCCWRAICCR <u>SC</u> ELT <u>NI</u> ITITVEKEE <u>CG</u> FCISIN <u>TT</u> WCAGYCYTRDLVYRD 59
<i>Bos indicus</i>	-MKS <u>VQ</u> FCFLFCCWRAICCR <u>SC</u> ELT <u>NI</u> ITITVEKEE <u>CG</u> FCISIN <u>TT</u> WCAGYCYTRDLVYRD 59
<i>Cavia porcellus</i>	-MKS <u>IQ</u> FCFFCCWKAICCN <u>G</u> ELT <u>NI</u> ITITVEREE <u>CR</u> FCISV <u>NT</u> WCAGYCYTRDLVYRD 59
<i>Mus musculus</i>	MMKLI <u>Q</u> LCILFWCWRAICCH <u>SC</u> ELT <u>NI</u> ITISVEKEE <u>CR</u> FCISIN <u>TT</u> WCAGYCYTRDLVYKD 60
<i>Rattus norvegicus</i>	MMKSI <u>Q</u> LCILLWCLRAVCC <u>SC</u> ELT <u>NI</u> ITISVEKEE <u>CR</u> FCISIN <u>TT</u> WCEGYCYTRDLVYKD 60
	* * : * : : * : * : * . * * * * * : : * * * * * : * * * * * : * * * * * : *
<i>Homo sapiens</i>	PARPKIQKTCTFKELVYETVVRVPGCAHHADSLYTPVATQCHCGKCDS DSTDC TVRGLGP 119
<i>Macaca fascicularis</i>	PARPNIQKTCTFKEVVYETVVRVPGCAHHADSLYTPVATQCHCGKCDS DSTDC TVRGLGP 119
<i>Equus caballus</i>	PARPNIQKTCTFKELVYETVKVPGCAHHADSLYTPVATQCHCGKCNS DSTDC TVRGLGP 119
<i>Ovis aries</i>	PARPNIQKACTFKELVYETVKVPGCAHHADSLYTPVATECHCGKC DRDSTDC TVRGLGP 119
<i>Bubalus bubalis</i>	PARPNIQKTCTYKELVYETVKVPGCAHHADSLYTPVATECQCGKC DGDSTDC TVRGLGP 119
<i>Bos taurus</i>	PARPNIQKTCTFKELVYETVKVPGCAHHADSLYTPVATECHCSKCDSDSTDC TVRGLGP 119
<i>Bos indicus</i>	PARPNIQKTCTFKELVYETVKVPGCAHHADSLYTPVATECHCGKCDS DSTDC TVRGLGP 119
<i>Cavia porcellus</i>	PARPNIQKTCTFKELVYETVVRVPGCAHHADSLYTPVATECQCGKCDS DSTDC TVRGLGP 119
<i>Mus musculus</i>	PARPNTQKVCTFKELVYETVRLPGCARHSDSLYTPVATECHCGKCDS DSTDC TVRGLGP 120
<i>Rattus norvegicus</i>	PARPNTQKVCTFKELVYETIRLPGCARHSDSLYTPVATECHCGKCDS DSTDC TVRGLGP 120
	**** : * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
<i>Homo sapiens</i>	SYCSFGEMKE 129
<i>Macaca fascicularis</i>	SYCSFSEMKE 129
<i>Equus caballus</i>	SYCSFGDMKE 129
<i>Ovis aries</i>	SYCSFSDIRE 129
<i>Bubalus bubalis</i>	SYCSFSEGRE 129
<i>Bos taurus</i>	SYCSFREIKE 129
<i>Bos indicus</i>	SYCSFREIKE 129
<i>Cavia porcellus</i>	SYCSFSEIKE 129
<i>Mus musculus</i>	SYCSFSEMKE 130
<i>Rattus norvegicus</i>	SYCSFGEMKE 130
	***** : : *

Figura 3. Alinhamento das seqüências de aminoácidos das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  do FSH de diversas espécies de mamíferos. A) Sequências de aminoácidos das subunidades  $\alpha$ . B) Sequências de aminoácidos das subunidades  $\beta$ . A seqüência do peptídeo sinal está sublinhada e é composta de 24 aminoácidos para a subunidade  $\alpha$  e de 18 ou 19 aminoácidos (dependendo da espécie) para a subunidade  $\beta$ . O restante da seqüência corresponde à proteína madura. A subunidade  $\alpha$  é composta de 92 aminoácidos para humanos e 96 para os outros mamíferos e a subunidade  $\beta$  é composta de 111 aminoácidos. \* corresponde a aminoácidos idênticos. : corresponde a aminoácidos conservados. . corresponde a aminoácidos similares. Em cinza estão representados os aminoácidos não conservados. Em azul, os resíduos de cisteína envolvidos na formação das ligações dissulfeto. Em rosa, os resíduos de asparagina aos quais se ligam oligossacarídeos N-ligados.

A subunidade  $\alpha$  do FSH de várias espécies de mamíferos é codificada por um gene constituído de quatro éxons separados por três íntrons intercalantes. Em humanos, esse gene está localizado no cromossomo 6. O mRNA possui tamanho variado de 730 a 800 nucleotídeos dependendo da espécie e codifica um peptídeo sinal, de 24 aminoácidos, seguido da seqüência da proteína madura, de 92

aminoácidos para humanos e 96 para outras espécies de mamíferos (Figura 3) (ULLOA-AGUIRRE; TIMOSSI, 1998). A presença de ligações dissulfeto confere alto dobramento e estruturação tridimensional à subunidade  $\alpha$ . Essas ligações estabilizam a estrutura secundária e terciária do dímero e são essenciais para manter a atividade biológica de FSH. A formação das ligações dissulfeto começa logo que a cadeia peptídica é traduzida e é concluída no retículo endoplasmático rugoso após a interação das duas subunidades (ULLOA-AGUIRRE; TIMOSSI, 1998). A subunidade  $\alpha$  possui 10 resíduos de cisteína (Figura 3), que estão envolvidos na formação de 5 ligações dissulfeto, formadas pela interação dos seguintes pares de cisteína em humanos: Cys7-Cys31, Cys10-Cys60, Cys28-Cys82, Cys32-Cys84, Cys59-Cys87. Para outras espécies de mamíferos, as ligações dissulfeto são formadas pelos seguintes pares de cisteína: Cys11-Cys35, Cys14-Cys64, Cys32-Cys86, Cys36-Cys88, Cys63-Cys91. Os pares Cys10-Cys60, Cys28-Cys82 e Cys32-Cys84 em humanos e Cys14-Cys64, Cys32-Cys86 e Cys36-Cys88 em outros mamíferos estão envolvidos na formação de um nó de cisteína, onde a ligação dissulfeto Cys10-Cys60 ou Cys14-Cys64 passa através de um anel formado pelas ligações dissulfeto Cys28-Cys82 e Cys32-Cys84 ou Cys32-Cys86 e Cys36-Cys88, dependendo da espécie (FOX; DIAS; VAN ROEY, 2001). Nós de cisteína são importantes para manter a estabilidade estrutural da proteína e para aumentar a resistência à degradação proteolítica. Um esquema representando um nó de cisteína encontrado em proteínas da planta *Viola odorata* está exemplificado na figura 4.

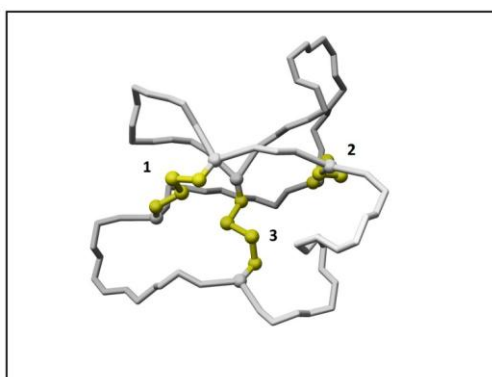


Figura 4. Esquema representativo de um nó de cisteína presente em um ciclótideo (ou polipeptídeo cíclico) de *Viola odorata*. As ligações dissulfeto estão representadas em amarelo. As ligações 1 e 2 formam um anel pelo qual a ligação 3 passa. Adaptado do site <http://www.fkog.uu.se/research/cyclotides/cyclotides.html> (acesso em fevereiro de 2011).

A subunidade  $\beta$  de FSH é codificada por um gene diferente do gene da subunidade  $\alpha$ , que se localiza no cromossomo 11 em humanos. O gene é constituído de 3 éxons e 2 íntrons para a maioria dos mamíferos. O primeiro éxon contém a sequência 5', que não será traduzida. O segundo e terceiro éxons contêm toda a sequência que será codificada. O gene codifica um peptídeo sinal de 18 a 19 aminoácidos e a proteína madura, de 111 resíduos de aminoácidos para todos os mamíferos (Figura 3) (ULLOA-AGUIRRE; TIMOSSO, 1998). A subunidade  $\beta$  é internamente ligada por 6 ligações dissulfeto (Figura 3), entre os resíduos de cisteína Cys3-Cys51, Cys17-Cys66, Cys20-Cys104, Cys28-Cys82, Cys32-Cys84 e Cys87-Cys94 para todas as espécies de mamíferos. Também há nó de cisteína na subunidade  $\beta$ , onde a ligação dissulfeto Cys3-Cys51 passa pelo anel formado entre as ligações Cys28-Cys82 e Cys32-Cys84 (FOX; DIAS; VAN ROEY, 2001).

As duas subunidades de FSH possuem dois sítios para ligação de oligossacarídeos N-ligados, que são oligossacarídeos que se ligam a grupos amina de resíduos de asparagina. Não existem sítios para ligação de oligossacarídeos O-ligados, que são açúcares que se ligam a grupos hidroxila de resíduos de serina ou treonina. Na subunidade  $\alpha$  de humanos, os oligossacarídeos se ligam aos resíduos de asparagina Asn52 e Asn78 (Figura 3). Na subunidade  $\alpha$  de outras espécies de mamíferos, há oligossacarídeos ligados aos resíduos Asn56 e Asn82 (Figura 3). Na subunidade  $\beta$  de todos os mamíferos, os açúcares se ligam aos resíduos Asn7 e Asn24 (Figura 3) (FOX; DIAS; VAN ROEY, 2001; ULLOA-AGUIRRE; TIMOSSO, 1998).

Os oligossacarídeos presentes em FSH são altamente complexos e possuem uma estrutura central comum de cinco carboidratos: três manoses e duas acetil-glucosaminas. A glicosilação das duas subunidades de FSH se inicia assim que as cadeias polipeptídicas são formadas. Um oligossacarídeo precursor é transferido aos grupos amina das asparaginas dos sítios de glicosilação (sítios de sequência consensu Asn-X-Ser/Thr) por uma dolicol fosfatase. Ocorre processamento subsequente desse oligossacarídeo precursor no complexo de Golgi, com remoção e adição de alguns resíduos. O resultado é a formação do oligossacarídeo final, constituído da estrutura central comum onde se ligam diversas ramificações sacarídicas. Essas ramificações podem consistir de manose, fucose, galactose, N-acetil-galactosamina (GalNAc), N-acetil-glucosamina (GlcNAc) e também podem

conter resíduos de sulfato e ácido siálico (Figura 5A) (HARTREE; RENWICK, 1992; ULLOA-AGUIRRE; TIMOSSO, 1998). De acordo com sua estrutura, os oligossacarídeos N-ligados podem ser agrupados em um dos seguintes tipos: tipo rico em manose, tipo complexo e tipo híbrido. No tipo rico em manose, resíduos de manose se ligam à estrutura central comum. No tipo complexo, diferentes carboidratos podem se ligar à estrutura central. O tipo híbrido possui características dos dois outros grupos, onde resíduos de manose e também de outros carboidratos podem se ligar à estrutura comum (Figura 5B) (HARTREE; RENWICK, 1992; MACAULEY-PATRICK *et al*, 2005).

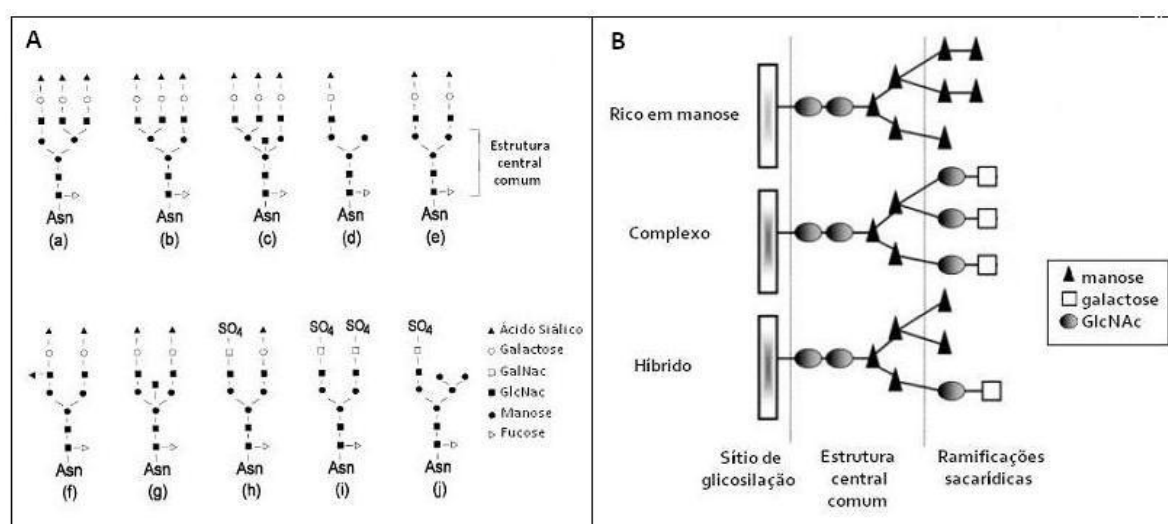


Figura 5. Glicosilação em FSH. A) Exemplos de estruturas de oligossacarídeos presentes em FSH ovino, bovino e humano. Adaptado de Ulloa-Aguirre; Timossi (1998). B) Os três tipos de estrutura de oligossacarídeos N-ligados: rico em manose, complexo e híbrido. Adaptado de Macauley-Patrick *et al* (2005).

A glicosilação de FSH é essencial para sua atividade biológica e para a determinação da sua meia-vida na circulação sanguínea (FARES, 2006; FOX; DIAS; VAN ROEY, 2001; ULLOA-AGUIRRE *et al*, 1999). A glicosilação da subunidade  $\beta$  está relacionada à meia-vida de FSH, sendo que a glicosilação de Asn24 é mais influente na taxa de secreção de FSH que a de Asn7 (FOX; DIAS; VAN ROEY, 2001). Já a glicosilação da subunidade  $\alpha$  está relacionada à atividade biológica. A glicosilação de Asn78 em humanos ou Asn82 em outros mamíferos é importante para a estabilidade térmica da proteína e a de Asn52 ou Asn56, dependendo da

espécie, está intimamente relacionada à potência biológica de FSH. Deglicosilação de Asn52 bloqueia completamente a transdução do sinal, apesar de permitir ampla ligação de FSH ao seu receptor (FARES, 2006; FOX; DIAS; VAN ROEY, 2001; ULLOA-AGUIRRE *et al*, 1999). Os resíduos de ácido siálico e sulfato presentes nos oligossacarídeos também estão envolvidos com a taxa de liberação do hormônio na circulação. A sulfatação favorece a remoção de FSH da circulação por uma proteína das células hepáticas que se liga a glicoproteínas sulfatadas. Em contraste, a presença de ácido siálico diminui sua retenção pelo fígado e conseqüentemente sua degradação (ULLOA-AGUIRRE; TIMOSSO, 1998).

Elucidações acerca da estrutura tridimensional de FSH começaram a aparecer por volta da década de 1980, a partir de estudos de análise de sequências, estudos imunológicos e estudos estruturais de dicroísmo circular e fluorescência. As análises de dicroísmo circular, por exemplo, revelavam alto conteúdo de estruturas  $\beta$  e baixo conteúdo de  $\alpha$ -hélices, o que condizia com altos conteúdos de prolina, com elevado número de ligações dissulfeto e com conformação empacotada (PIERCE; PARSONS, 1981; RYAN *et al*, 1988). Em 2001, determinou-se a estrutura cristalina do FSH humano (na forma de um mutante  $\beta$ T26A expresso em células de inseto) a uma resolução de 3.0 Å (FOX; DIAS; VAN ROEY, 2001). Essa estrutura cristalina (Figura 6) mostra que as duas subunidades de FSH apresentam topologias similares, onde o nó de cisteína é o motivo central. Cada subunidade possui seis fitas  $\beta$ , que se organizam em 3 grampos  $\beta$ , onde duas fitas  $\beta$  adjacentes se dobram adquirindo conformação antiparalela e permanecem ligadas por uma dobra  $\beta$  (ou loop) altamente flexível de 5 aminoácidos. Esses grampos são estabilizados e associados pelas ligações dissulfeto. Os três grampos  $\beta$  de cada subunidade se estendem a partir do nó de cisteína, sendo que um se estende para uma extremidade da molécula e os outros dois para a extremidade oposta. Isso faz com que os loops do primeiro e terceiro grampos (loops L1 e L3) sempre fiquem voltados para a mesma extremidade e o loop do segundo grampo (loop L2) para a extremidade oposta. O loop L2 é mais longo e mais extenso, mas sua extremidade fica mais próxima ao centro do heterodímero (DIAS; VAN ROEY, 2001). Na subunidade  $\alpha$ , o loop L2 inclui o único segmento de  $\alpha$ -hélice presente na molécula de FSH. Essa  $\alpha$ -hélice se orienta perpendicularmente às fitas  $\beta$ . O loop  $\alpha$ L2 está relacionado à formação das ligações dissulfeto do nó de cisteína e à formação do

heterodímero e contém resíduos essenciais para a ligação de FSH ao receptor. O loop  $\beta$ L2 contém resíduos importantes para a estabilização da estrutura heterodimérica e para a associação das subunidades.

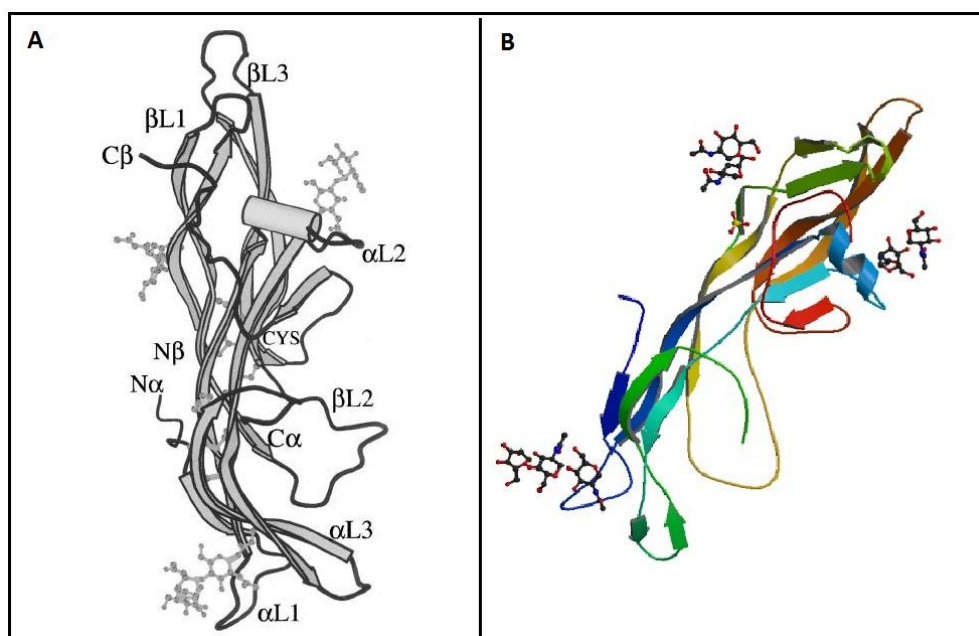


Figura 6. Estrutura cristalina de FSH. A) Imagem extraída de Dias; Van Roey (2001). B) Imagem extraída do RCSB Protein Data Bank (PDB: 1FL7).

As duas subunidades, quando associadas no dímero, se alinham de forma antiparalela e se entrelaçam intimamente de forma que os loops  $\beta$ L1,  $\alpha$ L2 e  $\beta$ L3 se voltam para uma extremidade e os outros loops para a extremidade oposta. As duas subunidades estão intimamente associadas por contatos intermoleculares. Há um segmento da subunidade  $\beta$ , um loop entre os resíduos 84 a 104 da região C-terminal, que se enrola ao redor das fitas  $\beta$  2 e 3 da subunidade  $\alpha$ , o que resulta no envolvimento da subunidade  $\alpha$  pela subunidade  $\beta$ . Esse loop foi referido como loop “cinto de segurança” e parece ser estabilizado pela ligação dissulfeto entre os resíduos Cys20 e Cys104 da subunidade  $\beta$ . Ele é essencial para a interação do FSH com seu receptor (FOX; DIAS; VAN ROEY, 2001; ULLOA-AGUIRRE; TIMOSSO, 1988).

Regiões específicas da molécula de FSH são responsáveis por funções específicas, como interação entre as duas subunidades, ligação do dímero ao

receptor ou transdução do sinal e atividade biológica (FOX; DIAS; VAN ROEY, 2001). Sabe-se que regiões tanto da subunidade  $\alpha$  quanto da  $\beta$  estão envolvidas na interação de FSH com seu receptor (ULLOA-AGUIRRE; TIMOSSI, 1998; PIERCE; PARSONS, 1981).

O receptor de FSH pertence à família dos receptores acoplados à proteína G. Os receptores que pertencem a essa família consistem de uma cadeia polipeptídica de tamanho variado que se dobra sete vezes formando uma estrutura de serpentina que atravessa a bicamada lipídica da membrana plasmática. Essas sete dobras ou hélices transmembrânicas são orientadas perpendicularmente ao plano da membrana e possuem características hidrofóbicas. Elas são conectadas por três alças intracelulares e três alças extracelulares hidrofílicas (Figura 7) (BOURNE; ROBERTS, 1997; SILVA, 2002). Mais precisamente, o receptor de FSH pertence à subfamília dos receptores que contêm repetições ricas em leucina, que são caracterizados por longos domínios extracelulares ricos em repetições de leucina (FAN; HENDRICKSON, 2005). Os domínios extracelulares são responsáveis pela especificidade e alta afinidade da ligação hormônio-receptor. Os domínios transmembrana e intracelulares são responsáveis pela ativação do receptor e da cascata de transdução do sinal via proteína G (FAN; HENDRICKSON, 2005; BOURNE; ROBERTS, 1997; SILVA, 2002).

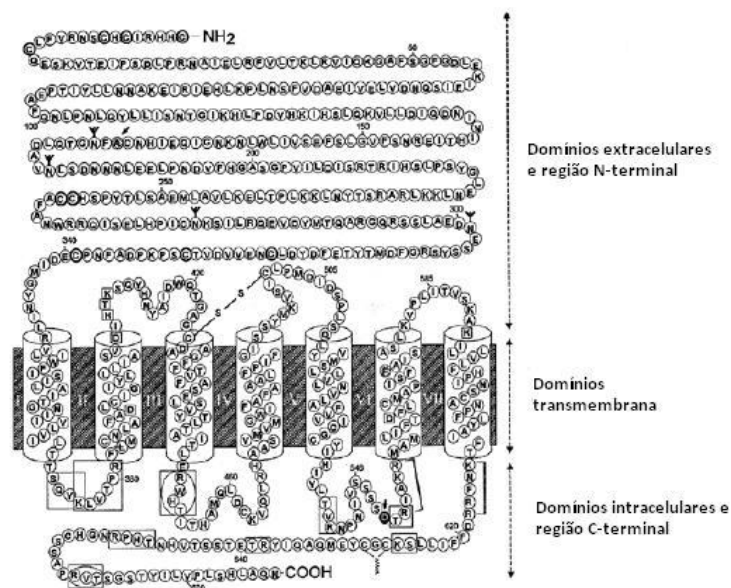


Figura 7. Estrutura do receptor de FSH, mostrando os domínios extracelulares, transmembranosos e intracelulares. Adaptado de Aguirre e Timossi (1998).



O receptor de FSH se enrola ao redor da molécula de FSH, interagindo com os loops  $\alpha$ L2 e  $\beta$ L2, com a região C-terminal de  $\alpha$  e com o loop C-terminal de  $\beta$ . Há, portanto, envolvimento substancial das duas subunidades de FSH na interação com o receptor (FAN; HENDRICKSON, 2005; FOX; DIAS; VAN ROEY, 2001).

### 1.2.3 Produção comercial

O FSH para uso veterinário é produzido principalmente a partir de extratos hipofisários de porcos. Os métodos de produção são muitas vezes exaustivos. As preparações hormonais de fontes animais devem passar por extensivo processamento, a fim de concentrar e purificar a proteína desejada e de diminuir o risco de transmissão acidental de doenças. Como técnica para diminuir a transmissão de doenças, as preparações de gonadotrofinas para uso veterinário são usualmente obtidas de espécies de animais que não serão as espécies receptoras do hormônio, pois muitos patógenos são espécie-específicos (KONING *et al*, 1994).

As preparações de FSH obtidas a partir de extratos hipofisários nunca são completamente puras, apresentando traços de outras gonadotrofinas. Essa contaminação de FSH com outros hormônios pode ser prejudicial no momento da sua utilização em tratamentos hormonais de bovinos. Um dos grandes problemas na administração de FSH é a contaminação das preparações disponíveis com LH, que apresenta efeitos negativos na produção e na qualidade dos embriões bovinos. O nível máximo de contaminação com LH em uma preparação de FSH deveria ser de 15 a 20% (BARROS; NOGUEIRA, 2004).

Para uso na medicina, a hipófise poderia ser uma fonte de FSH, mas isso obviamente não constitui um método industrialmente útil para obtenção de hormônios humanos. A urina, em contrapartida, é uma fonte muito utilizada. Desde 1960, FSH da urina de mulheres que se encontram na pós-menopausa é usado na medicina. A produção de uma dose (7,5 mg) de FSH requer aproximadamente 2,5 L de urina. Por causa das relações bioquímicas e estruturais existentes entre as gonadotrofinas, as preparações de FSH humano urinário podem conter contaminações de outros hormônios glicoprotéicos (KONING *et al*, 1994).

É importante que se busque o desenvolvimento de novas metodologias para a produção de FSH para aplicação tanto na medicina quanto na veterinária. A tecnologia do DNA recombinante apresenta algumas vantagens, pois pode solucionar os problemas de purificação, fonte e transmissão de patógenos associados aos métodos tradicionais de aquisição de hormônios glicoprotéicos. A escolha dos sistemas de expressão heteróloga é altamente importante, já que o FSH é glicosilado e a glicosilação influencia na bioatividade e na meia-vida do hormônio na circulação (KONING *et al*, 1994).

Na década de 1990, indústrias farmacêuticas deram passos importantes para a produção de FSH recombinante. As empresas Ares-Serono da Suíça e Orthon dos EUA foram as pioneiras nas pesquisas nessa área (KONING *et al*, 1994). Elas conseguiram expressar eficientemente FSH humano (hFSH) recombinante em células de ovário de hamster (células CHO). O hFSH recombinante induziu superovulação em animais, sendo depois testado em humanos, apresentando resultados satisfatórios no tratamento de subfertilidade. Posteriormente, a empresa Organon da Holanda também buscou o desenvolvimento de hFSH recombinante e conseguiu produzir um hormônio (também em células CHO) que apresentou resultados muito satisfatórios em testes clínicos (KONING *et al*, 1994; LEEUW *et al*, 1996). Hoje em dia, os hFSHs recombinantes das empresas Serono e Organon estão disponíveis no mercado brasileiro. Seus nomes comerciais são Gonal-F e Puregon, respectivamente, e eles são amplamente utilizados em tratamentos reprodutivos no Brasil (LONGUI, 2005). A eficácia de tais preparações é comparável à de FSHs urinários na estimulação do desenvolvimento folicular em mulheres que utilizam fertilização *in vitro*. Além disso, eles oferecem vantagens por poderem ser produzidos continuamente em grandes quantidades com alto nível de pureza (GARCIA-CAMPAYO; BOIME, 2001). O hFSH obtido a partir da urina continua a ser comercializado e também está disponível no mercado brasileiro (LONGUI, 2005).

Apesar de Gonal-F e Puregon serem as únicas preparações de hFSH recombinante disponíveis para comercialização, seu desenvolvimento foi impactante no ambiente científico e levou a um crescente interesse pela busca de novas estratégias para a produção de gonadotrofinas recombinantes. Diversos grupos de pesquisa começaram a arquitetar estratégias estruturais variadas para a obtenção de hormônios glicoprotéicos recombinantes. Quanto às gonadotrofinas humanas

recombinantes, o principal sistema de expressão heteróloga utilizado foi o das células CHO. No entanto, as formas de se expressar os hormônios foram diversas. Nos primeiros experimentos, procurava-se a expressão das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  separadamente. Esperava-se posterior interação eficiente das duas subunidades, mas problemas de estequiometria e de dissociação eram percebidos. Buscou-se o desenvolvimento de modelos que pudessem superar essas limitações relativas à associação das duas subunidades (GARCIA-CAMPAYO; BOIME, 2001). Nesse sentido, gonadotrofinas com as duas subunidades fusionadas foram produzidas. A primeira gonadotrofina a ser produzida dessa forma foi a gonadotrofina coriônica humana (hCG) (SUGAHARA *et al*, 1995). A região C-terminal de  $\beta$  foi geneticamente fusionada à região N-terminal de  $\alpha$  (hCG $\beta\alpha$ ). A região C-terminal da subunidade  $\beta$  de hCG funcionou como uma ponte conectora entre as duas subunidades. Isso porque a região C-terminal de  $\beta$  de CG, denominada de CTP (*C-terminal peptide*) difere das de FSH, LH e TSH, por apresentar uma extensão de 30 resíduos de aminoácidos rica em prolina e serina com pelo menos quatro oligossacarídeos O-ligados (PIERCE; PARSONS 1981; HARTRE; RENWICK, 1992; GARCIA-CAMPAYO; BOIME, 2001). Esse hormônio recombinante apresentou atividade biológica comparável à do heterodímero nativo. A partir desse modelo, cadeias fusionadas de FSH, LH e TSH também foram desenvolvidas. No entanto, devido à curta extensão da região C-terminal das subunidades  $\beta$  desses hormônios, o espaçamento entre as duas subunidades no dímero ficou reduzido, o que poderia perturbar a conformação tridimensional da proteína (GARCIA-CAMPAYO; BOIME, 2001). Desse modo, a adição de sequências espaçadoras exógenas entre as subunidades  $\beta$  e  $\alpha$  de FSH, LH e TSH começou a ser considerada. hFSH de fusão  $\beta\alpha$ , por exemplo, já foi expresso com sequências espaçadoras (SUGAHARA *et al*, 1996). CTP de CG já foi usado como peptídeo conector entre as duas subunidades de gonadotrofinas (GARCIA-CAMPAYO; BOIME, 2001). Ligações dissulfeto entre as duas subunidades também foram utilizadas como espaçadores. Quimeras de fusão tripla, com subunidades  $\alpha$  ligadas a duas subunidades  $\beta$  diferentes, também já foram expressas em células CHO (GARCIA-CAMPAYO; BOIME, 2001b).

Quanto à produção de FSH recombinante para uso veterinário, não existem preparações comerciais disponíveis. No entanto, FSHs animais já foram expressos em diversos sistemas de expressão heteróloga por diversos grupos de pesquisa.

FSH bovino (bFSH) já foi produzido em leite de camundongos e de coelhos transgênicos (GREENBERG *et al*, 1991; COULIBALY *et al*, 2002), em baculovírus (VAN DE WIEL *et al*, 1998), em plantas (DIRNBERGER *et al*, 2001), na levedura metilotrófica *Hansenula polymorpha* (QIAN *et al*, 2009) e na levedura metilotrófica *Pichia pastoris* (HUO *et al*, 2007). Expressão em *Pichia pastoris* também foi realizada para FSH de peixe (*Danio rerio*) (YU *et al*, 2008), de tilápia (AIZEN *et al*, 2007), de ovelhas (FIDLER *et al*, 2003) e de porco (RICHARD *et al*, 1998; BOZE *et al*, 2000).

As estratégias estruturais para a expressão de FSH recombinante para uso veterinário também são diversas. Já foram produzidos FSHs bovinos (bFSH) onde as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  separadas eram co-expressas (GREENBERG *et al*, 1991; VAN DE WIEL *et al*, 1998; COULIBALY *et al*, 2002; HUO *et al*, 2007; QIAN *et al*, 2009). Esses bFSHs eram biologicamente ativos, mas os níveis de expressão foram muito baixos. bFSH com as subunidades fusionadas também já foi expresso e utilizado em testes de superovulação de camundongos, mas apresentou atividade biológica menor que a de gonadotrofinas naturais (DIRNBERGER *et al*, 2001). FSH de porco já foi produzido com as duas subunidades separadas, clonadas em vetores diferentes co-expressos (BOZE, 2000; RICHARD *et al*, 1998). FSH de ovelhas já foi produzido com as subunidades em fusão  $\beta\alpha$  separadas por um espaçador pequeno de dois aminoácidos, sendo capaz de se ligar ao receptor apresentando atividade biológica (FIDLER *et al*, 2003). FSH de peixe biologicamente ativo (*Danio rerio*) já foi produzido tanto com as subunidades separadas como fusionadas, mas conectadas por seis histidinas (YU *et al*, 2008). FSH de tilápia também já foi produzido em fusão  $\beta\alpha$  com o espaçador de seis histidinas (AIZEN *et al*, 2007).

Abaixo está representada uma tabela mostrando os diferentes tipos de FSH animais já expressos, indicando os sistemas heterólogos e as estratégias estruturais utilizados para sua expressão, bem como a presença ou ausência de atividade biológica.

Tabela 1. Diferentes tipos de FSH animais já expressos, indicando os sistemas heterólogos e as estratégias estruturais utilizadas para sua produção e a presença ou ausência de atividade biológica.

FSH	Sistema Heterólogo	Estrutura	Atividade biológica	Referência
Bovino	Leite de camundongo	Subunidades $\alpha$ e $\beta$ separadas	Biologicamente ativo	Greenberg <i>et al</i> , 1991
Bovino	Leite de coelho	Subunidades $\alpha$ e $\beta$ separadas	Biologicamente ativo	Coulibaly <i>et al</i> , 2002
Bovino	Baculovírus	Subunidades $\alpha$ e $\beta$ separadas	Biologicamente ativo	Van de Wiel <i>et al</i> , 1998
Bovino	Planta	Subunidades $\alpha$ e $\beta$ fusionadas sem espaçador	Biologicamente ativo	Dirnberger <i>et al</i> , 2001
Bovino	<i>Hansenula polymorpha</i>	Subunidades $\alpha$ e $\beta$ separadas	Biologicamente ativo	Qian <i>et al</i> , 2009
Bovino	<i>Pichia pastoris</i>	Subunidades $\alpha$ e $\beta$ separadas	Biologicamente ativo	Huo <i>et al</i> , 2007
Peixe	<i>Pichia pastoris</i>	Subunidades $\alpha$ e $\beta$ separadas e em fusão $\beta\alpha$ /espaçador de 6 histidinas	Biologicamente ativo	Yu <i>et al</i> , 2008
Tilápia	<i>Pichia pastoris</i>	Subunidades $\alpha$ e $\beta$ em fusão $\beta\alpha$ /espaçador de 6 histidinas	Biologicamente ativo	Aizen <i>et al</i> , 2007
Ovelha	<i>Pichia pastoris</i>	Subunidades $\alpha$ e $\beta$ em fusão $\beta\alpha$ /espaçador de 2 aminoácidos	Biologicamente ativo	Fidler <i>et al</i> , 2003
Porco	<i>Pichia pastoris</i>	Subunidades $\alpha$ e $\beta$ separadas	Biologicamente ativo	Richard <i>et al</i> , 1998 Boze <i>et al</i> , 2000

### 1.3 Expressão heteróloga em *Pichia pastoris*

Leveduras vêm se estabelecendo como importantes ferramentas biotecnológicas para a produção de proteínas heterólogas de aplicação tecnológica e industrial. *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, dentre outros, vêm se fortalecendo como importantes sistemas de expressão heteróloga (ROMANOS; SCORER; CLARE, 1992; HOLLENBERG; GELLISSEN, 1997).

*S. cerevisiae* foi a primeira levedura a ser utilizada como sistema de expressão, devido à grande quantidade de conhecimentos acumulados sobre sua genética e fisiologia. No entanto, essa levedura nem sempre se mostrou como ideal para a expressão de proteínas, apresentando muitas vezes níveis baixos de produção (CREGG; VEDVICK; RASCHKE, 1993).

*P. pastoris* já foi utilizada com sucesso para a expressão de uma grande variedade de proteínas heterólogas (HIGGINS, 1995; CEREGHINO *et al*, 2002). Esse sistema de expressão apresenta diversas vantagens quando comparado a outros. *P. pastoris* cresce rapidamente atingindo altas densidades celulares em meios de cultura simples. Sua manipulação genética é fácil e rápida. É uma levedura que permite altos níveis de produção de proteínas, que podem ser expressas em ambiente intracelular ou secretadas para o meio de cultura. Possui sistema de modificação pós-traducional, possibilitando processamento e dobramento protéico, glicosilação e formação de ligações dissulfeto (ROMANOS, 1995; HIGGINS, 1995; CEREGHINO *et al*, 2002). É o sistema de expressão mais simples de ser escalonado, o que o torna muito atrativo para a produção de proteínas em escala industrial (ROMANOS, 1995; MACAULEY-PATRICK *et al*, 2005). É mais fácil, rápido e barato que outros sistemas eucarióticos de expressão como baculovírus ou células de mamífero (HIGGINS, 1995). Essas características fazem de *P. pastoris* uma levedura muito útil para a produção de diversas proteínas (CEREGHINO *et al*, 2002).

O sistema de expressão em *P. pastoris*, no entanto, assim como qualquer outro sistema de expressão heteróloga, não se encontra isento de dificuldades e desvantagens (ROMANOS, 1995). O problema mais comum relativo a esse sistema é o de proteólise de peptídeos secretados. Muitas proteínas produzidas em *Pichia* permanecem instáveis no meio de cultura, onde podem ser rapidamente degradadas por proteases (CREGG *et al*, 2000). Outro problema é a secreção ineficiente de proteínas complexas. Além disso, exemplos de produção baixa ou falhas na produção se acumulam e alguns genes não dão origem a proteínas detectáveis em *Pichia* (ROMANOS, 1995).

A expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris* é alcançada pela introdução e integração de vetores de expressão na levedura. Isso pode ser realizado com a utilização de diversas metodologias como: remoção enzimática da parede celular e formação de esferoplastos; tratamento com cloreto de lítio; e

eletroporação (ROMANOS; SCORER; CLARE, 1992). Eletroporação é a metodologia que se tornou mais popular, possibilitando eficientes transformações (DALY; HEARN, 2005). Os vetores para a transformação de *Pichia* são diversos e diferem principalmente com relação às marcas de seleção, à presença ou ausência de sequências sinal de secreção e ao tipo de promotor utilizado.

Os marcadores de seleção utilizados na transformação de *Pichia* são diversos e podem ser auxotróficos ou dominantes (ROMANOS; SCORER; CLARE, 1992). O marcador auxotrófico mais utilizado em *Pichia* é o gene da histidinol desidrogenase - *HIS4* (ROMANOS, 1995). Esse marcador é utilizado para a transformação de linhagens celulares mutantes que não possuem esse gene (GS115, KM71 e SMD1168, por exemplo). Essas linhagens são incapazes de crescer em meio sem histidina. Quando transformadas com um vetor que contém a marca de seleção *HIS4*, esse gene compensa a produção de histidina e os transformantes são selecionados pela habilidade de crescer em meio sem histidina.

Os marcadores de seleção dominantes mais utilizados são genes de resistência a kanamicina ou a zeocina (CREGG *et al*, 2000). Após transformação com esses vetores, os mutantes são selecionados pela habilidade de crescer em meio contendo o antibiótico em questão. A seleção direta dos transformantes é ineficiente. Portanto, logo após a transformação, os mutantes devem ser plaqueados primeiramente em meios não-seletivos para depois serem selecionados com o antibiótico (ROMANOS; SCORER; CLARE, 1992).

Em *Pichia pastoris*, as proteínas podem ser secretadas para o meio de cultura ou expressas intracelularmente. A secreção pode ser necessária para correto dobramento de cadeias polipeptídicas e é vantajosa no processo de purificação, pois o produto secretado se encontra em meio com pouquíssima quantidade de outras proteínas (ROMANOS; SCORER; CLARE, 1992). A secreção requer a presença de uma sequência ou peptídeo sinal na proteína expressa para que ela possa seguir a via de secreção. A sequência de DNA que codifica esse sinal de secreção é colocada adjacente ao promotor dentro do vetor de expressão. Uma grande variedade de peptídeos sinal já foi utilizada, incluindo o sinal nativo presente em algumas proteínas heterólogas. O sucesso das sequências sinal diferentes é variável. A sequência sinal de secreção do *mating factor*  $\alpha$  (MF- $\alpha$ ) de *S. cerevisiae*

vem sendo utilizada com maior sucesso. A sequência sinal derivada do gene da fosfatase ácida (*PH01*) também é utilizada (CREGG *et al*, 2000).

Com relação aos promotores, o promotor *AOX1* foi o primeiro a ser desenvolvido para expressão em *Pichia* e até hoje é um dos mais utilizados. *P. pastoris* é uma levedura metilotrófica, ou seja, é capaz de utilizar metanol como única fonte de carbono pela ativação de uma via metabólica específica. A primeira etapa dessa via é a oxidação de metanol a formaldeído pela enzima álcool oxidase, com a liberação de peróxido de hidrogênio. Para evitar a toxicidade do peróxido de hidrogênio, essa reação ocorre dentro dos peroxissomos (HIGGINS, 1995). Quando *P. pastoris* se encontra em meio com metanol como única fonte de carbono, a enzima álcool oxidase e outras enzimas da via de utilização do metanol são produzidas em altos níveis (CREGG; VEDVICK; RASCHKE, 1993; HOLLENBERG; GELLISSEN, 1997). A álcool oxidase chega a representar mais de 30% das proteínas solúveis das células nessas condições. Quando em meios com glicose, glicerol ou etanol como fonte de carbono, a enzima é indetectável (CREGG; VEDVICK; RASCHKE, 1993). Dois genes codificam a álcool oxidase, os genes *AOX1* e *AOX2*. *AOX1* é o principal responsável pela presença da enzima na célula (HIGGINS, 1995). O promotor *AOX1* é um promotor forte e altamente regulado a nível transcricional. Ele se encontra reprimido em meio contendo glicose e é induzido em meio contendo somente metanol como fonte de carbono. Qualquer traço de glicose, mesmo na presença de metanol, é capaz de reprimir o gene (CEREGHINO *et al*, 2002). Devido a essas características, o promotor *AOX1* se tornou visado para utilização na regulação da expressão de proteínas heterólogas em *Pichia pastoris* (CREGG; VEDVICK; RASCHKE, 1993; HOLLENBERG; GELLISSEN, 1997). O gene *AOX1* foi isolado e uma versão desse promotor é utilizada em vetores a fim de levar à expressão do gene de interesse que codifica a proteína desejada (KOUTZ *et al*, 1989).

Recentemente, vetores que contêm promotores alternativos ao *AOX1* vêm sendo muito utilizados. Esses promotores não requerem a indução com metanol, que pode ser indesejada em alguns casos, como por exemplo, na produção de produtos alimentícios ou em fermentações em larga escala, que requerem grandes quantidades de metanol, que é inflamável (CEREGHINO; CREGG, 2000). Os promotores constitutivos derivados do gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase



(*GAPDH*) de *P. pastoris* (CREGG *et al*, 2000) e do gene *PGK1* que codifica a 3-fosfoglicerato quinase (ALMEIDA; MORAES; TORRES, 2005; ARRUDA, 2008) são utilizados com sucesso. Esses promotores permitem a expressão constitutiva de proteínas heterólogas em meio com glicose ou glicerol. Os níveis de expressão são comparáveis e às vezes até maiores que os de *AOX1*. Esses promotores são vantajosos por não demandarem a troca de meios de cultura com fontes de carbono diferentes. No entanto, por serem constitutivos, não são recomendáveis para a expressão de proteínas tóxicas (CEREGHINO; CREGG, 2000).

A transformação de *P. pastoris* ocorre por integração do cassete de expressão em loci específicos do cromossomo, gerando transformantes estáveis. A integração no genoma ocorre por recombinação homóloga quando o cassete de expressão contém regiões homólogas ao genoma de *Pichia*, sendo que ela pode ocorrer via inserção ou substituição (DALY; HEARN, 2005).

Em vetores com promotor *AOX1* a integração por inserção normalmente ocorre em 1 a 10% dos transformantes e pode resultar em múltiplos eventos de integração *in tandem* devido a repetidas recombinações. Já a integração por substituição ocorre a uma frequência de 5 a 25% dos transformantes e geralmente resulta em transformantes com uma única cópia do gene desejado. No entanto, esses transformantes são mais estáveis geneticamente. A substituição é alcançada quando se digere o vetor de maneira que suas extremidades 5' e 3' correspondam às extremidades 5' e 3' do *AOX1* cromossomal. Dessa forma, a transformação resulta na remoção sítio-específica do gene *AOX1* (DALY; HEARN, 2005). A remoção do gene *AOX1* faz com que os transformantes apresentem fenótipo Mut<sup>s</sup> (CEREGHINO; CREGG, 2000). Mut<sup>s</sup> é o fenótipo que resulta da redução da habilidade da célula em metabolizar metanol. Esses transformantes exibem crescimento pobre em meio contendo metanol como fonte de carbono. O fenótipo Mut<sup>+</sup> se refere à habilidade normal (semelhante à das células selvagens) em metabolizar metanol como única fonte de carbono. Células Mut<sup>+</sup> geralmente resultam da inserção gênica e exibem crescimento normal em meio contendo metanol. A vantagem dos transformantes de fenótipo Mut<sup>s</sup> é que eles utilizam menos metanol e às vezes expressam níveis mais elevados de proteína do que os transformantes Mut<sup>+</sup> (CEREGHINO; CREGG, 2000). No entanto, existem casos em que os dois fenótipos não mostram diferenças de expressão (FIDLER *et al*, 2003).

O sistema de expressão em *Pichia pastoris* apresenta sucesso na expressão de proteínas que possuem elevadas quantidades de ligações dissulfeto. Além disso, esse sistema permite o dobramento e a glicosilação das proteínas formadas (DALY; HEARN, 2005). *P. pastoris* é capaz de adicionar oligossacarídeos N-ligados e O-ligados às proteínas secretadas (CEREGHINO *et al*, 2002). A glicosilação realizada por *Pichia* difere da realizada por eucariotos superiores, e em alguns casos, os oligossacarídeos adicionados podem ser antigênicos (CREGG *et al*, 2000; CEREGHINO *et al*, 2002). No entanto, em comparação com *S. cerevisiae*, *P. pastoris* possui a vantagem de não hiperglicosilar as proteínas secretadas. Ambas as leveduras adicionam oligossacarídeos do tipo rico em manose (Figura 5) aos sítios de glicosilação, sendo que ocorre processamento posterior desses carboidratos. Nesse processamento, a quantidade de cadeias sacarídicas adicionadas por *P. pastoris* ao carboidrato precursor é muito menor que em *S. cerevisiae* (MACAULEY-PATRICK *et al*, 2005). *Pichia pastoris* adiciona carboidratos que consistem basicamente de 8 a 9 manoses e 2 N-acetil-glucosaminas. Essa estrutura pode, no entanto, ser estendida por manosiltransferases que adicionam mais resíduos de manose (MACAULEY-PATRICK *et al*, 2005; CEREGHINO *et al*, 2002). *S. cerevisiae* introduz ligações  $\alpha$ 1,3 glicana aos carboidratos e *Pichia* não adiciona essas ligações. Hiperglicosilação e ligações  $\alpha$ 1,3 glicana tornam as proteínas produzidas em *S. cerevisiae* altamente antigênicas, impossibilitando sua utilização terapêutica (CREGG *et al*, 2000).

A produção de proteínas heterólogas em *Pichia pastoris* normalmente é realizada em frascos de cultura. No entanto, a expressão pode ser otimizada com o cultivo de *Pichia* em fermentador. Os níveis protéicos em fermentadores costumam ser muito maiores do que em frasco. Somente em fermentadores parâmetros tão importantes para o crescimento de *P. pastoris*, como pH, aeração e alimentação com a fonte de carbono adequada ou com o agente indutor, podem ser finamente controlados (CEREGHINO *et al*, 2002). Dessa forma, altas densidades celulares podem ser alcançadas. A produção de proteínas heterólogas em fermentador é geralmente alcançada por um processo de três estágios. A seguir estão descritos os estágios para a fermentação de culturas transformadas com vetores que contenham o promotor *AOX1*. O primeiro estágio é o de crescimento em batelada, onde há acúmulo de biomassa. O segundo estágio é a fase alimentada com glicerol, que

também leva a acúmulo de biomassa, seguida de um período sem alimentação com glicerol para preparação das células para a indução. O terceiro estágio é a fase de indução, alimentada com metanol, que leva à produção de altos níveis das proteínas desejadas (CEREGHINO *et al*, 2002).

Devido a todas as características desse sistema de expressão, *Pichia pastoris* se torna uma plataforma atraente para a expressão de diversas proteínas heterólogas, inclusive de FSH bovino recombinante. Proteínas que apresentaram problemas para serem expressas de forma eficiente em *S. cerevisiae*, bactérias ou baculovírus têm sido produzidas com sucesso em *P. pastoris* (CEREGHINO *et al*, 2002). Há aproximadamente 50 a 75% de probabilidade de se conseguir expressar qualquer proteína de interesse a um nível razoável em *P. pastoris* (CREGG *et al*, 2000). Além disso, após a detecção da expressão de proteínas a qualquer nível, existem diversos parâmetros que podem ser manipulados para otimização da produção nesse microorganismo (CREGG *et al*, 2000).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Este trabalho visa a produção de FSH bovino (*Bos indicus* – bFSH) recombinante em *Pichia pastoris*, utilizando três construções gênicas: *bFSH-fus*, *bFSH-L* e *bFSH-CTP*. Em *bFSH-fus* os genes das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  estão em uma fusão do tipo  $\beta\alpha$ ; em *bFSH-CTP*, os genes das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  estão em uma fusão do tipo  $\beta\alpha$  separados pelo peptídeo CTP de gonadotrofina coriônica de equino (*Equus caballus* – eCG ); em *bFSH-L*, os genes das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  estão em uma fusão do tipo  $\beta\alpha$  separadas por um peptídeo conector (*linker*) sintético. Este projeto é uma iniciativa induzida pela empresa Ouro Fino Saúde Animal, sediada em Cravinhos (SP), que comercializa diversos produtos de uso veterinário.

### 2.2 Objetivos específicos

- Desenho dos genes sintéticos *bFSH-Fus*, *bFSH-CTP* e *bFSH-L* com códons otimizados para expressão em *Pichia pastoris*;
- Clonagem dos genes em vetores de expressão para *Pichia pastoris*;
- Transformação de *Pichia pastoris* com os vetores de expressão e seleção de clones positivos;
- Expressão das proteínas recombinantes em frasco;
- Purificação das proteínas recombinantes;
- Caracterização físico-química das proteínas recombinantes;
- Otimização da produção das proteínas de fusão em colaboração com a empresa Ouro Fino.

### 3 MATERIAIS

#### 3.1 Microorganismos

##### 3.1.1 Bactérias

*Escherichia coli* linhagem DH5- $\alpha$  (Gibco BRL) - *endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1  $\Delta$ lacU169 ( $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15) IU169 dcoR phoA.*

##### 3.1.2 Leveduras

*Pichia pastoris* linhagem GS115 (Invitrogen) – *his4*

#### 3.2 Meios de cultura

Os meios de cultura foram preparados com água destilada e esterilizados em autoclave a 120°C por 20 minutos. Filtração em membrana de 0,2  $\mu$ m foi utilizada para esterilização nos casos de sensibilidade térmica dos reagentes.

##### 3.2.1 Meios para cultivo de bactérias

Meio Luria-Bertani (LB)

Peptona de caseína	1% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
Cloreto de sódio	1% (p/v)
pH 7,2	

Meio LB ágar

Meio LB acrescido de ágar bacteriológico a 1,5% (p/v).

## Ampicilina

Quando necessário, a ampicilina foi adicionada ao meio LB ou LB ágar na concentração final de 100 µg/mL.

### 3.2.2 Meios para cultivo de leveduras

#### Meio extrato de levedura peptona dextrose (YPD)

Extrato de levedura	1% (p/v)
Peptona de caseína	2% (p/v)
Glicose	2% (p/v)
pH 7,2	

#### Meio YPD ágar

Meio YPD acrescido de ágar bacteriológico a 2% (p/v).

#### Meio mínimo com glicose (MD)

YNB	1,34% (p/v)
Biotina	4 x10 <sup>-5</sup> % (p/v)
Glicose	2% (p/v)

#### Meio MD ágar

Meio MD acrescido de ágar bacteriológico a 2% (p/v).

#### Meio mínimo com metanol (MM)

YNB	1,34% (p/v)
Biotina	4 x10 <sup>-5</sup> % (p/v)
Metanol	0,5% (v/v)

#### Meio MM ágar

Meio MM acrescido de ágar bacteriológico a 2% (p/v).

#### Meio mínimo com glicerol (MGY)

Tampão fosfato pH 6,0	100 mM
-----------------------	--------

YNB	1,34% (p/v)
Biotina	$4 \times 10^{-5}$ % (p/v)
Glicerol	1%

#### Meio complexo tamponado com glicerol (BMGY)

Extrato de levedura	1% (p/v)
Peptona de caseína	2% (p/v)
Tampão fosfato pH 6,0	100 mM
YNB	1,34% (p/v)
Biotina	$4 \times 10^{-5}$ % (p/v)
Glicerol	1% (v/v)

#### Meio complexo tamponado com metanol (BMMY)

Extrato de levedura	1% (p/v)
Peptona de caseína	2% (p/v)
Tampão fosfato pH 6,0	100 mM
YNB	1,34% (p/v)
Biotina	$4 \times 10^{-5}$ % (p/v)
Metanol	0,5% (v/v)

#### Meio de fermentação com sais (1L)

Citrato de potássio	2,1 g
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	11,7 g
CaSO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	1,0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,17 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	14,33 g
Glicerol	40,0 g

#### Solução de sais (1L)

NaI	0,08 g
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	3,0 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	0,2 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,02 g
CoCl <sub>2</sub>	1,0 g

ZnCl <sub>2</sub>	7,0 g
FeSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O	22 g
Biotina	0,2 g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0 mL/L

### 3.3 Soluções

As soluções estão listadas abaixo agrupadas de acordo com a metodologia em que foram empregadas.

As soluções foram preparadas com água destilada. Quando necessária a esterilização, foi utilizada autoclave (120°C por 20 minutos) ou filtração em membrana de 0,2 µm.

#### 3.3.1 Soluções para extração de DNA plasmidial

##### Tampão TE

Tris-HCl pH 8,0	10 mM
EDTA pH 8,0	1,0 mM

##### Solução II

Hidróxido de sódio	200 mM
SDS	1% (p/v)

##### Solução III

Acetato de sódio ou de potássio 5 M pH 4,8

#### 3.3.2 Soluções para eletroforese de DNA em gel de agarose

##### Tampão de corrida Tris-EDTA-Borato (TEB) 0,5X

Trizma base	45 mM
Ácido Bórico	45 mM
EDTA	1 mM



**Gel de agarose 0,8%**

Agarose	0,8%
Tampão TEB	0,5X
Brometo de etídio	0,5 µg/mL

**Tampão de amostra 10X**

Azul de bromofenol	0,1% (p/v)
Glicerol	50% (v/v)
Xileno cianol	0,1% (p/v)

**3.3.3 Soluções para precipitação de proteínas****Ácido tricloroacético (TCA) 100%**

Dissolver 500 g de TCA em 227 mL de água destilada. Armazenar a 4°C e protegido da luz.

**3.3.4 Soluções para eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)****Tampão de amostra 2X**

Tris-HCl 1 M pH 6,8	200 mM
SDS	4% (p/v)
β-mercaptoetanol	4% (v/v)
Glicerol	20% (v/v)
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)

**Tampão de corrida - Tris-glicina 5X (solução estoque)**

Trizma base	125 mM
Glicina	0,96 M
SDS	0,5% (p/v)

**Gel separador 12%**

Acrilamida/Bisacrilamida (30/0,8)	2,0 mL
Tris-HCl 3,0 M pH 8,8	0,625 mL

Água destilada	2,3 mL
SDS 10% (p/v)	0,05 mL
APS 10% (p/v)	0,025 mL
TEMED (Gibco BRL)	0,002 mL

#### Gel concentrador 4%

Acrilamida/Bisacrilamida (30/0,8)	0,325 mL
Tris-HCl 0,5M pH 6,8	0,625 mL
Água destilada	1,525 mL
SDS 10% (p/v)	0,025 mL
APS 10% (p/v)	0,0125 mL
TEMED (Gibco BRL)	0,002 mL

### 3.3.5 Soluções para coloração de gel de poliacrilamida com *comassie blue*

#### Solução corante

<i>Comassie brilliant blue</i> R-250	0,25% (p/v)
Metanol	40% (v/v)
Ácido acético	10% (v/v)

#### Solução descorante

Metanol	40% (v/v)
Ácido acético	10% (v/v)

### 3.3.6 Soluções para coloração de gel de poliacrilamida com prata

#### Solução I (fixação)

Metanol	50% (v/v)
Ácido acético	12% (v/v)
Formaldeído	0,1% (v/v)

#### Solução II (lavagem)

Etanol	50% (v/v)
--------	-----------

Solução III (tratamento)		
Tiosulfato de sódio		0,02% (p/v)
Solução IV (equilíbrio)		
Nitrato de prata		0,2% (p/v)
Formaldeído		0,075% (v/v)
Solução V (revelação)		
Carbonato de sódio		6% (p/v)
Tiosulfato de sódio		$4 \times 10^{-4}$ % (p/v)
Formaldeído		0,05% (v/v)
Solução VI (parada)		
Metanol		50% (v/v)
Ácido acético		12% (v/v)
Solução VII		
Metanol		50% (v/v)

### 3.3.7 Soluções para *imuno blot, dot blot e western blot*

Tampão de transferência		
Trizma base		48 mM
Glicina		39 mM
SDS		0,037%
Metanol		20%
TBST		
Tris-HCl pH 7,6		50 mM
Cloreto de sódio		150 mM
Tween 20		0,1%
PBS 10X (solução estoque)		
Cloreto de sódio		1,5 M

Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4	0,1 M
--	-------

**PBST**

PBS 10X	10% (v/v)
---------	-----------

Tween 20	0,1% (v/v)
----------	------------

**Solução de bloqueio**

PBST acrescido de leite em pó desnatado a 5% (p/v).

**Tampão da fosfatase alcalina (APB)**

Cloreto de sódio	100 mM
------------------	--------

Tris-HCl pH 9,5	100 mM
-----------------	--------

Cloreto de magnésio	5 mM
---------------------	------

**3.3.8 Soluções para diálise****Tampão para diálise**

Tampão fosfato de sódio	20 mM
-------------------------	-------

Cloreto de sódio	100 mM
------------------	--------

pH 7,0

**3.3.9 Soluções para cromatografia de exclusão molecular****Solução de eluição**

Tampão fosfato de sódio	20 mM
-------------------------	-------

Cloreto de sódio	100 mM
------------------	--------

pH 7,0

**3.3.10 Soluções para cromatografia de fase reversa****Solvente A**

Ácido trifluoracético (TFA)	0,1% (v/v)
-----------------------------	------------

### Solvente B

Acetonitrila (ACN)	100%
Ácido trifluoracético (TFA)	0,1% (v/v)

### 3.3.11 Soluções para espectrometria de massa

#### Matriz $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (0,5 mL)

Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico	5 mg
Acetonitrila (ACN) 100%	250 $\mu$ L
Água miliQ	200 $\mu$ L
Ácido trifluoracético (TFA) 3%	50 $\mu$ L

### 3.4 Vetores

#### Vetor pPIC9 (Invitrogen)

Vetor de 8 kb utilizado para expressão dos genes desejados em *Pichia pastoris* (Figura 8).

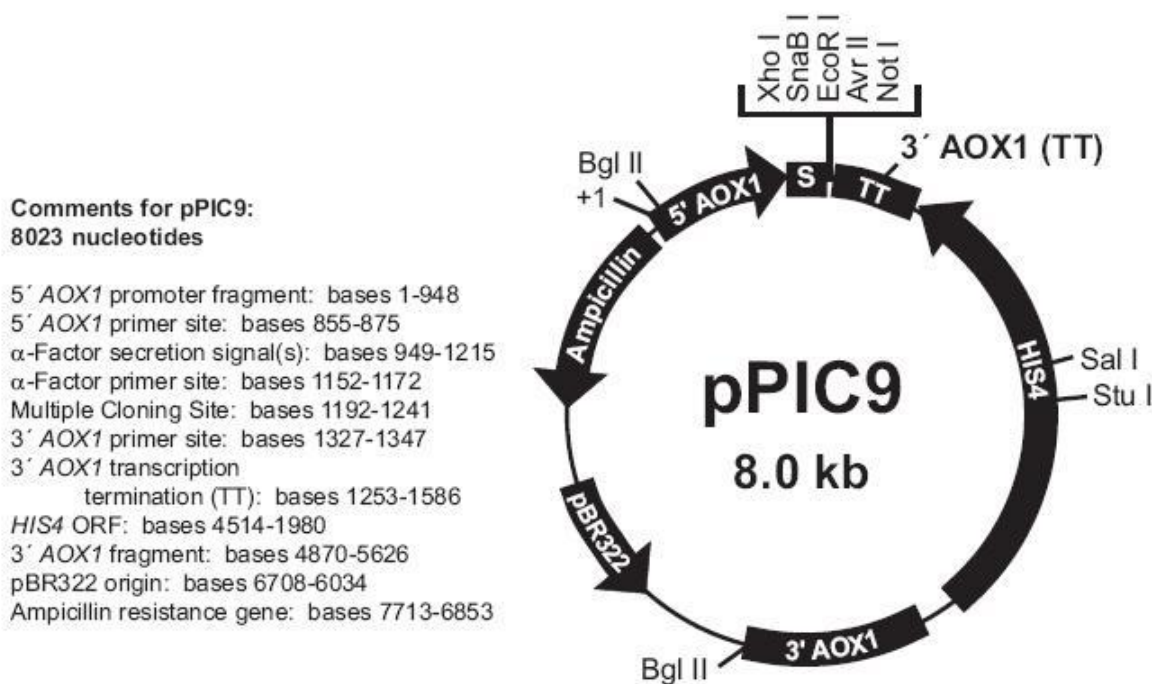


Figura 8. Vetor pPIC9 da Invitrogen: Vetor de expressão para *Pichia pastoris* com promotor AOX1, marca de seleção *HIS4* e sequência sinal MF- $\alpha$ .

### 3.5 Enzimas

Enzimas de restrição *Xho* I, *Not* I e *Bgl* II (New England Biolabs)

Utilizadas de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

Enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs)

Utilizada de acordo com as instruções do fabricante.

Enzima RNase A

RNase A 10 mg/mL

Acetato de sódio 50 mM

Ferver em banho-maria por 10 minutos.

### 3.6 Marcadores

Marcador para DNA

GeneRuler 1kb DNA Ladder 0,5 µg/µl , 50 µg (Fermentas Life Sciences)

Marcadores para proteína

Unstained Protein Molecular Weight Marker 1000 µL (Fermentas Life Sciences)

Precision Plus Protein Dual Color Standards 500 µl (BIO-RAD)

Prestained Protein Molecular Weight Marker 2x250 µL (Fermentas Life Sciences)

### 3.7 Anticorpos

Anti-βFSH (BD Biosciences)

Anticorpo policlonal produzido em cabra, contra a subunidade β do FSH. Utilizado na diluição de 1:1000.

Anti-goat-IgG (Sigma)

Anticorpo produzido em coelho, conjugado à fosfatase alcalina. Utilizado na diluição de 1:1000.

### **3.8 Proteína comercial**

FOLLTROPIN-V (Bioniche, Canadá)

Hormônio Folículo Estimulante injetável comercial, produzido a partir de extrato altamente purificado de glândulas pituitárias suínas. Foi utilizado como controle positivo nos experimentos de *imuno blot*, *dot blot* e *western blot*.

### **3.9 Membrana de nitrocelulose**

Hybond C Extra (Amersham Biosciences)

Utilizada nos experimentos de *western blot*.

### **3.10 Kits**

GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare)

Utilizado para purificar DNA a partir de uma banda de gel de agarose.

QIAGEN Plasmid Mini, Midi, Maxi, Mega and Giga Kits

Utilizado para extração de DNA plasmidial em grande escala (midiprep).

NBT/BCIP Kit (Invitrogen)

Utilizado para revelação de *western blot*.

### **3.11 Unidades de filtração**

Centriprep Centrifugal Filter Unit with Ultracel-10 membrane Centriprep YM-10, 10 kDa NMWL, da Millipore

Utilizado para concentrar e dialisar sobrenadante de culturas.

Filtro de 250 mL e membrana de 0,2  $\mu\text{m}$ , ambos da Millipore

Utilizados para esterilizar meios e soluções e para filtrar sobrenadante de culturas.

### **3.12 Colunas cromatográficas**

Superdex™ 75 10/300 GL, da GE Healthcare

Utilizada em cromatografia de exclusão molecular.

HPLC 208TP C8 Column (250 x 4,6 mm /5  $\mu\text{m}$ / 300 Å), da GRACE Technology

Utilizada em cromatografia de fase reversa.

### **3.13 Placa para MALDI-TOF/TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight/ time of flight)**

MTP Ancorchip TM Var/384 TF, da Bruker Daltonics (Ancorchip target plate with transponder technology)



## 4. MÉTODOS

### 4.1 Digestão de DNA com enzimas de restrição

As digestões com enzimas de restrição foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se os tampões e demais soluções fornecidos pelos mesmos. Geralmente foram utilizados 10 U de enzima para 5 µg de DNA, sendo que o volume final de enzima não ultrapassou 10% do volume final da reação, para que não houvesse degradação inespecífica do DNA pela enzima.

Na dupla digestão utilizando as enzimas *Xho* I e *Not* I foram utilizados 0,5 µL de cada enzima; 1 µL de tampão NEB 3 10X; 0,1 µL de BSA 100X; volume de DNA equivalente a 5 µg; e volume final da reação de 10 µL, completado com água miliQ. A reação foi incubada em banho-maria a 37°C por aproximadamente 3 horas.

Na digestão com a enzima de restrição *Bgl* II utilizou-se 2 µL de enzima; 4 µL de tampão NEB 3 10X; volume de DNA equivalente a 10 µg; e volume final da reação de 40 µL, completados com água miliQ. A reação foi incubada em banho-maria a 37°C por aproximadamente 3 horas.

### 4.2 Eletroforese de DNA em gel de agarose

O gel foi preparado e vertido sobre a cuba de eletroforese e pentes foram colocados para a formação dos poços. Após a polimerização do gel, a cuba foi preenchida com tampão TBE 0,5X e as amostras foram aplicadas. As amostras foram preparadas com tampão de amostra 10X, a fim de que a concentração final do tampão ficasse entre 1X e 2X. A corrida se deu a uma voltagem de 80 V. Após a corrida as bandas de DNA do gel foram visualizadas com luz ultravioleta. (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 2001).

### 4.3 Purificação de DNA a partir do gel de agarose

A banda correspondente ao fragmento de DNA desejado foi cortada do gel de agarose. A purificação do DNA a partir da banda do gel foi feita com o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit da GE Healthcare. Seguiu-se o protocolo 5.2, páginas 14 e 15 do manual de instruções do fabricante. Ao final, o DNA foi eluído em 20  $\mu$ L de água miliQ.

### 4.4 Ligação de fragmentos de DNA (vetor-inserto)

A enzima utilizada na reação de ligação foi a T4 DNA ligase. A enzima foi utilizada de acordo com as instruções do fabricante e com o tampão fornecido pelo mesmo. Utilizou-se quantidade de vetor equivalente a 75 ng e a quantidade de inserto utilizada foi calculada segundo a fórmula abaixo:

$$\text{ng de inserto} = \frac{\text{ng de vetor} \times \text{tamanho do inserto em kb}}{\text{tamanho do vetor em kb}} \times \text{razão molar} \frac{\text{inserto}}{\text{vetor}},$$

onde a razão molar entre inserto e vetor é de 5:1. O volume final da reação foi ajustado para 10  $\mu$ L. O sistema de ligação foi armazenado a 4°C overnight.

### 4.5 Preparo de células bacterianas competentes para choque térmico

Uma colônia isolada de DH5- $\alpha$  foi inoculada em 5 mL de meio LB e incubada a 37°C sob agitação de 250 rpm por aproximadamente 16 horas. 1 mL dessa cultura foi inoculado em 30 mL de meio LB em um *erlenmeyer* de 250 mL e incubado a 37°C sob agitação de 250 rpm até atingir OD<sub>600</sub> de 0,2 a 0,3. As células foram então mantidas no gelo por 15 minutos e depois centrifugadas a 5000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 10 mL de cloreto de cálcio 100 mM. A amostra foi incubada no gelo por 15 minutos. As células

foram centrifugadas a 5000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspense em 1 mL de cloreto de cálcio 100 mM com 15 % de glicerol. As células foram aliquoteadas em tubos de 1,5 mL, sendo que a cada tubo foram adicionados 100 µL de células. As células foram armazenadas a -80°C.

#### **4.6 Transformação de *E. coli* por choque térmico**

Foram adicionados a 100 µL de células DH5-α competentes, 10 µL do sistema de ligação. A amostra foi incubada no gelo por 30 minutos. Foi dado o choque térmico incubando-se a amostra em banho-maria a 37°C por 5 minutos. Adicionou-se às amostras 900 µL de meio LB com ampicilina. O sistema foi incubado em banho-maria a 37°C por 1 hora. Fez-se o plaqueamento das células, sendo que foram utilizadas 3 placas de meio LB ágar com ampicilina para cada sistema de transformação. Em duas placas foram plaqueados 100 µL de células. O restante das células foi centrifugado, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 100 µL de meio LB com ampicilina. Esses 100 µL de células foram plaqueados na terceira placa. As placas foram incubadas a 37°C por aproximadamente 20 horas até que os transformantes crescessem.

#### **4.7 Extração de DNA plasmidial em pequena escala (*miniprep*)**

O protocolo foi adaptado de Sambrook, Fritsch e Maniatis (2001). Uma colônia de bactéria foi inoculada em 5 mL de meio LB com ampicilina, e cultivada por aproximadamente 16 horas sob agitação a 37°C. 1,5 mL da cultura foram coletados e centrifugados a 12000 x g por 2 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e outros 1,5 mL da cultura foram adicionados ao mesmo tubo. Repetiu-se a centrifugação. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 µL de tampão TE, utilizando-se *vortex* para soltar o precipitado. O sistema foi incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. Adicionou-se 360 µL de solução II, o conteúdo foi homogeneizado por inversão e

incubou-se o sistema a temperatura ambiente por 5 minutos. Adicionou-se 300  $\mu\text{L}$  de solução III, misturou-se o conteúdo com *vortex* e incubou-se o sistema a temperatura ambiente por 5 minutos. A amostra foi centrifugada a 12000  $\times g$  por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, onde foram adicionados 750  $\mu\text{L}$  de isopropanol. A amostra foi homogeneizada por inversão, incubada a temperatura ambiente por 5 minutos e depois centrifugada a 12000  $\times g$  por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em 200  $\mu\text{L}$  de tampão TE. Adicionou-se 110  $\mu\text{L}$  de acetato de amônio 7,5 M à amostra, que depois foi homogeneizada com *vortex* e centrifugada a 12000  $\times g$  por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, ao qual se adicionou 750  $\mu\text{L}$  de etanol 100%. A amostra foi centrifugada a 12000  $\times g$  por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado secado a temperatura ambiente por 5 minutos. O DNA plasmidial foi ressuspensão em 20  $\mu\text{L}$  de água miliQ com RNase A (1  $\mu\text{L}$  de RNase 10 mg/mL para 100  $\mu\text{L}$  de água) e armazenado a -20°C.

#### **4.8 Extração de DNA plasmidial em grande escala (*midiprep*)**

A extração de DNA plasmidial em grande escala foi feita com o kit QIAGEN Plasmid Mini, Midi, Maxi, Mega and Giga Kits, seguindo-se o protocolo Plasmid or Cosmid DNA Purification using QIAGEN Plasmid Midi and Maxi Kits, que se inicia na página 16 do manual de instruções do fabricante.

#### **4.9 Tratamento do DNA para transformação de *Pichia pastoris***

Para transformação de *P. pastoris* devem ser utilizados 10  $\mu\text{g}$  de DNA, que deve estar linearizado e contido em um volume de 10  $\mu\text{L}$ .

O DNA extraído na *midiprep* foi quantificado e um volume que contém 10  $\mu\text{g}$  de DNA foi utilizado para linearização e precipitação. A linearização do DNA foi feita com a enzima *Bgl* II (nas condições descritas no item 4.1 deste trabalho). A

precipitação foi feita com cloreto de sódio e etanol. Adicionou-se ao DNA 0,3 M de cloreto de sódio e 2,5 volumes de etanol 100%. Incubou-se o DNA a  $-20^{\circ}\text{C}$  *overnight*. O material foi centrifugado a  $12000 \times g$  por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 70%. O material foi centrifugado a  $12000 \times g$  por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi secado a temperatura ambiente. O DNA foi ressuspensão em 10  $\mu\text{L}$  de água miliQ.

#### **4.10 Transformação de *Pichia pastoris* por eletroporação**

Todo o material utilizado neste procedimento (tubos, ponteiras, soluções, etc.) estava estéril e gelado.

Uma colônia isolada de *P. pastoris*, linhagem GS115, vinda de uma cultura fresca, foi pré-inoculada em 5 mL de meio YPD em um *erlenmeyer* de 125 mL. O frasco foi incubado a  $30^{\circ}\text{C}$  sob agitação de 200 rpm por aproximadamente 24 horas. No dia seguinte, cerca de 200 a 500  $\mu\text{L}$  do pré-inóculo foram adicionados a 100 mL de meio YPD em um *erlenmeyer* de 1 L. Esse inóculo foi incubado a  $30^{\circ}\text{C}$  sob agitação de 200 rpm até atingir  $\text{OD}_{600}$  de 1,3 a 1,5 (aproximadamente 16 horas). O inóculo foi incubado no gelo por 15 minutos para parar o crescimento. A cultura foi transferida para tubos de centrífuga e centrifugada a  $3000 \times g$  por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 mL de água destilada estéril gelada. A cultura foi centrifugada novamente a  $3000 \times g$  por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e a água foi descartada. Essa lavagem com 500 mL de água foi repetida uma vez e depois foi feita uma nova lavagem com 250 mL de água. A água foi descartada e o precipitado foi ressuspensão em 20 mL de sorbitol 1M gelado. A mistura foi centrifugada a  $2000 \times g$  por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 500  $\mu\text{L}$  de sorbitol gelado. As células foram aliquotadas em tubos de 1,5 mL, sendo que em cada tubo foram adicionados 80  $\mu\text{L}$  de células. A cada tubo foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de DNA e 110  $\mu\text{L}$  de sorbitol 1 M. O conteúdo foi passado para cubetas de eletroporação de 0,2 cm. O choque elétrico foi dado em um eletroporador da BIO-RAD nas seguintes condições: 7,5 KV/cm, 25  $\mu\text{F}$  e 400  $\Omega$  e tempo de eletroporação de aproximadamente 10 ms.

Imediatamente após o choque foi adicionado 1 mL de sorbitol 1 M às cubetas. O conteúdo foi transferido para um tubo de 1,5 mL e rapidamente centrifugado. Retirou-se um pouco do sorbitol do tubo a fim de que as células fossem ressuspensas em apenas 200  $\mu$ L de sorbitol. As células foram plaqueadas em placas de MD ágar, sendo que foram feitas duas placas para cada sistema de transformação e em cada uma foram plaqueados 100  $\mu$ L de células. As placas foram incubadas a 30°C por aproximadamente três dias até que os transformantes aparecessem. Alguns transformantes foram selecionados para posterior análise por *imuno blot* de colônia.

#### **4.11 Análise dos transformantes por *imuno blot* de colônia**

Foram escolhidos aleatoriamente 102 transformantes de *P. pastoris* de cada sistema de transformação. Cada transformante foi plaqueado em uma placa de MD ágar e em uma placa de MM ágar. Juntamente com os transformantes, também foram plaqueados em cada placa dois clones de *P. pastoris* transformados com o vetor pPIC9 vazio, funcionando como controle negativo. As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas, sendo que foram adicionados 0,5% de metanol a cada 24 horas às tampas das placas de MM ágar. Após o tempo de incubação, foram colocados sobre as placas de MM ágar, em contato com os transformantes, um pedaço de membrana de nitrocelulose, três pedaços de papel filtro acima da membrana e por último vários pedaços de papel toalha, todos recortados no formato e no tamanho da placa. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 3 horas. Após esse tempo de transferência, as membranas foram retiradas das placas e lavadas com TBST por 5 minutos sob agitação. As células aderidas à membrana foram removidas com os dedos e a membrana foi deixada sobre papel filtro para secar. Incubou-se a membrana na solução de bloqueio *overnight* a 4°C. Lavou-se a membrana com PBST três vezes de 5 minutos sob agitação. O anticorpo primário anti- $\beta$ FSH diluído em solução de bloqueio na diluição de 1:1000 foi adicionado e deixado por no mínimo 3 horas sob agitação. A membrana foi lavada com PBST três vezes de 5 minutos sob agitação. O anticorpo secundário anti-goat-IgG diluído em solução de bloqueio na diluição de 1:1000 foi adicionado e deixado por 1 hora e 30

minutos sob agitação. A membrana foi lavada com PBST três vezes de 5 minutos sob agitação e com APB uma vez de 5 minutos sob agitação. A membrana foi revelada com o kit NBT/BCIP. Depois do aparecimento de pontos coloridos (relativos às colônias) a membrana foi lavada com água destilada e secada em papel filtro a temperatura ambiente. Os clones positivos foram identificados nas placas de MD ágar e foram repicados a fim de serem utilizados nos próximos experimentos ou estocados.

#### **4.12 Indução em placa *deep-well***

O protocolo foi adaptado de Boettner *et al* (2002). Foram adicionados 0,8 mL de meio BMGY a cada poço de uma placa *deep-well* de 96 poços. A cada poço foi inoculado um transformante de *P. pastoris*. A placa foi vedada com filme plástico, onde foram feitos alguns furos para melhor aeração da placa. A placa foi incubada a 30°C sob agitação de 200 rpm por 3 dias. A placa foi centrifugada a 3000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante foi retirado dos poços com uma pipeta. Foram adicionados 0,8 mL de meio BMMY a cada poço e as células foram ressuspensas com auxílio de *vortex*. A placa foi incubada a 30°C sob agitação de 200 rpm. A cada 24 horas foram adicionados 0,5% de metanol a cada poço para manter a indução. Após 96 horas de indução, a placa foi centrifugada a 3000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante de cada poço foi analisado por *dot blot* do sobrenadante, para verificar a presença das proteínas desejadas.

#### **4.13 Análise dos transformantes por *dot blot* do sobrenadante**

5 µL de sobrenadante de culturas de *P. pastoris* foram aplicados com o auxílio de uma pipeta a uma membrana de nitrocelulose. 3 µl do FSH comercial FOLLTROPIN-V também foram aplicados à membrana. A membrana secou a temperatura ambiente e foi colocada na solução de bloqueio *overnight* a 4°C. Lavou-se a membrana com PBST três vezes de 5 minutos sob agitação. O anticorpo primário anti-βFSH diluído em solução de bloqueio na diluição de 1:1000 foi

adicionado e deixado por no mínimo 3 horas sob agitação. A membrana foi lavada com PBST três vezes de 5 minutos sob agitação. O anticorpo secundário anti-goat-IgG diluído em solução de bloqueio na diluição de 1:1000 foi adicionado e deixado por 1 hora e 30 minutos sob agitação. A membrana foi lavada com PBST três vezes de 5 minutos sob agitação e com APB uma vez de 5 minutos sob agitação. A membrana foi revelada com o kit NBT/BCIP. Depois do aparecimento de pontos coloridos a membrana foi lavada com água destilada e secada em papel filtro a temperatura ambiente.

#### **4.14 Indução da expressão de recombinantes em frasco**

Inoculou-se uma colônia isolada de *P. pastoris* recombinante em 25 mL de meio BMGY em um frasco aletado de 250 mL. A cultura foi incubada a 30°C sob agitação de 200 rpm até atingir OD<sub>600</sub> de 2 a 6 (aproximadamente 16 a 18 horas). A cultura foi então centrifugada a 1500 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100 mL de meio BMMY. A cultura foi colocada em um frasco aletado de 1 L e incubada novamente a 30°C sob agitação de 200 rpm. A cada 24 horas de crescimento adicionou-se 0,5% de metanol à cultura para manter a indução. A cada tempo de indução (24, 48, 72 e 96 horas de crescimento) retirou-se 5,5 mL de cultura. Aproximadamente 500 µL foram utilizados para medição de OD<sub>600</sub>. O restante das culturas foi utilizado para precipitação das proteínas contidas no sobrenadante e análise dessas proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante.

#### **4.15 Precipitação de proteínas com TCA e acetona**

A cada tempo de indução dos recombinantes em frasco, 5 mL de cultura foram retirados e centrifugados a 1500 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi utilizado para precipitação de proteínas com TCA e acetona. Alíquotas de 1 mL de sobrenadante foram preparadas. À cada alíquota adicionou-se 250 µL de TCA 100%. O sistema foi incubado a -20°C por 3 horas. Posteriormente o



sistema foi submetido a centrifugação a 15000 x g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. O precipitado foi lavado com 1 mL de acetona 100% gelada e centrifugado a 15000 x g por 15 minutos a 4°C. A lavagem com acetona foi repetida mais duas vezes. O precipitado foi deixado à temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos para secagem e depois foi ressuspenso em 40 µl de tampão de amostra 2X. Nos casos em que as amostras apresentaram uma coloração amarela (pH ácido) adicionou-se de 1 a 2 µl de tampão Tris-HCl 3M pH 8,8. As amostras foram estocadas a -20°C até análise em gel de poliacrilamida desnaturante.

#### **4.16 Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)**

A eletroforese de proteínas foi conduzida segundo o protocolo original de Laemmli (1970). Foi utilizado o sistema de eletroforese Mini PROTEAN Tetra Cell, da BIO-RAD. A solução de gel separador foi vertida primeiramente entre os conjuntos de placas de vidro do sistema e após a sua polimerização a solução de gel concentrador foi adicionada. Foram colocados pentes para a formação dos poços e após a polimerização do gel concentrador os pentes foram retirados e o sistema de gel foi devidamente acoplado à cuba, segundo as instruções do fabricante. A cuba foi preenchida com tampão de corrida 1X. Todas as amostras foram preparadas com tampão de amostra 2X e foram fervidas por 10 minutos antes de sua aplicação no gel. A cada poço do gel foram sempre aplicados 20 µL de amostra+tampão e 8 µL dos marcadores. A corrida se deu a uma voltagem constante de 130 V. Após a corrida os géis foram corados com *comassie blue* ou com prata ou foram transferidos para membranas de nitrocelulose para análise por *western blot*.

#### **4.17 Coloração do gel de poliacrilamida com *comassie blue***

O gel de poliacrilamida foi incubado com a solução corante por no mínimo 1 hora sob agitação. A solução corante foi retirada e adicionou-se a solução descorante. O gel ficou incubado com a solução descorante sob agitação até o aparecimento das bandas.

#### **4.18 Coloração do gel de poliacrilamida com prata**

A coloração com prata se baseou no protocolo de Blum, Beier e Gross (1987). O gel de poliacrilamida foi incubado com a solução I (fixação) por no mínimo 15 minutos sob agitação. Em seguida, o gel foi lavado com a solução II (lavagem) por 10 minutos sob agitação. Essa lavagem foi repetida mais duas vezes. O gel foi incubado com a solução III (tratamento) por 10 minutos sob agitação e depois com a solução IV (equilíbrio) por 10 minutos também sob agitação. Posteriormente o gel foi revelado com a solução V (revelação) até que as bandas aparecessem. A revelação foi interrompida com solução VI (parada), deixada por 10 minutos sob agitação. Finalmente, o gel foi lavado com a solução VII por 5 minutos sob agitação.

#### **4.19 Western blot**

O gel foi incubado em tampão de transferência por 20 minutos. Membrana de nitrocelulose e papel filtro foram cortados do tamanho do gel e hidratados em tampão de transferência por 5 a 10 minutos. O sistema de transferência utilizado foi o Trans-Blot SD - Semi Dry Transfer Cell da BIO-RAD. Segundo as instruções do fabricante, o papel filtro, a membrana e o gel foram colocados no aparelho e este foi ligado e submetido a uma voltagem de 15 V por 15 minutos. A eficiência da transferência foi verificada pela transferência do marcador pré-corado (Precision Plus Protein Dual Color Standards da BIO-RAD ou Prestained Protein Molecular Weight Marker da Fermentas Life Sciences) para a membrana. Incubou-se a membrana na solução de bloqueio *overnight* a 4°C. Lavou-se a membrana com PBST três vezes de 5 minutos sob agitação. O anticorpo primário anti-βFSH diluído em solução de bloqueio na diluição de 1:1000 foi adicionado e deixado por no

mínimo 3 horas sob agitação. A membrana foi lavada com PBST três vezes de 5 minutos sob agitação. O anticorpo secundário anti-goat-IgG diluído em solução de bloqueio na diluição de 1:1000 foi adicionado e deixado por 1 hora e 30 minutos sob agitação. A membrana foi lavada com PBST três vezes de 5 minutos sob agitação e com APB uma vez de 5 minutos sob agitação. A membrana foi revelada com o kit NBT/BCIP. Depois do aparecimento das bandas coradas a membrana foi lavada com água destilada e secada em papel filtro a temperatura ambiente.

#### **4.20 Concentração e diálise do sobrenadante**

Após o tempo de 96 horas de indução em frasco, as culturas foram centrifugadas a 1500 x *g* por 10 minutos. O sobrenadante foi separado do *pellet* e depois filtrado em membrana de 0,2 µm. O sobrenadante filtrado foi concentrado e dialisado utilizando-se a unidade de filtração Centriprep YM 10 da Millipore, que retém proteínas maiores que 10 kDa. O Centriprep foi utilizado de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Dois Centripreps foram utilizados, sendo que 15 mL de sobrenadante filtrado foram adicionados a cada um. Centrifugou-se cada Centriprep a 3000 x *g* por 50 minutos a 20°C. Ao final da centrifugação 5 mL de sobrenadante concentrado foram mantidos no Centriprep e o *flow trough* foi retirado e armazenado. Mais 15 mL de sobrenadante filtrado foram adicionados a cada Centriprep e repetiu-se a centrifugação. O procedimento foi repetido até que 100 mL de sobrenadante fossem concentrados em cada Centriprep. Ao final, o sobrenadante concentrado dos dois Centripreps foi juntado e centrifugado somente em um Centriprep obtendo-se 4 mL finais de sobrenadante concentrado após todo o procedimento.

A diálise do sobrenadante foi feita contra tampão fosfato de sódio 20 mM adicionado de cloreto de sódio 100 mM pH 7,0. Os 4 mL de sobrenadante concentrado foram adicionados ao Centriprep juntamente com 11 mL do tampão. Centrifugou-se o Centriprep a 3000 x *g* por 50 minutos a 20°C. Ao final da centrifugação 5 mL de sobrenadante permaneceram no Centriprep e o *flow trough* foi armazenado. Adicionou-se mais 10 mL de tampão ao Centriprep e repetiu-se a centrifugação. O procedimento foi repetido mais 4 vezes a fim de que o meio de

cultura fosse sendo substituído pelo tampão fosfato, retendo-se as proteínas maiores que 10 kDa.

#### **4.21 Quantificação de proteínas pelo Ensaio de Bradford**

A determinação da concentração de proteínas presentes nas amostras foi feita por ensaio de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando-se a albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

#### **4.22 Cromatografia de exclusão molecular**

A cromatografia de exclusão molecular foi feita utilizando-se a coluna Superdex™ 75 e o equipamento ÄKTA Purifier da GE Healthcare. O sistema e a coluna foram previamente equilibrados com o tampão fosfato de sódio 20 mM acrescido de cloreto de sódio 100 mM pH 7,0 a um fluxo de 0,5 mL/min (o tampão foi filtrado e degaseificado antes de ser aplicado no sistema e na coluna). 500 µL de amostra foram injetadas na coluna (a amostra foi previamente filtrada em membrana de 0,2 µm antes da aplicação na coluna). A eluição foi realizada a um fluxo contínuo de 0,5 mL/min. A presença de proteínas foi monitorada pela absorvância a 216 nm e a 280 nm. Frações de 2,5 mL foram coletadas automaticamente. Repetiu-se o procedimento até que toda a amostra fosse injetada na coluna. Como os cromatogramas de cada eluição foram semelhantes, as frações correspondentes de cada cromatograma foram coletadas em um mesmo tubo. As frações coletadas foram liofilizadas e armazenadas a -20 °C. Antes, porém, 150 µL de cada fração foram separados e precipitados com TCA e acetona para análise por gel de poli-acrilamida desnaturante e por *western blot*.

#### **4.23 Cromatografia de fase reversa**

As frações da cromatografia de exclusão molecular em que a proteína desejada foi visualizada, foram ressuspensas em água miliQ mais 0,1% de TFA e utilizadas em cromatografia de fase reversa. A cromatografia de fase reversa foi feita em coluna analítica C8 e com o auxílio do equipamento ÄKTA Purifier da GE Healthcare. Dois solventes foram utilizados: solvente A, que consiste de água miliQ mais 0,1% de TFA; e solvente B, que consiste de acetonitrila (ACN) mais 0,1% de TFA (os solventes foram filtrados e degaseificados antes de serem aplicados no sistema e na coluna). O sistema e a coluna foram previamente equilibrados com 5% de solvente B. 500  $\mu$ L de amostra foram aplicados à coluna (a amostra foi previamente filtrada em membrana de 0,2  $\mu$ m antes da aplicação na coluna). A eluição foi feita com um gradiente de 5 a 95% do solvente B, a um fluxo constante de 1 mL/min. A presença de proteínas foi monitorada pela absorbância em 280 nm e 216 nm. Todas as frações em que foram observados picos de absorbância a 216 e 280 nm, indicando a presença de proteínas, foram coletadas manualmente. O tempo em que cada fração foi coletada foi anotado. Repetiu-se o procedimento até que toda a amostra fosse injetada na coluna. Os cromatogramas de todas as eluições foram semelhantes, mas as frações correspondentes foram coletadas separadamente. As frações coletadas foram secadas em Speed Vac e armazenadas a -20°C.

Foi feito um *screening* das frações da primeira eluição da fase reversa por espectrometria de massa. Todas as frações em que se observou a presença de proteínas com massas entre 25 e 40 kDa foram selecionadas. O tempo correspondente à coleta dessas frações foi identificado no cromatograma de fase reversa. As frações das outras eluições com os mesmos tempos de coleta foram identificadas e juntadas às frações correspondentes da primeira eluição. Essas frações foram analisadas em gel de policarilamida desnaturante e por *western blot*.

#### **4.24 Espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight/ time of flight)**

Misturou-se 1  $\mu$ L de amostra e 3  $\mu$ L de matriz  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico. Foram aplicados a cada poço da placa de MALDI-TOF/TOF 0,5  $\mu$ L de cada amostra,

em duplicata. As massas das frações foram analisadas no equipamento MALDI-TOF/TOF Ultraflex III, da Bruker Daltonics, buscando-se frações que apresentassem massas moleculares de 20 a 40 kDa.

#### **4.25 Indução da expressão de recombinantes em fermentador (realizado pela empresa Ouro Fino)**

Clones positivos de *Pichia* que estavam estocados a -80 °C em meio YPD acrescido de 15% de glicerol foram inoculados em 50 mL de meio MGY em um *erlenmeyer* de 250 mL. O frasco foi incubado a 30°C sob agitação de 200 rpm por 16 a 20 horas até que a cultura atingisse OD<sub>600</sub> igual a 1. Vários frascos foram utilizados para que se conseguisse uma cultura inicial de 500 mL.

A fermentação foi realizada em um fermentador de 15 L da Ouro Fino. Este foi primeiramente preenchido com 5 L de meio de fermentação salino e 2 mL/L de solução de sais. Posteriormente, 500 mL da cultura inicial foram adicionados. A fermentação ocorreu a 30 °C e pH 5,0. O pH foi mantido constante pela adição periódica automática de solução de hidróxido de amônio 30% ou de ácido fosfórico 0,5 M. A pressão atmosférica e a agitação foram ajustadas para manter uma DO (oxigênio dissolvido) mínima de 10%. A entrada de ar foi fixada a 5 L/min, mas houve variação do valor de vvm (volume de ar por volume de meio por minuto) devido à adição de nutrientes. A adição dos nutrientes (glicerol e metanol) foi realizada automaticamente. O *set-point* da DO foi ajustado para 30%. Quando a DO foi maior que o *set-point*, a bomba alimentadora foi automaticamente disparada.

Após a adição das células ao fermentador, iniciou-se a fase de crescimento em batelada, que durou 24 horas. A seguir a fase alimentada com glicerol se iniciou (adição de glicerol 50% e 2 mL/L de solução de sais). Esta fase durou 12 horas. Após 1 hora sem adição de glicerol iniciou-se a fase de adição de metanol (adição de metanol 50% e 2 mL/L de solução de sais). A cada 12 horas de fermentação 5 mL de cultura foram retirados. Essas amostras foram utilizadas para acompanhamento do crescimento celular pela medição de OD<sub>600</sub> e foram centrifugadas para coleta do sobrenadante. As proteínas do sobrenadante foram

precipitadas com TCA e acetona e analisadas em gel de poliacrilamida desnaturante e por *western blot*.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Síntese dos genes *bFSH-fus*, *bFSH-L* e *bFSH-CTP*

A fim de expressar o hormônio folículo estimulante bovino em *Pichia pastoris*, três construções gênicas foram arquitetadas: *bFSH-fus*, *bFSH-L* e *bFSH-CTP*. Os três genes foram desenhados com base nas sequências gênicas das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  do hormônio folículo estimulante de *Bos indicus* (Figura 3). Códonos nativos presentes em *Bos indicus* foram substituídos por códonos mais frequentes de *Pichia pastoris*, com base no *codon usage* de *Pichia* (Anexo 1). Tomou-se o cuidado de verificar se o conteúdo de guanina e citosina dos genes sintéticos estava próximo ao dos genes encontrados na levedura e se os genes sintéticos não continham sítios para as enzimas de restrição que serão utilizadas nas estratégias de clonagem. Devido ao possível desenvolvimento de patentes, as sequências dos genes *bFSH-fus*, *bFSH-L* e *bFSH-CTP* não estão detalhadas neste trabalho.

A construção gênica *bFSH-fus* (730 pb) foi desenhada de forma que o gene da subunidade  $\beta$  ficasse fusionado ao gene da subunidade  $\alpha$  (Figura 9A). Dessa forma, na proteína *bFSH-fus*, a região C-terminal da subunidade  $\beta$  estará fusionada à região N-terminal da subunidade  $\alpha$ . A proteína predita possui 213 resíduos de aminoácidos e uma massa molecular de 23,96 kDa, sem considerar a massa de açúcares que podem estar ligados aos sítios de glicosilação.

Na construção gênica *bFSH-L* (758 pb) o gene da subunidade  $\beta$  está separado do gene da subunidade  $\alpha$  por uma sequência espaçadora de 48 pb que codifica um peptídeo conector (*linker*) de 16 aminoácidos (Figura 9B). Na proteína predita a região C-terminal da subunidade  $\beta$  permanece ligada à região N-terminal da subunidade  $\alpha$  por meio do peptídeo conector. O peptídeo foi desenhado por modelagem molecular e foi colocado entre as duas subunidades com o objetivo de fornecer espaçamento tridimensional adequado à proteína. A proteína *bFSH-L* possui 229 aminoácidos e massa molecular de 25,50 kDa, sem contar os açúcares ligados.



Em *bFSH-CTP* (767 pb) o gene da subunidade  $\beta$  está separado do gene da subunidade  $\alpha$  pela sequência gênica de 120 pb que codifica o peptídeo CTP (*C-terminal peptide*) de gonadotrofina coriônica equina (*Equus Caballus*) (Figura 9C). A região CTP possui 40 aminoácidos e funciona como um ligante, permitindo a expressão das duas subunidades unidas e provendo correto espaçamento e estruturação tridimensional à proteína expressa. A proteína bFSH-CTP possui 252 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 27,85 kDa, sem levar em consideração as glicosilações.

Foi adicionada à extremidade 5' de cada gene a sequência do *mating factor*  $\alpha$  (MF- $\alpha$ ) de *S. cerevisiae* (Figura 9), que é uma sequência sinal que permitirá a secreção das proteínas para o meio de cultura no momento da sua expressão por *Pichia pastoris*. Os sítios de restrição para as enzimas *Xho* I e *Not* I foram adicionados respectivamente às extremidades 5' e 3' dos genes, para facilitar a clonagem nos vetores de expressão (Figura 9).

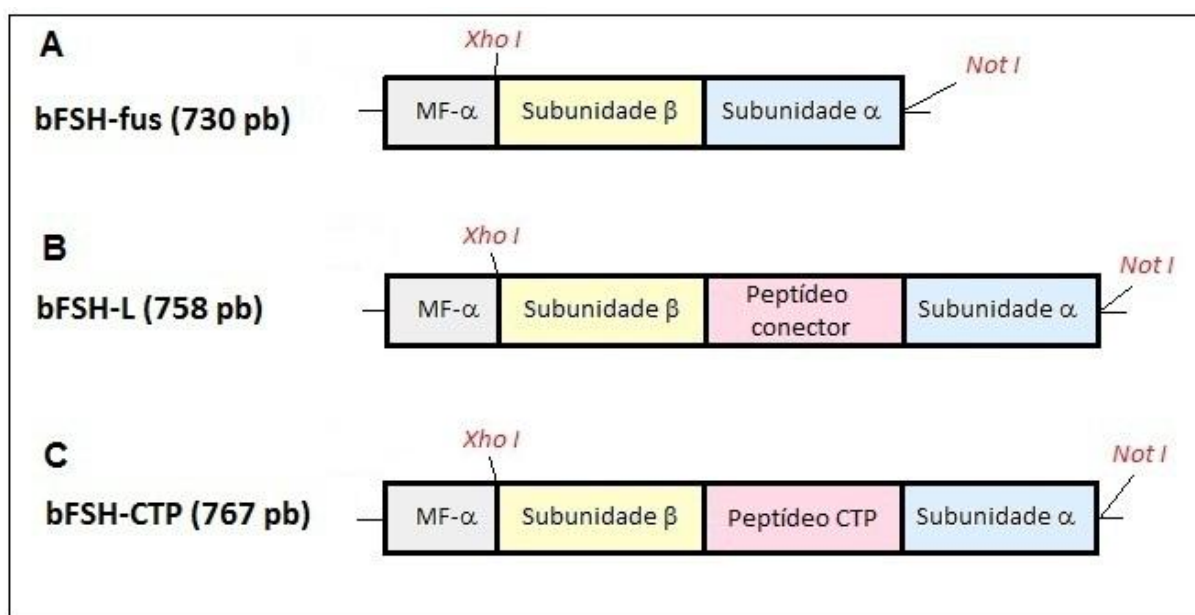


Figura 9. Esquema dos genes sintéticos *bFSH-fus*, *bFSH-L* e *bFSH-CTP*. A) Em *bFSH-fus*, as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  estão em uma fusão do tipo  $\beta\alpha$ . B) Em *bFSH-L*, as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  estão em uma fusão do tipo  $\beta\alpha$  separadas pela sequência de um peptídeo conector. C) Em *bFSH-CTP*, as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  estão em uma fusão do tipo  $\beta\alpha$  separadas pela sequência do peptídeo CTP de gonadotrofina coriônica eqüina.

Os genes foram sintetizados quimicamente pela empresa norte-americana Epoch Biolabs. As três construções gênicas vieram clonadas no vetor pPGK $\Delta$ 3, que é um vetor utilizado para expressão de proteínas em *Pichia pastoris*.

## 5.2 Construção dos vetores de expressão

Inicialmente buscou-se a expressão das três proteínas em *P. pastoris* utilizando-se o vetor pPGK $\Delta$ 3 (ARRUDA, 2008). No entanto, esse vetor apresentou alguns problemas e não foi eficiente na expressão (dados não mostrados). Dessa forma decidiu-se trocar o vetor de expressão para o vetor pPIC9 da Invitrogen. Este vetor é muito utilizado na produção de diversas proteínas em *Pichia*, apresentando alta eficiência. Ele possui como promotor o gene *AOX1* e como marcador de seleção auxotrófico para *Pichia pastoris* o gene *HIS4*. A fim de expressar os genes *bFSH-fus*, *bFSH-L* e *bFSH-CTP* em *Pichia pastoris* foram construídos, portanto, os vetores pPIC9-*bFSH-fus*, pPIC9-*bFSH-L* e pPIC9-*bFSH-CTP*, respectivamente.

A estratégia de construção dos vetores de expressão está esquematizada na figura 10. Inicialmente, os fragmentos gênicos *bFSH-fus*, *bFSH-L* e *bFSH-CTP* foram liberados do vetor pPGK $\Delta$ 3 por digestão com as enzimas de restrição *Xho* I e *Not* I. O vetor pPIC9-CHYM também foi digerido com as enzimas *Xho* I e *Not* I, a fim de liberar o vetor pPIC9 linearizado. As digestões foram analisadas em gel de agarose. As bandas do gel equivalentes aos fragmentos de DNA desejados foram cortadas e utilizadas para purificação do DNA. Os DNAs purificados a partir do gel foram quantificados e utilizados em sistemas de ligação. Foram construídos três sistemas de ligação, ligando-se cada um dos genes *bFSH-fus*, *bFSH-L* e *bFSH-CTP* ao vetor pPIC9 com a enzima T4 DNA ligase.

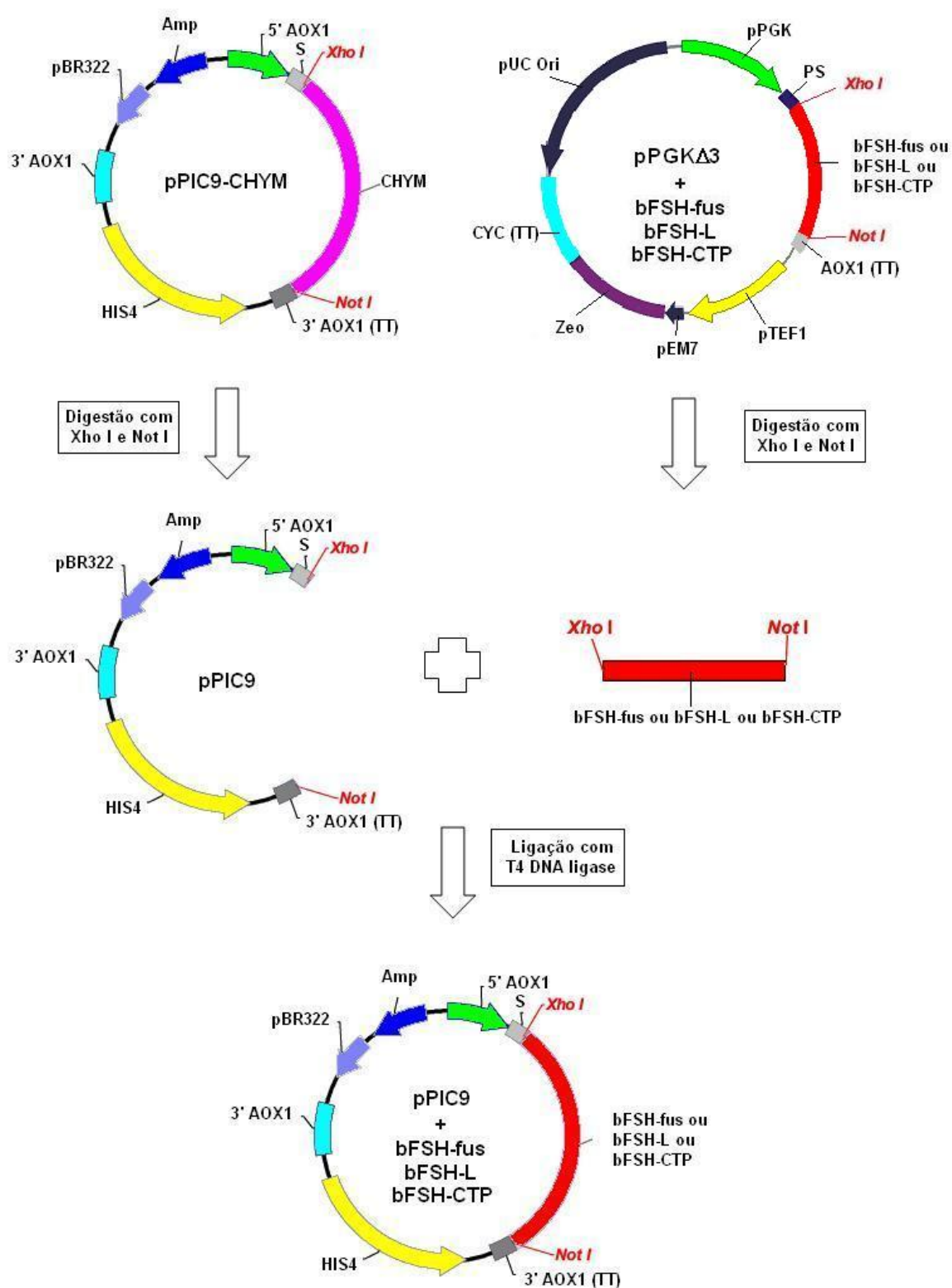


Figura 10. Estratégia de construção dos vetores de expressão. O vetor pPIC9-CHYM foi linearizado com as enzimas *Xho I* e *Not I* para liberação do vetor pPIC9 vazio. Os fragmentos *bFSH-fus*, *bFSH-L* e *bFSH-CTP* foram liberados do vetor pPGKΔ3 por digestão com as enzimas *Xho I* e *Not I*. Foi feita a ligação dos fragmentos *bFSH-fus*, *bFSH-L* e *bFSH-CTP* ao vetor pPIC9 com a enzima T4 DNA ligase.

Os três sistemas de ligação foram utilizados para transformação de *E. coli*, linhagem DH5- $\alpha$ . Foi feita a extração do DNA plasmidial em pequena escala (miniprep) de transformantes de cada sistema de ligação. O DNA extraído foi digerido com as enzimas de restrição *Xho* I e *Not* I, a fim de verificar a eficiência da ligação dos insertos ao vetor. A digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose. As análises de restrição confirmaram a integração de cada inserto ao vetor, pois cada digestão mostrou uma banda de 8,0 kb, equivalente ao tamanho do vetor pPIC9, e uma banda de aproximadamente 750 pb, equivalente ao tamanho dos insertos (730 pb para *bFSH-fus*, 758 pb para *bFSH-L* e 767 pb para *bFSH-CTP*) (Figura 11).

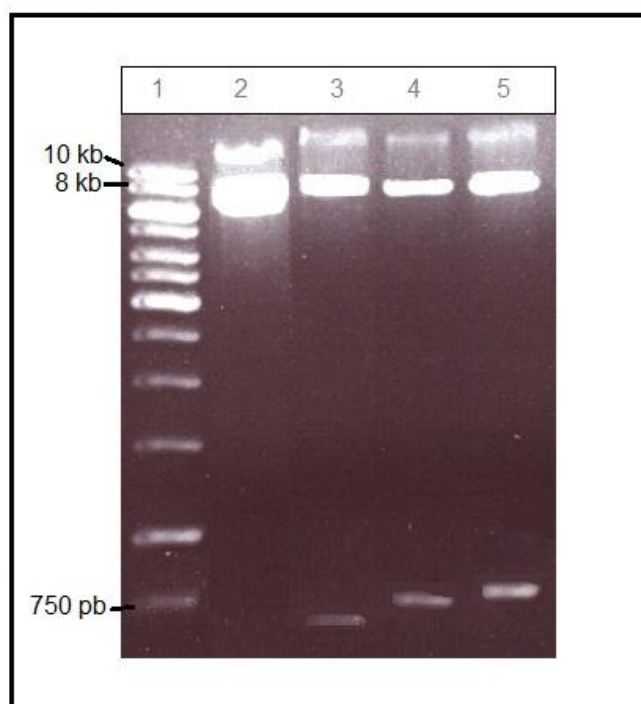


Figura 11. Análise de restrição para a confirmação da ligação dos insertos *bFSH-fus*, *bFSH-L* e *bFSH-CTP* ao vetor pPIC9. Poço 1: marcador. Poço 2: vetor pPIC9-bFSH-fus intacto. Poço 3: digestão de pPIC9-bFSH-fus com as enzimas *Xho* I e *Not* I. Poço 4: digestão de pPIC9-bFSH-L com as enzimas *Xho* I e *Not* I. Poço 5: digestão de pPIC9-bFSH-CTP com as enzimas *Xho* I e *Not* I.

Após a confirmação da integração dos insertos ao vetor, foi feita a extração de DNA plasmidial em grande escala (midiprep) dos transformantes, a fim de obter quantidade maior de DNA. O DNA extraído foi preparado para a transformação de *P. pastoris*. Um volume contendo 10  $\mu$ g de DNA foi linearizado com a enzima *Bgl* II,

precipitado e ressuspenso em 10 µl de água miliQ. O vetor pPIC9 vazio também foi digerido com a enzima *Bgl* II para transformação de *P. pastoris*, para ser utilizado como controle negativo nos experimentos de indução e análise da expressão dos recombinantes.

### **5.3 Transformação de *Pichia pastoris* e detecção de clones positivos para a expressão das proteínas desejadas**

A linhagem GS115 de *Pichia pastoris* foi transformada por eletroporação com cada um dos vetores de expressão pPIC9-bFSH-fus, pPIC9-bFSH-L e pPIC9-bFSH-CTP e com o vetor pPIC9 vazio. Após a transformação as células foram incubadas em placas de meio mínimo (meio MD ágar), a fim de serem selecionadas pela habilidade de crescer em meio sem histidina. Após 72 horas de crescimento, as placas da transformação foram checadas e os transformantes foram contados. Nas placas de bFSH-fus, foram obtidos 585 clones His<sup>+</sup>; nas de bFSH-L, 625 clones; e nas de bFSH-CTP, 508 clones.

Os transformantes obtidos foram analisados por *imuno blot* de colônia com o objetivo de detectar clones positivos para a expressão das proteínas desejadas. Para isso, 102 transformantes de cada sistema foram selecionados aleatoriamente e plaqueados em uma placa de meio MD ágar e em uma placa de meio MM ágar, com o auxílio de um *grid* para numeração de cada transformante (Figura 12A). As placas de MM ágar foram utilizadas no *imuno blot* de colônia. As placas de MD ágar foram armazenadas para que os clones que dessem positivo no *imuno blot* de colônia pudessem ser posteriormente repicados e utilizados em outros experimentos. Em cada placa de MM ágar também foram adicionados dois clones de transformantes de pPIC9 vazio, que funcionaram como controle negativo da expressão no *imuno blot* de colônia (Figura 12A). O *imuno blot* revelou clones positivos para expressão de cada uma das três proteínas, sendo que os clones de controle negativo não foram visualizados (Figura 12B).

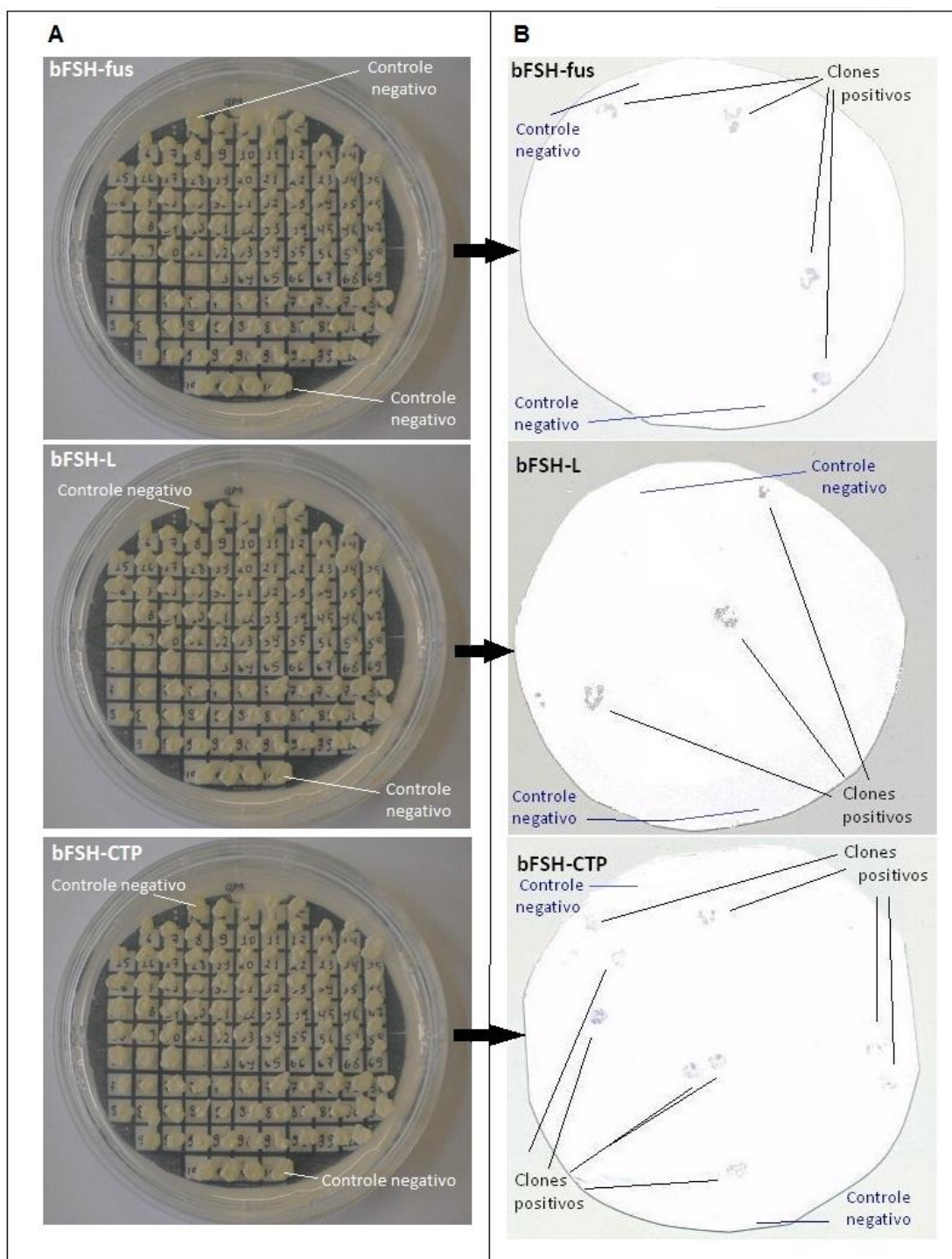


Figura 12. *Imuno blot* de colônia. Anticorpo utilizado: anti-FSH $\beta$  - BD Biosciences. A) Placas de MM ágar contendo 102 transformantes de cada sistema e 2 clones de controle negativo. Essas placas foram analisadas por *imuno blot* de colônia. B) Membranas do *imuno blot* de colônia revelam aparecimento de clones positivos para a expressão das proteínas desejadas. Os clones de controle negativo não foram visualizados.

Os clones positivos foram identificados na placa de MD ágar e foram analisados por *dot blot* do sobrenadante, a fim de verificar a secreção das proteínas para o sobrenadante das culturas. Para isso os clones positivos foram incubados em uma placa *deep-well* de 96 poços juntamente com alguns clones escolhidos ao acaso e com o clone de controle negativo. Foi feita a indução em placa *deep-well* desses clones. Após 96 horas de indução, a expressão das proteínas desejadas e sua secreção para o meio de cultura foram analisadas por *dot blot* do sobrenadante. Foram aplicados em membrana de nitrocelulose 5  $\mu$ l do sobrenadante de cada poço e também 3  $\mu$ l do FSH comercial FOLLTROPIN-V, que funcionou como controle positivo da expressão. O *dot blot* do sobrenadante revelou clones positivos que secretam cada uma das três proteínas para o sobrenadante. Os melhores clones de bFSH-fus foram os clones 6, 10, 13 e 14 (destacados em verde na figura 13); os clones positivos de bFSH-L foram os clones 9, 13 e 51 (destacados em azul na figura 13); e os melhores clones de bFSH-CTP foram os clones 17,19, 50, 57, 63, 79 e 80 (destacados em rosa na figura 13). O clone de controle negativo não foi revelado (destacado em amarelo na figura 13) e o controle positivo apareceu (destacado em vermelho na figura 13).



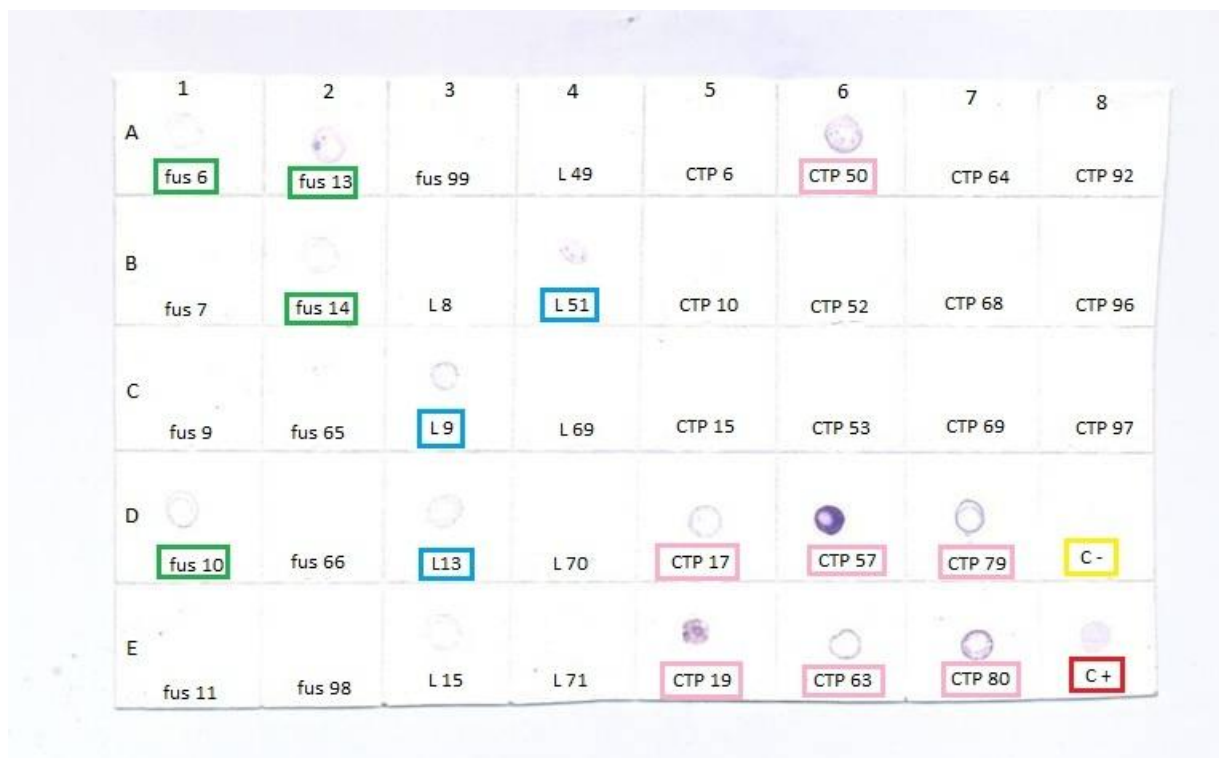


Figura 13. *Dot blot* do sobrenadante. Anticorpo utilizado: anti-FSH $\beta$  - BD Biosciences. O *Dot blot* do sobrenadante revelou que os clones de bFSH-fus 6, 10, 13 e 14 (em verde), os clones de bFSH-L 9, 13 e 51 (em azul) e os clones de bFSH-CTP 19, 17, 50, 57, 63, 79 e 80 (em rosa) expressam as proteínas desejadas e as secretam para o sobrenadante. O controle negativo não apareceu (em amarelo). O controle positivo (FOLLTROPIN-V) foi corado (em vermelho).

#### 5.4 Indução da expressão dos clones positivos em frasco

Os melhores clones encontrados no *dot blot* do sobrenadante foram selecionados para indução e expressão em frasco. Foi feita a indução em frasco dos clones bFSH-fus 6, bFSH-L 13 e bFSH-CTP 57 e também do clone de controle negativo. A cada tempo de indução (24, 48, 72 e 96 horas) alíquotas do sobrenadante das culturas foram retiradas e analisadas. Foi feita a medição da OD<sub>600</sub> para o acompanhamento do crescimento das células. As proteínas do sobrenadante foram precipitadas com TCA e acetona e analisadas em gel de poliacrilamida desnaturante e por *western blot*.

O *western blot* realizado com as amostras da indução do clone bFSH-fus 6 revelou o aparecimento de bandas coradas de aproximadamente 25 kDa. Essas bandas são relativas à proteína desejada, que possui uma massa molecular de



23,96 kDa. Não foi verificado o aparecimento de nenhuma banda corada nas amostras do controle negativo. Foram aplicados ao gel do *western blot* 5  $\mu$ L do FSH comercial FOLLTROPIN-V como controle positivo da expressão. Esse controle foi corado, corroborando a eficiência do experimento. A curva de crescimento do clone bFSH-fus 6, juntamente com a membrana do *western blot*, estão representados na figura 14.

O *western blot* das amostras da indução de bFSH-L 13 também revelou o aparecimento de bandas coradas de aproximadamente 25 kDa, indicando que o clone está expressando a proteína desejada, com massa de 25,5 kDa (Figura 15). O controle positivo também foi revelado no *western*. Não se verificou o aparecimento da proteína desejada nas amostras do controle negativo.

O *western blot* realizado com as amostras da indução do clone bFSH-CTP 57 revelou o aparecimento de bandas coradas de tamanho entre 25 e 37 kDa (Figura 16). Isso indica que o clone está expressando eficientemente a proteína desejada, de massa molecular de 27,85 kDa. Não houve aparecimento de bandas coradas nas amostras do clone de controle negativo. Já o controle positivo foi corado no *western blot*.

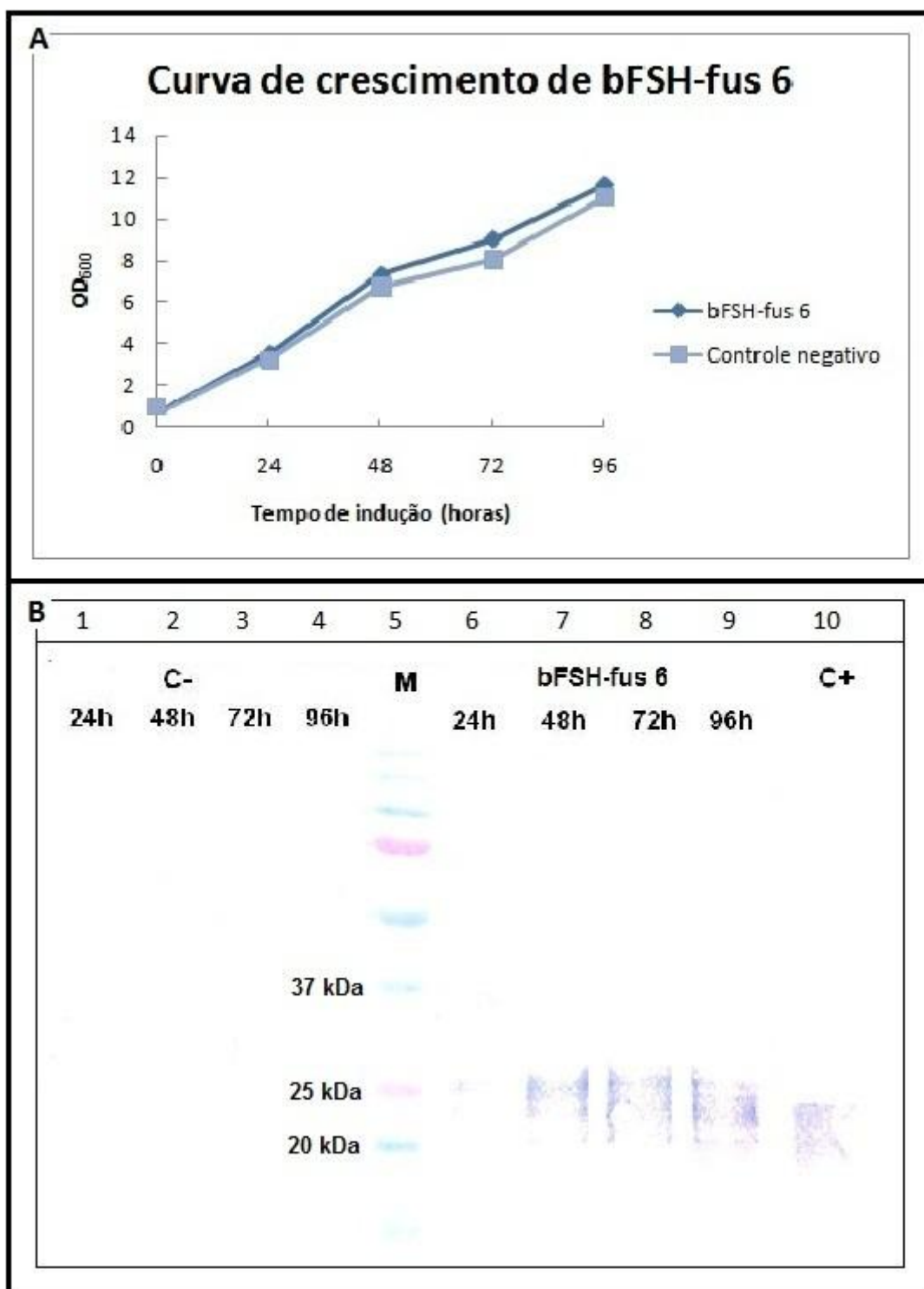


Figura 14. A) Curva de crescimento do clone bFSH-fus 6. B) *Western blot*. Anticorpo utilizado: anti-FSH $\beta$  - BD Biosciences. Os poços 1, 2, 3 e 4 correspondem respectivamente às amostras dos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas de indução do clone de controle negativo. O poço 5 corresponde ao marcador. Os poços 6, 7, 8 e 9 correspondem respectivamente às amostras dos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas de indução do clone bFSH-fus 6. O poço 10 corresponde ao controle positivo (FOLLTROPIN-V).

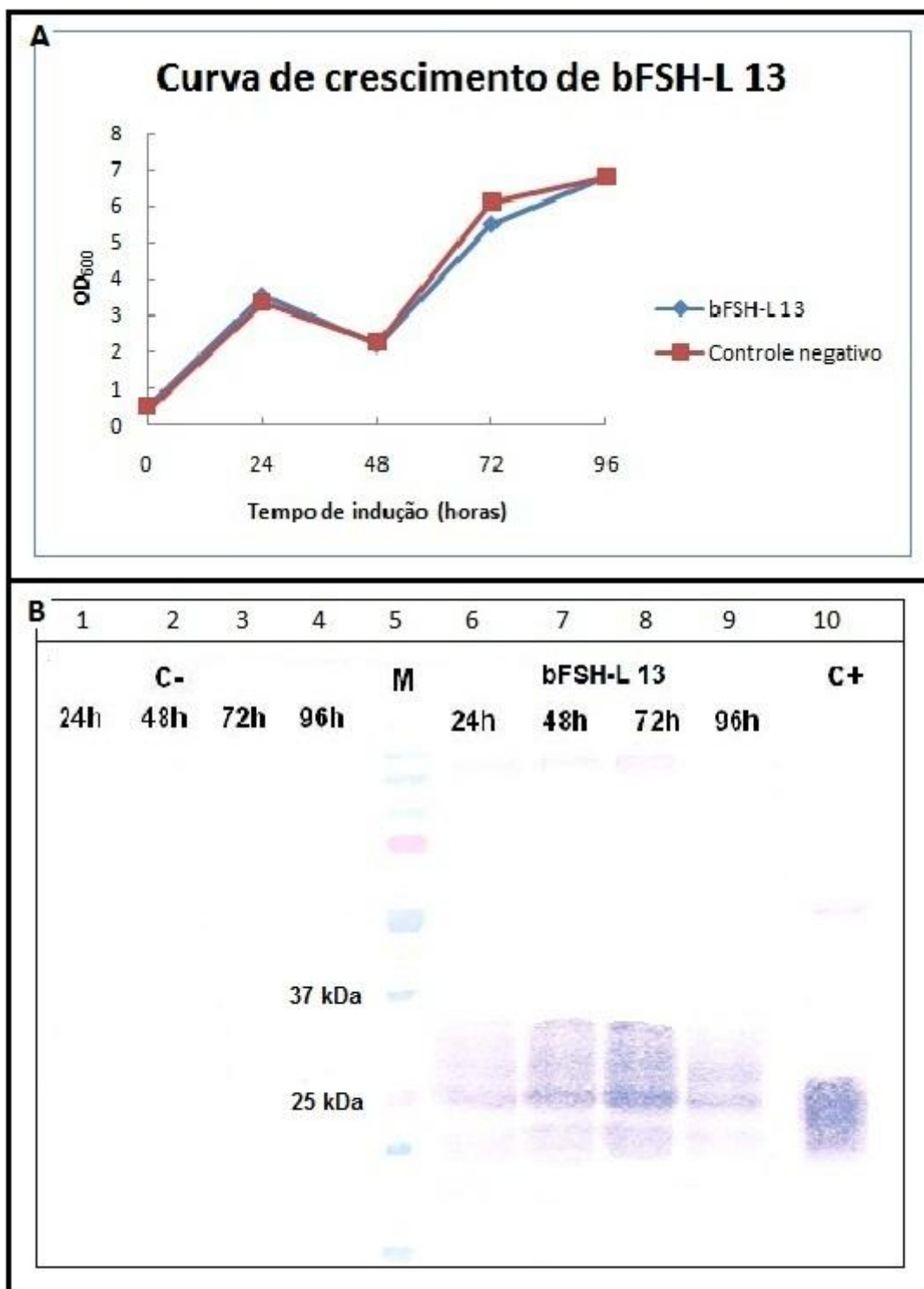


Figura 15. A) Curva de crescimento do clone bFSH-L 13. B) *Western blot*. Anticorpo utilizado: anti-FSH $\beta$  - BD Biosciences. Os poços 1, 2, 3 e 4 correspondem respectivamente às amostras dos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas de indução do clone de controle negativo. O poço 5 corresponde ao marcador. Os poços 6, 7, 8 e 9 correspondem respectivamente às amostras dos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas de indução do clone bFSH-L 13. O poço 10 corresponde ao controle positivo (FOLLTROPIN-V).

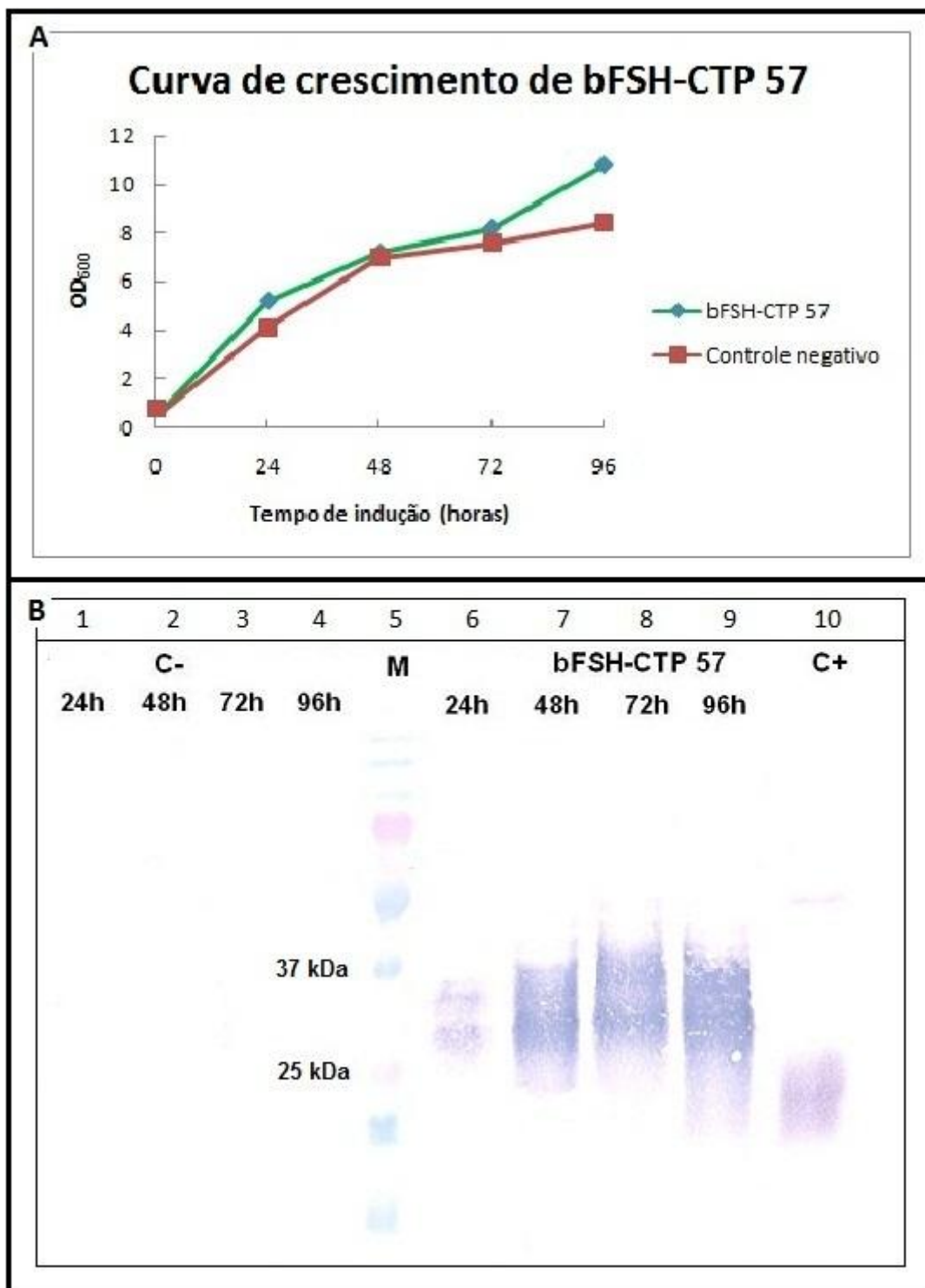


Figura 16. A) Curva de crescimento do clone bFSH-CTP 57. B) *Western blot*. Anticorpo utilizado: anti-FSH $\beta$  - BD Biosciences. Os poços 1, 2, 3 e 4 correspondem respectivamente às amostras dos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas de indução do clone de controle negativo. O poço 5 corresponde ao marcador. Os poços 6, 7, 8 e 9 correspondem respectivamente às amostras dos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas de indução do clone bFSH-CTP 57. O poço 10 corresponde ao controle positivo (FOLLTROPIN-V).

## 5.5 Purificação de bFSH-CTP

A proteína bFSH-CTP foi escolhida para dar continuidade ao trabalho. Foi feita uma indução em frasco em grande escala do clone bFSH-CTP 57, onde 3 frascos contendo 100 mL de cultura foram utilizados, a fim de obter bastante material para os experimentos de purificação de bFSH-CTP. A cada tempo de indução (24, 48, 72 e 96 horas) alíquotas do sobrenadante foram retiradas para acompanhamento do crescimento das células pela medição da OD<sub>600</sub>. As proteínas do sobrenadante foram precipitadas com TCA e acetona, para análise em gel de poliacrilamida desnaturante e *western blot*. A curva de crescimento do clone bFSH-CTP 57 está representada na figura 17A. O *western blot* revelou que a indução do clone bFSH-CTP 57 foi efetiva nos três frascos, pois houve aparecimento de bandas coradas de massa molecular entre 25 e 37 kDa nas amostras dos três frascos (Figura 17B). O gel de poliacrilamida desnaturante das amostras da indução de bFSH-CTP 57 do frasco 1 está respresentado na figura 17C. O gel está representado para possível visualização das outras proteínas presentes no sobrenadante, mas não foi possível a visualização de uma banda relativa à proteína desejada nesse gel, pois a expressão da proteína foi baixa.

O sobrenadante do tempo final da indução em grande escala do clone bFSH-CTP 57 foi concentrado e dialisado, utilizando-se a unidade de filtração Centriprep da Millipore. A quantidade de 200 mL de sobrenadante foi concentrada para 4 mL finais. Para confirmar se as proteínas do sobrenadante foram realmente concentradas, a quantidade de proteína total do sobrenadante foi medida antes e depois da concentração e diálise com o Centriprep. A quantidade de proteínas do *flow through* também foi determinada, para verificar se houve perda de proteína. A concentração inicial de proteína total do sobrenadante foi de 54,05 µg/mL e a concentração final foi de 841,03 µg/mL. A quantidade de proteína presente no *flow through* foi insignificante. As proteínas presentes no sobrenadante concentrado e dialisado foram analisadas por *western blot* para verificar se a proteína bFSH-CTP estava realmente presente na amostra. O *western blot* revelou a presença da proteína bFSH-CTP no sobrenadante concentrado (Figura 18).

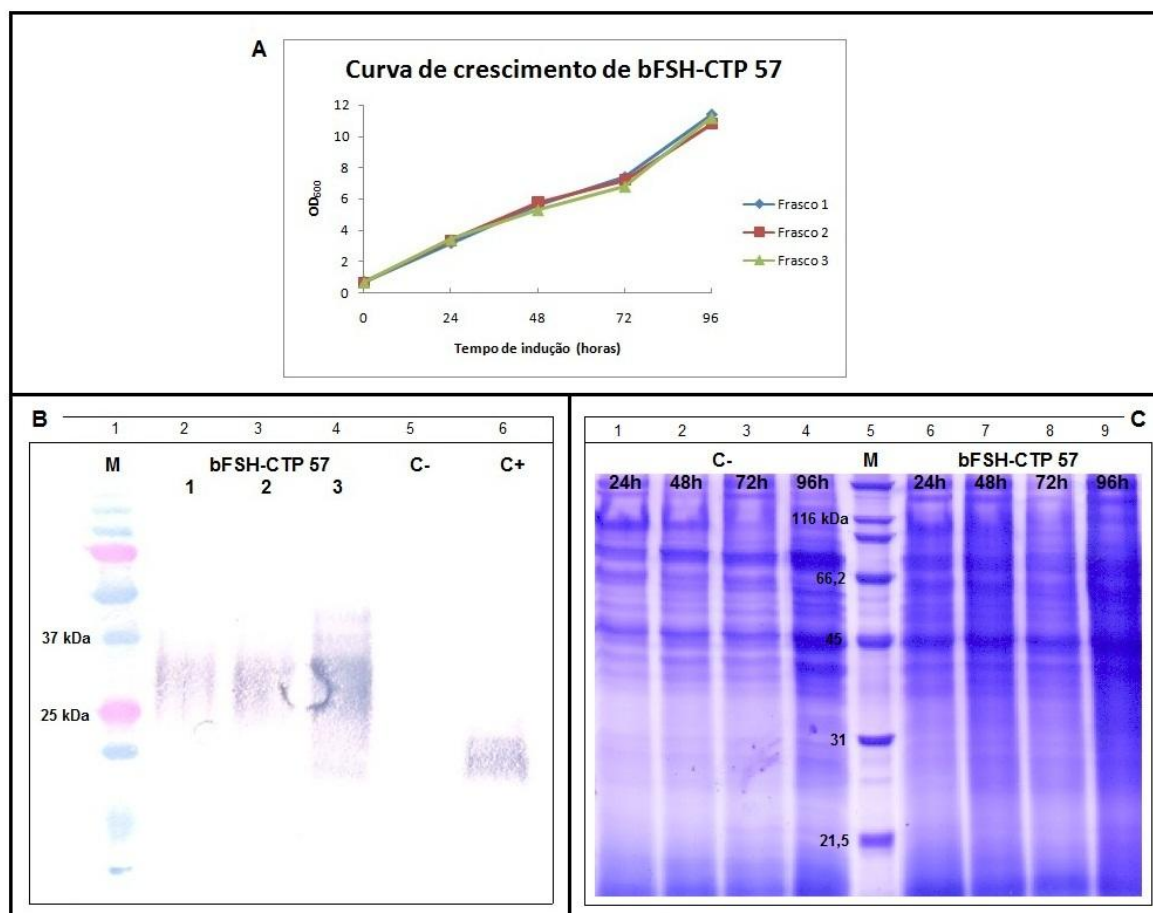


Figura 17. A) Curva de crescimento de bFSH-CTP 57. B) *Western blot*. Anticorpo utilizado: anti-FSH $\beta$  - BD Biosciences. Poço 1 corresponde ao marcador. Poços 2, 3 e 4 correspondem respectivamente aos frascos de cultura 1, 2 e 3 utilizados na indução do clone bFSH-CTP 57. Poço 5 corresponde à amostra do tempo final de indução (96 horas) do controle negativo. Poço 6 corresponde ao controle positivo (FOLLITROPIN V). C) Gel de poliacrilamida desnaturante das proteínas presentes no sobrenadante da cultura do frasco 1 da indução de bFSH-CTP 57. Os poços 1, 2, 3 e 4 correspondem respectivamente às amostras dos tempos 24, 48, 72 e 96 horas de indução do clone de controle negativo. O poço 5 corresponde ao marcador. Os poços 6, 7, 8 e 9 correspondem respectivamente às amostras dos tempos 24, 48, 72 e 96 horas de indução do clone bFSH-CTP 57.

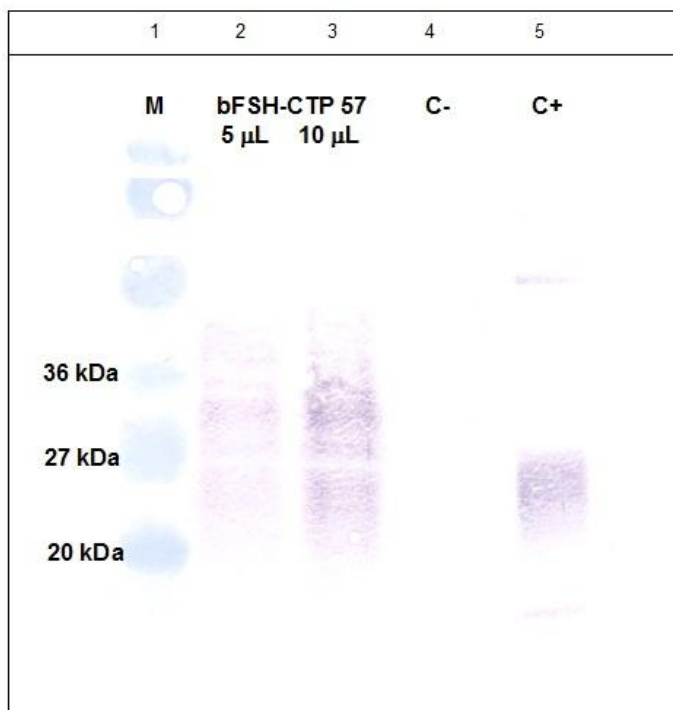


Figura 18. *Western blot* do sobrenadante concentrado e dialisado. Anticorpo utilizado: anti-FSH $\beta$  - BD Biosciences. Poço 1: marcador. Poço 2: 5  $\mu$ L de sobrenadante concentrado e dialisado obtido a partir do meio de cultura do tempo de 96 horas de indução do clone bFSH-CTP 57. Poço 3: 10  $\mu$ L de sobrenadante concentrado e dialisado obtido a partir do meio de cultura do tempo de 96 horas da indução do clone bFSH-CTP 57. Poço 4: Amostra do tempo de 96 horas de indução do clone de controle negativo. Poço 5: Controle positivo (FOLLTROPIN-V).

Os 4 mL de sobrenadante concentrado e dialisado foram utilizados nos experimentos de purificação de bFSH-CTP. Inicialmente foi feita uma purificação parcial utilizando-se cromatografia de exclusão molecular. O cromatograma da exclusão molecular está representado na figura 19A. As frações coletadas foram analisadas em gel de poliacrilamida desnaturante e em *western blot*. O *western blot* revelou a presença da proteína bFSH-CTP em duas frações, que correspondem ao pico de absorvância entre os tempos 10 e 15 minutos do cromatograma (Figura 19B).

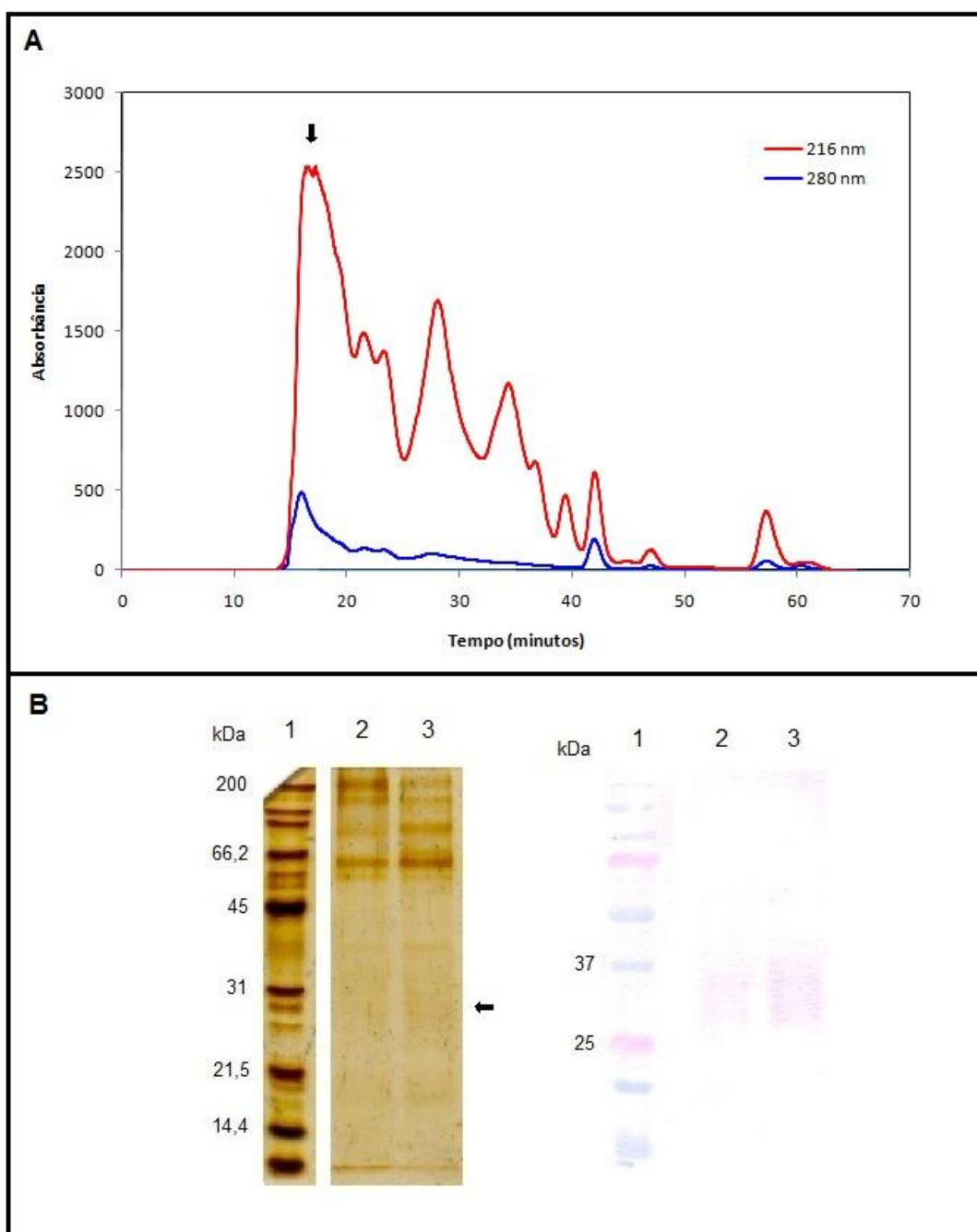


Figura 19. Cromatografia de exclusão molecular. A) Perfil da cromatografia de exclusão molecular. Seta indica onde a proteína bFSH-CTP está presente. B) Análise em gel de poliacrilamida e *western blot* mostrando as frações em que a proteína bFSH-CTP foi visualizada. Anticorpo utilizado: anti-FSH $\beta$  - BD Biosciences. Poço 1: marcador. Poço 2: fração 6 coletada na cromatografia de exclusão molecular. Poço 3: fração 7 coletada na cromatografia de exclusão molecular.

As duas frações da cromatografia de exclusão molecular em que a proteína bFSH-CTP foi visualizada (frações 6 e 7) foram utilizadas em cromatografia de fase reversa. O cromatograma de fase reversa está representado na figura 20A.



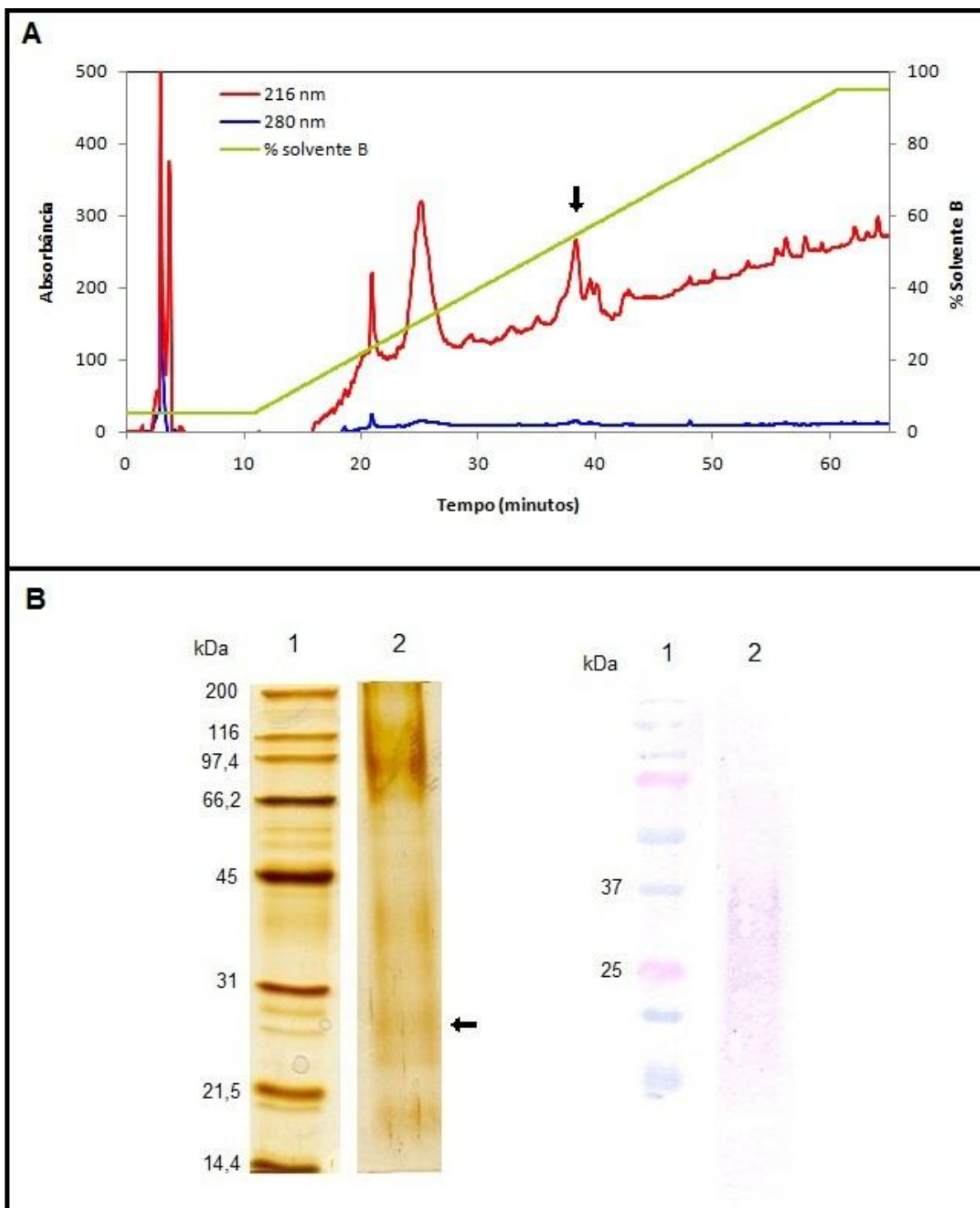


Figura 20. Cromatografia de fase reversa. A) Perfil da cromatografia de fase reversa. Seta indica o pico de absorvância que corresponde à proteína bFSH-CTP. B) Análise em gel de poliacrilamida e *western blot* mostrando a fração em que a proteína bFSH-CTP foi visualizada. Anticorpo utilizado: anti-FSH $\beta$  - BD Biosciences. Poço 1: marcador. Poço 2: fração em que bFSH-CTP aparece.

Foi feito um *screening* das frações coletadas na fase reversa por espectrometria de massa. Todas as frações em que se observaram proteínas de massas entre 25 a 40 kDa foram selecionadas e analisadas em gel de poliacrilamida desnaturante e *western blot*. O gel e o *western blot* revelaram que a proteína bFSH-CTP estava presente na fração correspondente ao tempo de aproximadamente 38 minutos do cromatograma de fase reversa (Figura 20B).

A cromatografia de fase reversa não possibilitou a purificação completa de bFSH-CTP, pois bandas relativas a outras proteínas ainda puderam ser visualizadas no gel de poliacrilamida desnaturante (Figura 20B). A purificação incompleta impediu a caracterização físico-química da proteína expressa.

## **5.6 Indução da expressão dos clones de bFSH-CTP em fermentador (realizado em colaboração com a empresa Ouro Fino)**

Foi feita a indução dos clones de bFSH-CTP em fermentador a fim de se obter uma maior quantidade de proteína recombinante.

Os clones bFSH-CTP 50, 57, e 80, que foram os melhores clones encontrados no *dot blot* do sobrenadante de bFSH-CTP (ver item 5.3, figura 13), foram selecionados e enviados para a Empresa Ouro Fino. Lá foi feita a indução da expressão desses clones em fermentador. Inicialmente foi feito um experimento preliminar fermentando-se os três clones de bFSH-CTP. O clone bFSH-CTP 80 apresentou melhor comportamento durante a fermentação e foi escolhido para ser fermentado novamente, dando continuidade aos experimentos. O perfil do cultivo de bFSH-CTP 80 em fermentador está representado na figura 21. A cada 12 horas de fermentação alíquotas do sobrenadante foram retiradas para acompanhamento do crescimento celular e concentração protéica e para a precipitação de proteínas do sobrenadante.

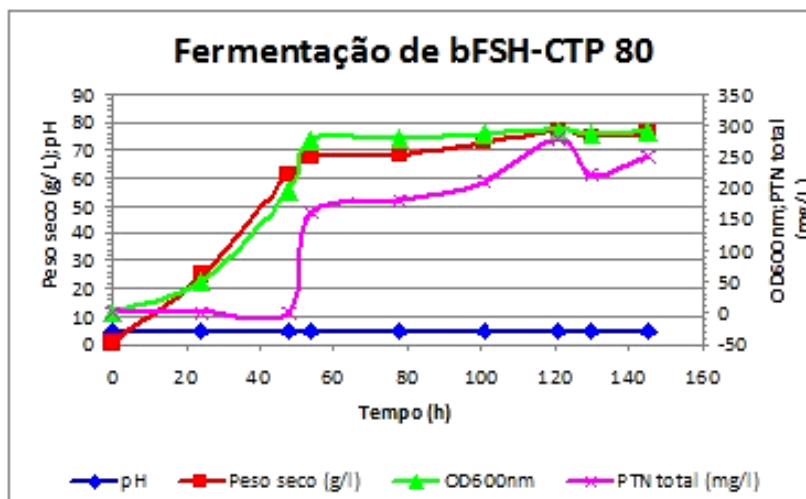


Figura 21. Perfil do cultivo de bFSH-CTP 80 em fermentador, destacando os valores de pH, peso seco em g/mL, densidade óptica em comprimento de onda de 600 nm e concentração de proteína total em mg/L.

As proteínas do sobrenadante das amostras dos tempos 54, 57, 78, 101, 121, 130 e 145 horas de fermentação foram analisadas por *western blot*. O *western blot* mostrou que houve a expressão da proteína desejada em fermentador (Figura 22A). Em uma segunda fermentação para confirmar a expressão da proteína desejada, amostras de tempos diferentes de fermentação foram analisadas por *western blot*: 24, 48, 72, 94, 123 e 140 horas. O *western blot* confirmou novamente que houve a expressão das proteínas nas culturas em fermentador (Figura 22B).

As culturas obtidas nas fermentações serão parcialmente purificadas e utilizadas em testes de atividade biológica pela empresa Ouro Fino. O teste de bioatividade já está sendo planejado e consistirá em um teste *in vivo* realizado em ratos.

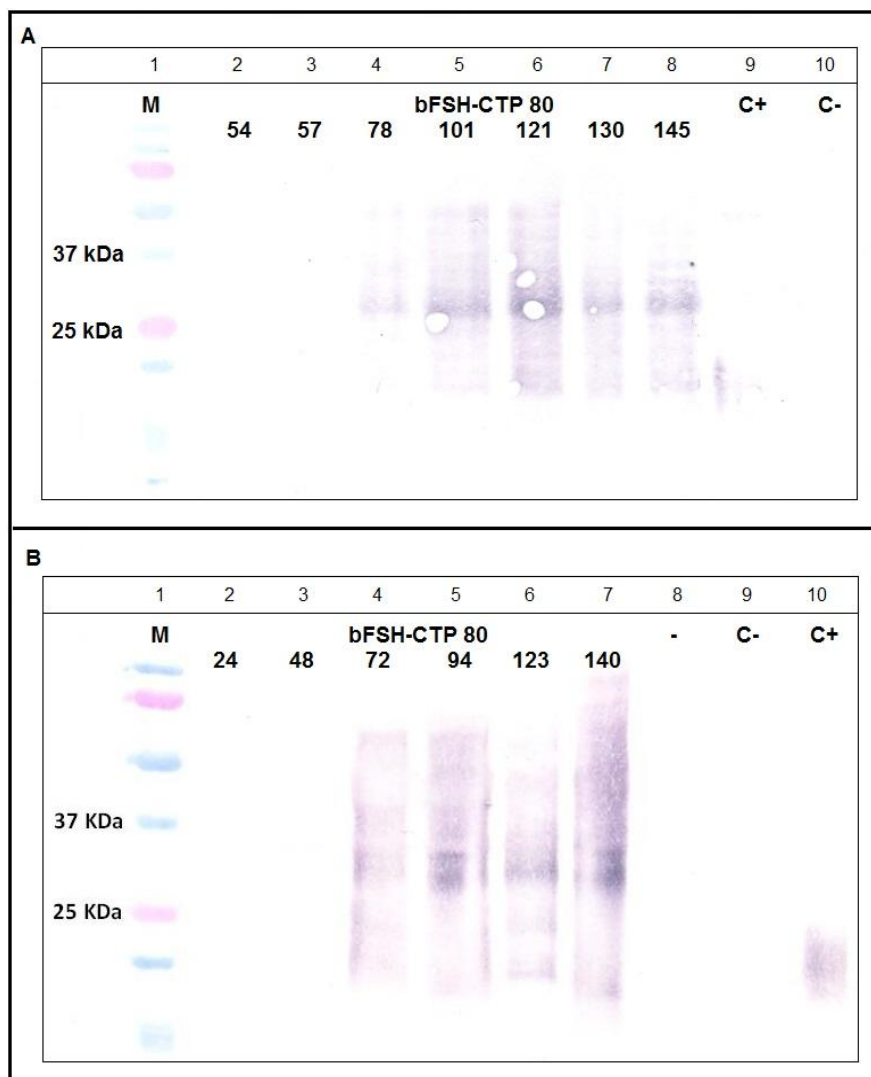


Figura 22. *Western blot* das amostras da indução do clone bFSH-CTP 80 em fermentador. Anticorpo utilizado: anti-FSH $\beta$  - BD Biosciences. A) Poço1: marcador. Poços 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8: amostras dos tempos 54, 57, 78, 101, 121, 130 e 145 horas de fermentação do clone bFSH-CTP 80, respectivamente. Poço 9: controle positivo (FOLLTROPIN-V). Poço 10: amostra do tempo 96 horas de indução do clone de controle negativo. B) Poço1: marcador. Poços 2, 3, 4, 5, 6 e 7: amostras dos tempos 24, 48, 72, 94, 123 e 140 horas de fermentação do clone bFSH-CTP 80, respectivamente. Poço 8: nada. Poço 9: amostra do tempo 96 horas de indução do clone de controle negativo. Poço 10: controle positivo (FOLLTROPIN-V).

## 6 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi demonstrada a expressão do hormônio folículo estimulante bovino (bFSH) em *Pichia pastoris*.

A primeira etapa realizada para a expressão de bFSH em *Pichia* foi o desenho dos genes sintéticos *bFSH-fus*, *bFSH-L* e *bFSH-CTP*. Nas três construções gênicas os genes das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  foram fusionados na orientação  $\beta\alpha$ , com o objetivo de se expressar o bFSH como uma cadeia polipeptídica única. Escolheu-se expressar a proteína de forma fusionada devido à importância da união das duas subunidades na atividade de FSH. É evidente que a formação do dímero é um passo essencial para a atividade biológica dos hormônios glicoprotéicos (PIERCE; PARSONS, 1981; RYAN *et al*, 1988; HARTREE; RENWICK, 1992; SUGAHARA *et al*, 1995). Esse fato pode ser corroborado por no mínimo quatro evidências: subunidades livres não apresentam atividade biológica; as duas subunidades participam da ligação ao receptor; após a formação dos dímeros há sinal para continuação da glicosilação, que contribui para a meia-vida do hormônio na circulação e para a transdução do sinal; a eficiência da secreção dos dímeros é determinada pela subunidade  $\beta$  (SUGAHARA *et al*, 1995). Dessa forma, quando se busca a expressão de hormônios glicoprotéicos em sistemas heterólogos é interessante que as duas subunidades sejam expressas de maneira fusionada em uma cadeia polipeptídica única. Quando as duas subunidades são expressas separadamente, se verificam dificuldades de formação e secreção do dímero (GARCIA-CAMPAYO; BOIME, 2001). A expressão de glicoproteínas de fusão supera essas limitações. Além disso, já que a dissociação das subunidades leva à inativação do heterodímero, os análogos de cadeia única muitas vezes podem apresentar meia-vida maior na circulação (SUGAHARA *et al*, 1995). Diversos hormônios glicoprotéicos de fusão que apresentam atividade biológica tanto *in vitro* como *in vivo* já foram produzidos (SUGAHARA *et al*, 1995; SUGAHARA *et al*, 1996; GARCIA-CAMPAYO *et al*, 1997), indicando a eficiência desse tipo de estruturação.

A orientação  $\beta\alpha$  foi escolhida porque as regiões C-terminal de  $\beta$  e N-terminal de  $\alpha$  podem ser modificadas sem efeito muito significativo na atividade biológica do heterodímero (SUGAHARA *et al*, 1995). Em contrapartida, estudos mostram a

importância de resíduos da região N-terminal de  $\beta$  e C-terminal de  $\alpha$  na ligação ao receptor (DIAS, 1996; GARCIA-CAMPAYO; BOIME, 2001; FAN; HENDRICKSON, 2005). O primeiro hormônio glicoprotéico de fusão foi produzido com as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  na orientação  $\beta\alpha$ . Trata-se da gonadotrofina coriônica humana (hCG) recombinante expressa em células CHO, que apresentou atividade biológica tanto *in vitro* como *in vivo* (SUGAHARA *et al*, 1995). FSH e LH humanos também já foram expressos em células CHO fusionando-se a região C-terminal de  $\beta$  à região N-terminal de  $\alpha$  (SUGAHARA *et al*, 1996; GARCIA-CAMPAYO *et al*, 1997). As proteínas foram secretadas corretamente apresentando atividade biológica. Esses resultados demonstram que as duas subunidades, quando fusionadas na orientação  $\beta\alpha$ , podem se dobrar adquirindo conformação apropriada. Evidencia-se também que a ligação não-covalente entre as duas subunidades não é requerida para a atividade biológica das gonadotrofinas.

Os genes sintéticos *bFSH-fus*, *bFSH-L* e *bFSH-CTP* diferem entre si quanto à presença ou ausência de sequências espaçadoras entre as duas subunidades. Para a expressão de FSH recombinante de fusão  $\beta\alpha$ , a adição de peptídeos conectores exógenos entre as duas subunidades deve ser considerada. Na expressão de CG de fusão  $\beta\alpha$ , a região C-terminal de  $\beta$  funciona como uma ponte conectora entre as duas subunidades do hCG recombinante (SUGAHARA *et al*, 1995). Isso porque a região C-terminal da subunidade  $\beta$  de CG difere da região C-terminal de FSH, LH e TSH. Ela contém aproximadamente 30 resíduos de aminoácidos e pelo menos 4 oligossacarídeos O-ligados e é denominada de CTP (*C-terminal peptide*) (PIERCE; PARSONS, 1981; HARTREE; RENWICK, 1992; GARCIA-CAMPAYO; BOIME, 2001). A região C-terminal de FSH é muito curta quando comparada à de CG, fazendo que o espaçamento entre a região C-terminal de  $\beta$  e N-terminal de  $\alpha$  fique reduzido. Acredita-se que o loop cinto de segurança, que estabiliza o heterodímero, seja perturbado, alterando a conformação estrutural da proteína (GARCIA-CAMPAYO; BOIME, 2001). FSH humano de fusão  $\beta\alpha$  já foi expresso em células CHO com e sem sequências espaçadoras (SUGAHARA *et al*, 1996). Na ausência de peptídeos conectores, a taxa de secreção de FSH foi muito baixa. Inesperadamente, no entanto, a ligação ao receptor e a transdução do sinal não foram alteradas. Isso mostra que a presença de sequências espaçadoras é importante para a expressão máxima da proteína, mas não necessariamente para a ligação ao receptor e

transdução do sinal. Dessa forma, neste trabalho decidiu-se expressar bFSH de fusão  $\beta\alpha$  com e sem sequências espaçadoras.

Em bFSH-fus, a região C-terminal de  $\beta$  é diretamente fusionada à região N-terminal de  $\alpha$ , sem a presença de peptídeos conectores. Em bFSH-L, foi utilizado um peptídeo conector de 16 aminoácidos que foi desenhado por modelagem molecular, a fim de proporcionar correto espaçamento entre as duas subunidades. Em bFSH-CTP, o peptídeo CTP de gonadotrofina coriônica equina foi colocado entre as duas subunidades. CTP é rico em prolina e não apresenta estruturação secundária. Quando CTP é colocado tanto na região C-terminal de  $\beta$  quanto em N-terminal de  $\alpha$ , há correto espaçamento entre as duas subunidades (SUGAHARA *et al*, 1995). Além disso, acredita-se que CTP possa aumentar a meia-vida de FSH na circulação. CTP tem papel na prolongada meia-vida de CG, quando comparada à dos outros hormônios glicoprotéicos. Um problema na administração de FSH em testes clínicos é a sua curta meia-vida *in vivo*, o que faz com que o uso clínico de FSH requeira a aplicação de várias injeções. Fares *et al* (1992) expressaram FSH humano (hFSH) em células CHO. As duas subunidades foram expressas separadamente e a subunidade  $\beta$  foi expressa com cópias de CTP fusionadas à sua região C-terminal. A presença do peptídeo CTP não afetou a união das duas subunidades e sua secreção. A potência biológica *in vivo* do hormônio foi aumentada e sua meia-vida foi prolongada (FARES *et al*, 1992).

*Pichia pastoris* foi o sistema heterólogo escolhido para a expressão dos três genes sintéticos devido a todas as vantagens dessa plataforma de produção. *Pichia* apresenta crescimento rápido em meios de cultura simples e sua manipulação genética é fácil e rápida. Altos níveis de produção protéica já foram relatados para *Pichia*. Além disso, esse é um sistema eucariótico capaz de realizar modificações pós-traducionais e de secretar as proteínas para o meio de cultura. O correto processamento pós-traducional de proteínas é uma característica essencial para a produção de FSH, já que a presença de ligações dissulfeto e de glicosilações são essenciais para sua atividade biológica. Quando comparado a outros sistemas eucarióticos de expressão, *Pichia pastoris* é o sistema mais barato e de escalonamento mais simples, o que o torna muito atrativo industrialmente. FSH de ovelha, porco e peixe já foram expressos em *Pichia* apresentando atividade biológica (FIDLER *et al*, 2003; RICHARD *et al*, 1998; BOZE *et al*, 2000; AIZEN *et al*,

2007; YU *et al*, 2008). FSH bovino com as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  separadas e co-expressas também já foi produzido em *Pichia* e foi biologicamente ativo (HUO *et al*, 2007).

Os códons dos genes sintéticos foram substituídos por códons mais frequentes de *Pichia pastoris*, com base no *codon usage* de *Pichia*. Códons que são mais comuns em uma espécie podem ser raros para outras, o que pode levar a dificuldades no processo de tradução em sistemas heterólogos, como retardo do processo ou terminação prematura da proteína (DALY; HEARN, 2005). A otimização de códons com base no *codon usage* pode evitar essas dificuldades e levar a níveis maiores de expressão de proteínas heterólogas em *Pichia*. Por mais que alguns trabalhos também já tenham relatado mudanças insignificantes de expressão com alteração de alguns códons (FIDLER *et al*, 2003), optou-se por otimizar os códons para *Pichia pastoris* nesse trabalho.

Os genes sintéticos foram sintetizados quimicamente e enviados para nosso laboratório clonados no vetor pPGK $\Delta$ 3. Esse vetor possui como promotor o gene *PGK1*, que codifica a 3-fosfoglicerato quinase, e permite a expressão constitutiva de proteínas heterólogas (ALMEIDA; MORAES; TORRES, 2005; ARRUDA, 2008). Apesar desse promotor já ter demonstrado atividade superior à do promotor *AOX1*, ele não possibilitou a aquisição de transformantes que expressassem as proteínas bFSH de fusão (dados não mostrados). Foram construídos, portanto os vetores de expressão pPIC9-bFSH-fus, pPIC9-bFSH-L e pPIC9-bFSH-CTP. O vetor pPIC9 possui como promotor o gene *AOX1*, que codifica a enzima álcool oxidase, e como marcador de seleção auxotrófico para *Pichia pastoris*, o gene *HIS4*. A linhagem celular GS115, que possui uma mutação e não apresenta o gene *HIS4*, foi utilizada para transformação com esse vetor. Após a transformação as células foram selecionadas pela habilidade de crescer em meio sem histidina. Foi verificado o crescimento de diversos clones His<sup>+</sup> nas placas da transformação. Esses clones foram analisados por *imuno blot* de colônia para verificar se eles realmente eram positivos para a expressão das proteínas recombinantes (item 5.3, figura 11). A grande maioria dos clones His<sup>+</sup>, no entanto, não expressou a proteína desejada. Isso se deve provavelmente a eventos de recombinação gênica que levam à conversão do alelo *his4* do genoma de *Pichia pastoris* pelo gene *HIS4* presente no vetor. Dessa forma, alguns transformantes incorporam somente o gene *HIS4*, apresentando



fenótipo His<sup>+</sup>, mas carecem das outras sequências adicionais presentes no vetor pPIC9 (CREGG *et al*, 2000). Esses eventos de recombinação ocorrem em 10 a 50% das colônias His<sup>+</sup> e parecem ser ainda mais freqüentes quando se utiliza a eletroporação para introdução dos vetores em *Pichia pastoris* (CREGG *et al*, 2000).

A secreção das proteínas desejadas para o meio de cultura foi analisada no experimento de *dot blot* do sobrenadante (item 5.3, figura 13). Esse experimento mostrou que a secreção das três proteínas de fusão para o ambiente extracelular foi eficiente. Apesar do requerimento de maiores análises, o *dot blot* sugere que as proteínas de fusão tenham se dobrado corretamente, adquirindo conformação tridimensional adequada. Isso porque somente proteínas corretamente dobradas são secretadas para o meio de cultura, como será discutido mais adiante.

Nos experimentos de *western blot* (Figuras 14, 15 e 16) observa-se que as três proteínas realmente foram expressas com as duas subunidades fusionadas. Isso pode ser confirmado analisando-se a massa molecular das bandas coradas, entre 25 e 37 kDa. Se as proteínas não estivessem fusionadas, a massa molecular observada seria menor, equivalente somente ao tamanho da subunidade  $\beta$  (aproximadamente 13 kDa para as três proteínas) já que o anticorpo utilizado é específico contra a cadeia  $\beta$  de FSH. Para o controle positivo FOLLTROPIN-V (que consiste de FSH comercial, extraído de glândulas pituitárias de suínos), por exemplo, a banda observada possui massa molecular aproximada de 22 kDa, equivalente ao tamanho da subunidade  $\beta$  de FSH pituitário suíno. Quando o controle positivo é fervido e analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, as duas subunidades se dissociam e somente a subunidade  $\beta$  é observada no *western blot*. Nas três construções gênicas utilizadas neste trabalho, portanto, a fusão entre as duas subunidades de bFSH se mostrou eficiente. Tanto o peptídeo conector (em bFSH-L), quanto o peptídeo CTP (em bFSH-CTP) possibilitaram a união eficiente das duas subunidades e a secreção do dímero fusionado. A construção bFSH-fus também possibilitou a secreção do dímero de cadeia única.

A fim de se buscar uma caracterização físico-química e estrutural mais apurada das proteínas produzidas, buscou-se a purificação delas. A proteína bFSH-CTP foi escolhida para dar continuidade ao trabalho. A escolha de bFSH-CTP foi feita pelo fato de FSH humano já ter sido expresso na mesma construção, apresentando atividade biológica (SUGAHARA *et al*, 1996). Além disso, hFSH

expresso com as subunidades separadas, com a adição de CTP à região C-terminal de  $\beta$ , apresentou atividade biológica aumentada e meia-vida prolongada (FARES *et al*, 1992). Construções como a de bFSH-fus também já foram realizadas apresentando atividade biológica, mas a secreção desse tipo de proteína costuma ser menor (SUGAHARA *et al*, 1996). Realmente, como pode ser observado nos experimentos de *dot blot* do sobrenadante (Figura 13) e de indução em frasco (Figuras 14 e 16), a secreção de bFSH-fus foi menor quando comparada à de bFSH-CTP, o que poderia dificultar os experimentos de purificação. A proteína bFSH-CTP foi parcialmente purificada por cromatografia de exclusão molecular e de fase reversa. Não se conseguiu a purificação completa da proteína. Dessa forma, não foi possível a realização de experimentos de caracterização físico-química e estrutural de bFSH-CTP.

Sem a caracterização físico-química de bFSH-CTP, fica difícil afirmar se essa proteína está corretamente glicosilada. A proteína bFSH-CTP possui dois sítios para N-glicosilação na subunidade  $\alpha$  e dois na subunidade  $\beta$ . Além disso, o peptídeo CTP possui quatro sítios para O-glicosilação. *Pichia pastoris* é capaz de realizar tanto a N- quanto a O-glicosilação. *Pichia* adiciona carboidratos que consistem basicamente de  $\text{Man}_{8-9}\text{GlcNAc}_2$ , sendo que manosiltransferases podem posteriormente adicionar ainda mais resíduos de manose (CEREGHINO *et al*, 2002). Em humanos, os oligossacarídeos adicionados possuem uma estrutura central comum que consiste de  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ , podendo no final chegar a  $\text{Man}_{5-6}\text{GlcNAc}_2$  (ver oligossacarídeo rico em manose, figura 4). Essa diferença na quantidade de manoses adicionadas pode ser um problema na utilização terapêutica das glicoproteínas produzidas em *Pichia*. Proteínas hiperglicosiladas podem ser antigênicas, sendo rapidamente retiradas da circulação sanguínea (CEREGHINO *et al*, 2002). No entanto, diferentes FSHs produzidos em *Pichia* já se mostraram biologicamente ativos *in vivo* (FIDLER *et al*, 2003; HUO *et al*, 2007).

No trabalho de Huo *et al* (2007), que expressou bFSH com as subunidades separadas em *Pichia pastoris*, as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  se associaram formando um heterodímero biologicamente ativo de aproximadamente 35 kDa. A massa molecular teórica da proteína, sem contar as glicosilações, era de 24 kDa. Os autores afirmaram que a massa molecular maior encontrada indicava glicosilação do FSH recombinante. A produção de bFSH em leite de camundongos (GREENBERG *et al*,

1991) e de coelhos transgênicos (COULIBALY *et al*, 2002) levou à observação de proteína de massa molecular de 38 kDa. Em baculovírus (VAN DE WIEL *et al*, 1998) e em plantas (DIRNBERGER *et al*, 2001) foram produzidos bFSHs de 32,5 kDa e 30 kDa, respectivamente. As diferenças na composição dos oligossacarídeos N-ligados de cada sistema heterólogo pode ter levado à observação das massas diferentes dos bFSHs recombinantes (HUO *et al*, 2007). Neste trabalho, não foi possível a determinação da massa molecular de bFSH-CTP por espectrometria de massa, pois existiam outras proteínas na fração analisada na placa de MALDI-TOF/TOF. Os experimentos de *western blot* também não foram capazes de determinar apuradamente a massa da proteína, pois foram visualizadas bandas coradas de massa molecular entre 25 kDa e 37 kDa para bFSH-CTP (Figura 16). Torna-se, portanto, incerto prever qualquer coisa acerca de glicosilação da proteína expressa.

No presente trabalho os níveis de expressão de bFSH em frasco foram baixos. Isso é evidenciado pelas bandas fracas visualizadas nos géis de poliacrilamida desnaturante dos experimentos de purificação de bFSH-CTP (Figuras 19 e 20) e pela não visualização de bandas definidas relativas às proteínas de fusão nos géis de poliacrilamida desnaturante dos experimentos de indução em frasco (dados não mostrados). Bandas relativas às proteínas só puderam ser visualizadas por *western blot* (Figuras 14, 15 e 16). A expressão baixa, porém, não é surpreendente e está em acordo com outros dados da literatura. O rendimento de produção de FSH em *Pichia pastoris* costuma ser baixo quando comparado ao que *Pichia* consegue alcançar. Enquanto que trabalhos descrevem níveis de expressão de diversas proteínas em *Pichia* na ordem de mg/mL (ROMANOS, 1995), o rendimento da produção de FSH costuma ser da ordem de µg/mL. FSH de tilápia (AIZEN *et al*, 2007) e FSH ovino (FIDLER *et al*, 2003) já foram expressos em *Pichia pastoris* na concentração de 0,1 µg/mL. A fim de verificar se os níveis de produção de FSH poderiam ser aumentados, Fidler *et al* (2003) examinaram diversos fatores que poderiam influenciar a expressão. Eles testaram a utilização de diferentes sequências sinal de secreção, de diversos vetores de expressão, de variadas linhagens celulares, de dois fenótipos dos recombinantes (Mut<sup>+</sup> ou Mut<sup>s</sup>) e ainda substituíram alguns códons nativos, utilizando o *codon usage* de *Pichia*. Nenhum desses fatores alterou significativamente o nível de expressão de FSH em *P. pastoris*. FSH de porco já foi produzido na concentração de 1 µg/mL (RICHARD *et*

al, 1998) e a produção de 2 µg/mL de FSH de enguia japonesa em *P. pastoris* também já foi reportada (AIZEN *et al*, 2007). Rendimento um pouco maior na produção de FSH de porco foi obtido em fermentador (280 µg/mL) (BOZE *et al*, 2000). Na verdade, nenhum sistema de expressão foi capaz de expressar quantidades exorbitantes de FSH (RICHARD *et al*, 1998). A maior quantidade de FSH recombinante já descrita foi de 8 mg/mL em células CHO (hFSH) e em linhagem celular S2 de *Drosophila sp.* (FSH de bagre) (OUT *et al*, 1997; AIZEN *et al*, 2007). Nível baixo de expressão de FSH recombinante pode ser o fator que limita a sua utilização comercial (HUO *et al*, 2007).

Os baixos níveis de expressão de bFSH vistos neste trabalho (e também em outros) se devem muito provavelmente à complexidade da molécula de FSH, que é altamente dobrada e apresenta glicosilações e diversas ligações dissulfeto. Isso pode dificultar sua secreção para o meio de cultura. De fato, dobramento protéico e formação de ligações dissulfeto são fatores limitantes na via de secreção protéica de leveduras (HUO *et al*, 2007). As proteínas são dobradas no retículo endoplasmático, onde existe um sistema de controle de qualidade que assegura que somente proteínas corretamente dobradas serão secretadas para o meio extracelular (AGAPHONOV *et al*, 2002). Proteínas mal dobradas são rapidamente degradadas pela via de degradação protéica associada ao retículo endoplasmático ou por proteases vacuolares (AGAPHONOV *et al*, 2002). Isso faz com que, apesar da via de secreção de leveduras ser similar à de outros eucariotos, nem todas as proteínas de eucariotos superiores possam ser eficientemente secretadas em leveduras (AGAPHONOV *et al*, 2002). A co-expressão de FSH com proteínas que facilitem seu dobramento correto pode levar a um aumento da sua expressão e secreção. A proteína dissulfeto isomerase (PDI) possui atividade de isomerase e de chaperona, participando de processos como dobramento e modificações pós-traducionais, por catalisar a oxidação e a isomerização de dissulfetos. A co-expressão de PDI com outras proteínas já ajudou a aumentar seus níveis de secreção em *S. cerevisiae* e *P. pastoris* (HUO *et al*, 2007). A co-expressão de PDI com bFSH em *Pichia* levou a um nível de expressão seis vezes maior do que sem a PDI (HUO *et al*, 2007). O nível de expressão encontrado no trabalho ainda foi modesto, mas os autores afirmaram que considerando o aumento da produção em fermentadores, a expressão de FSH pode alcançar níveis altos no futuro.

O escalonamento da produção com a utilização de fermentadores ainda é a metodologia mais procurada para a obtenção de altos níveis de proteínas recombinantes em *Pichia pastoris*. Na tentativa de se produzir maiores quantidades de bFSH para a realização de testes *in vivo* de atividade biológica e para a futura produção industrial e utilização comercial dessa proteína, buscou-se a indução da expressão dos recombinantes em fermentador. A fermentação foi realizada pela empresa Ouro Fino. Os experimentos de fermentação, no entanto, ainda representam estudos preliminares. Não se pode afirmar que o nível de expressão de bFSH foi maior em fermentador do que em frasco. O que se pode afirmar até o momento é que a expressão de bFSH está sendo eficiente em fermentador, como pode ser visto pelos experimentos de *western blot* detalhados neste trabalho (Figura 22). Há necessidade de maiores análises e de extensão dos parâmetros de crescimento analisados a fim de se obter otimização do processo de produção de bFSH.

## 7 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foi possível a expressão de FSH bovino recombinante em *Pichia pastoris*. Apesar de bFSH já ter sido expresso de diversas maneiras em diferentes sistemas heterólogos e até mesmo em *Pichia pastoris*, este é o primeiro trabalho que mostra a expressão de FSH bovino com as duas subunidades fusionadas em *Pichia*. Esta construção apresenta vantagens, pois não se verificam dificuldades de formação e secreção do dímero de FSH, que ocorre quando as duas subunidades são expressas separadamente.

*Pichia pastoris* pode ser uma plataforma atraente para a produção de bFSH. No entanto, o nível de produção dessa proteína foi baixo quando comparado ao que *Pichia* pode produzir. A produção de bFSH está sendo otimizada em fermentador juntamente com a indústria Ouro Fino. Testes de atividade *in vivo* também estão sendo planejados juntamente com a empresa, a fim de verificar a eficiência biológica das proteínas de fusão expressas. Ainda são necessárias análises mais apuradas de caracterização protéica para verificar se as proteínas estão sendo expressas corretamente.

A produção de FSH bovino recombinante em *Pichia* não apresenta as desvantagens encontradas nos métodos tradicionais de produção, como fonte de FSH, transmissão de patógenos e contaminação com outras gonadotrofinas. Isso faz com que o bFSH recombinante seja muito atrativo para utilização comercial. Não existem preparações de bFSH recombinante disponíveis para comercialização. Aliás, não há produção nem de FSH pituitário no Brasil. As preparações para utilização na pecuária devem ser importadas. Esse trabalho é, portanto, um passo inicial importante para que no futuro se possa produzir bFSH recombinante em nível industrial, possibilitando, quem sabe, sua utilização comercial em processos de melhoramento genético de bovinos no Brasil.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAPHONOV, M. O; ROMANOVA, N. V.; TRUSHKINA, P. M.; SMIRNOV V. N.; TER-AVANESYAN, M. D. Aggregation and retention of human urokinase type plasminogen activator in the yeast endoplasmic reticulum. **BMC Molecular Biology**, 3, 15, 1-8, 2002.

AIZEN, J.; KASUTO, H.; GOLAN, M.; ZAKAY, H.; LEVAVI-SIVAN, B. Tilapia follicle-stimulating hormone (FSH): immunochemistry, stimulation by gonadotropins-releasing hormone, and effect of biologically active recombinant FSH on steroid secretion. **Biology of Reproduction**, 76, 692-700, 2007.

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.

ALVES, A. R.; MARINHO, C. M.; ABREU, V.; BARROS, K. M. Bovinocultura leiteira. **Boletim setorial do agronegócio**. SEBRAE, Recife - PE, 3, agosto, 2010. Disponível em <<http://200.249.132.89:8030/downloads/Boletim-Bovinocultura.pdf>>. Acesso em fevereiro de 2011.

ALVEZ, D. D.; MANCIO, A. B. Maciez da carne bovina: uma revisão. **Revista da FZVA**, 14, 1, 193-216, 2007.

ARRUDA, A. **Utilização do promotor do gene PGK1 de *Pichia pastoris* para expressão heteróloga**. 2008. 90 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular)-Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE (ABIEC). **Rebanho Brasileiro. Estatísticas**. Apresenta estatísticas sobre a exportação brasileira de carne. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br>>. Acesso em janeiro de 2011.

BARBOSA, R. T.; MACHADO, R. Panorama da inseminação artificial em bovinos. **Documentos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos - SP, 84, novembro, 2008. Disponível em: <<http://www.cppse.embrapa.br/080servicos/070publicacaogratis/documentos/Documentos84.pdf>>. Acesso em agosto de 2010.

BARROS, C. M.; BARCELOS, A. C. Z.; NOGUEIRA, M. F. G. Superovulação com inseminação artificial em tempo fixo. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2º, 2006. **Biotechnology da Reprodução em Bovinos**. 165-171.

BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G. Superovulação em zebuínos de corte. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 1º, 2004. **Biotechnology da Reprodução em Bovinos**. 212-222.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, 8, 93-99, 1987.

BOETTNER, M.; PRINZ, B.; HOLZ, C.; STAHL, U.; LANG, C. High-throughput screening for expression of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, 99, 51-62, 2002.

BOURNE, H. R. Drug Receptors and Pharmacodynamics. In: KATZUNG, B. G. **Basic and Clinical Pharmacology**, 7. ed. Stamford, Connecticut: Appleton & Lange, 1997. 9-33.

BOZE, H.; LABORDE, C.; CHEMARDIN, P.; RICHARD, F.; VENTURIN, C.; COMBARNOUS, Y.; MOULIN, G. High-level secretory production of recombinant porcine follicle-stimulating hormone by *Pichia pastoris*. **Process Biochemistry**, 36, 907-913, 2001.

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

CARVALHO, G. R. A indústria de laticínios no Brasil: passado, presente e futuro. **Circular Técnica da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora – MG, 102, dezembro, 2010. Disponível em: <[http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/livraria/abrir\\_pdf.php?id=26](http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/livraria/abrir_pdf.php?id=26)>. Acesso em fevereiro de 2011.

CEREGHINO, G. P. L.; CEREGHINO, J. L.; ILGEN, C.; CREGG, J. M. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**, 13, 329-332, 2002.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, 24, 45-66, 2000.

COULIBALY, S.; BESENFELDER, U.; MILLER, I.; ZINOVIEVA, N.; LASSING, C.; KOTLER, T.; JAMESON, J. L.; GEMEINER, M.; MÜLLER, M.; BREM, G. Expression and characterization of functional recombinant bovine follicle-stimulating (boFSH $\alpha/\beta$ ) hormone produced in the milk of transgenic rabbits. **Molecular Reproduction and Development**, 63, 300-308, 2002.

CREGG, J. M.; VEDVICK, T. S.; RASCHKE, W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. **Nature Biotechnology**, 11, 905-910, 1993.

CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L.; SHI, J.; HIGGINS, D. R. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology**, 16, 1, 23-52, 2000.

DALY, R.; HEARN, M. T. W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**, 18, 119-138, 2005.



DIAS, J. A. Human follitropin heterodimerization and receptor binding structural motifs: identification and analysis by a combination of synthetic peptide and mutagenesis approaches. **Molecular and Cell Endocrinology**, 125, 45-54, 1996.

DIAS, J. A.; VAN ROEY, P. Structural biology of human follitropin and its receptor. **Archives of Medical Research**, 32, 510-519, 2001.

DIAS, J. A. Fertility hormone in repose. **Nature**, 433, 203-204, 2005.

DIRNBERGER, D.; STEINKELLNER, H.; ABDENNEBI, L.; REMY, J.; VAN DE WIEL, D. Secretion of biologically active glycoforms of bovine follicle-stimulating hormone in plants. *Eur. J. Biochem.* 268, 4570-4579, 2001.

FAN, Q. E.; HENDRICKSON, W. A. Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. **Nature**, 433, 269-277, 2005.

FARES, F. A.; SUGANUMA N.; NISHIMORE, K.; LAPOLT, P. S.; HSUEH, A. J. W.; BOIME, I. Design of a long-acting follitropin agonist by fusing the C-terminal sequence of the chorionic gonadotropin  $\beta$  subunit. **PNAS**, 89, 4303-4308, 1992.

FARES, F. The role of o-linked and n-linked oligosaccharides on the structure-function of glycoprotein hormones: development of agonists and antagonists. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1760, 560-567, 2006.

FIDLER, A. E.; LIN, J. S.; CHIE, W. N.; WESTERN, A.; STENT, V.; MCNATTY, K. P. Production of biologically active tethered ovine FSH $\beta\alpha$  by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Journal of Molecular Endocrinology**, 30, 213-225, 2003.

FOX, K. M.; DIAS, J. A.; VAN ROEY, P. Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. **Molecular Endocrinology**, 15, 3, 378-389, 2001.

GARCIA-CAMPAYO, V.; BOIME, I. Novel recombinant gonadotropins. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, 12, 2, 72-77, 2001.

GARCIA-CAMPAYO, V.; BOIME, I. Independent activities of FSH and LH structurally confined in a single polypeptide: selective modification of the relative potencies of the hormones. **Endocrinology**, 142, 12, 5203-5211, 2001b.

GARCIA-CAMPAYO, V.; SATO, A.; HIRSCH, B. SUGAHARA, T.; MUYAN, M.; HSUEH, A. J.; BOIME, I. Design of stable biologically active recombinant lutropin analogs. **Nature Biotechnology**, 15, 663-667, 1997.

GELLISSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 54, 741-750, 2000.

GHARIB, S. D.; WIERNMAN, M. E.; SHUPNIK, M. A.; CHIN, W. W. Molecular biology of the pituitary gonadotropins. **Endocrinology Reviews**, 11, 177-199, 1990.

GREENBERG, N. M.; ANDERSON, J. W.; HSUEH, A. J.; NISHIMORI, K.; REEVES, J. J.; DEAVILA, D. M.; WARD, D. N.; ROSEN, J. M. Expression of biologically active

heterodimeric bovine follicle-stimulating hormone in milk of transgenic mice. **PNAS**, 88, 8327-8331, 1991.

HARTREE, A. S.; RENWICK, A. G. C. Molecular structures of glycoprotein hormones and function of their carbohydrate components. **Biochemistry Journal**, 287, 665-679, 1992.

HIGGINS, D. R. Overview of protein expression in *Pichia pastoris*. **Current Protocols in Protein Science**, 5.7.1-5.7.18, 1995.

HOLLENBERG, C. P. GELLISSEN, G. Production of recombinant proteins by methylophilic yeasts. **Current Opinion in Biotechnology**, 8, 554-560, 1997.

HUO, X.; LIU, Y.; WANG, X.; OUYANG, P.; NIU, Z.; SHI, Y.; QIU, B. Co-expression of human protein disulfide isomerase (hPDI) enhances secretion of bovine follicle-stimulating hormone (bFSH) in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, 54, 234-239, 2007.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999c. 427p.

KANITZ, W.; BECKER, F.; SCHNEIDER, F.; KANITZ, E.; LEIDING, C.; NOHNER, H.; PÖHLAND, R. Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropins treatment and insemination. **Reproduction Nutrition Development**, 42, 587-599, 2002.

KONING, W. J. de; WALSH, G. A.; WRYNN, A. S.; HEADON, D. R. Recombinant reproduction: the importance of gonadotrophic and related hormones in veterinary and human medicine may increase with the adoption of recombinant reproduction methods. **Nature Biotechnology**, 12, 988-992, 1994.

KOUTZ, P.; DAVIS, G. R.; STILLMAN, C.; BARRINGER, K.; CREGG, J. THILL, G. Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. **Yeast**, 5, 167-177, 1989.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, 227, 680-685, 1970.

LEEuw, R. de; MULDERs, J.; VOORTMAN, G.; ROMBOUT, F.; DAMM, J.; KLOOSTERBOER, L. Structure-function relationship of recombinant follicle-stimulating hormone (Puregon). **Molecular Human Reproduction**, 2, 5, 361-369, 1996.

LONGUI, C. A. Diagnóstico e tratamento de criptorquismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, 49, 165-171, 2005.

MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M. L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, 22, 249-270, 2005.

MAPLETOFT, R. J.; STEWARD, C. B.; ADAMS, G. P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, 42, 601-611, 2002.

OUT, H. J.; DRIESSEN S. G. A. J.; MANNAERTS B. M. J. L.; BENNINK, H. J. T. C. Recombinant follicle-stimulating hormone (follitropin beta, Puregon) yields higher pregnancy rates in *in vitro* fertilization than urinary gonadotropins. **Fertility and Sterility**. 68, 1, 138-142, 1997.

PIERCE, J. G.; PARSONS, T. F. Glycoprotein hormones: structure and function. **Annual Reviews in Biochemistry**, 50, 465-495, 1981.

QIAN, W.; LIU, Y.; ZHANG, C.; NIU, Z.; SONG, H.; QIU, B. Expression of bovine follicle-stimulating hormone subunits in *Hansenula polymorpha* expression system increases the secretion and bioactivity *in vivo*. **Protein Expression and Purification**, 68, 183-189, 2009.

RICHARD, F.; ROBERT, P.; REMY, J.; MARTINAT, M.; BIDART, J.; SALESSE, R.; COMBARNOUS, Y. High-level secretion of biologically active recombinant porcine follicle-stimulating hormone by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 245, 847-852, 1998.

ROMANOS, M. A.; SCORER, C. A.; CLARE, J. J. Foreign gene expression in yeast: a review. **Yeast**, 8, 423-488, 1992.

ROMANOS, M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. **Current Opinion in Biotechnology**, 6, 527-533, 1995.

RYAN, R. J.; CHARLESWORTH, M. C.; MCCORMICK, D. J.; MILIUS, R. P.; KEUTMANN, H. T. The glycoprotein hormones: recent studies of structure-function relationships. **FJ Reviews**, 2, 2661-2669, 1988.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 417p.

SILVA, P. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1314p.

SIMONI, M.; GROMOLL, J.; NIESCHLAG, E.. The follicle-stimulating hormone: receptor biochemistry, molecular biology, physiology, pathophysiology. **Endocrinology Reviews**, 18, 739-773, 1997.

SIQUEIRA, F.; JUNIOR, R. A. A. T.; REGITANO, L. C. A.; FEIJÓ, G. L. D. Genética Molecular Aplicada à Qualidade da Carne Bovina. **Documentos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande - MS, 170, novembro, 2007. Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/doc/doc170/DOC170.pdf>>. Acesso em agosto de 2010.

SUGAHARA, T.; PIXLEY, M. R.; MINAMI, S.; PERLAS, E.; BEN-MENAHAM, D.; HSUEH, A. J.; BOIME, I. Biosynthesis of a biologically active single peptide chain

containing the human common  $\alpha$  and chorionic gonadotropins  $\beta$  subunits in tandem. **PNAS**, 92, 2041-2045, 1995.

SUGAHARA, T.; SATO, A.; KUDO, M.; BEN-MENACHEM, D.; PIXLEY, M. R.; HSUEH, A. J. W.; BOIME, I. Expression of biologically active fusion genes encoding the common  $\alpha$  subunit and the follicle-stimulating hormone  $\beta$  subunit: role of linker sequence. **The Journal of Biological Chemistry**, 271, 10445–10448, 1996.

ULLOA-AGUIRRE, A. Role of glycosylation in function of follicle-stimulating hormone. **Endocrine**, 11, 3, 205-215, 1999

ULLOA-AGUIRRE, A. TIMOSSO, C. Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. **Human Reproduction Update**, 4, 3, 260-283, 1998.

VAN DE WIEL, D. F. M.; VAN RIJN, P.A.; MELOEN, R. H.; MOORMANN, R. J. M. High-level expression of biologically active recombinant bovine follicle-stimulating hormone in a baculovirus system. **Journal of Molecular Endocrinology**, 20, 83-98, 1998.

YU, X.; LIN, S. W.; KOBAYASHI, M.; GE, W. Expression of recombinant zebrafish follicle-stimulating hormone (FSH) in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Fish Physiology and Biochemistry**, 36, 2, 273-281, 2008.

## 9 ANEXOS

### Anexo 1. Codon usage de *Pichia pastoris*.

#### *Pichia pastoris* [gbpln]: 137 CDS's (81301 codons)

fields: [triplet] [frequency: **per thousand**] ([number])

UUU	24.1 ( 1963)	UCU	24.4 ( 1983)	UAU	16.0 ( 1300)	UGU	7.7 ( 626)
UUC	20.6 ( 1675)	UCC	16.5 ( 1344)	UAC	18.1 ( 1473)	UGC	4.4 ( 356)
UUA	15.6 ( 1265)	UCA	15.2 ( 1234)	UAA	0.8 ( 69)	UGA	0.3 ( 27)
UUG	31.5 ( 2562)	UCG	7.4 ( 598)	UAG	0.5 ( 40)	UGG	10.3 ( 834)
CUU	15.9 ( 1289)	CCU	15.8 ( 1282)	CAU	11.8 ( 960)	CGU	6.9 ( 564)
CUC	7.6 ( 620)	CCC	6.8 ( 553)	CAC	9.1 ( 737)	CGC	2.2 ( 175)
CUA	10.7 ( 873)	CCA	18.9 ( 1540)	CAA	25.4 ( 2069)	CGA	4.2 ( 340)
CUG	14.9 ( 1215)	CCG	3.9 ( 320)	CAG	16.3 ( 1323)	CGG	1.9 ( 158)
AUU	31.1 ( 2532)	ACU	22.4 ( 1820)	AAU	25.1 ( 2038)	AGU	12.5 ( 1020)
AUC	19.4 ( 1580)	ACC	14.5 ( 1175)	AAC	26.7 ( 2168)	AGC	7.6 ( 621)
AUA	11.1 ( 906)	ACA	13.8 ( 1118)	AAA	29.9 ( 2433)	AGA	20.1 ( 1634)
AUG	18.7 ( 1517)	ACG	6.0 ( 491)	AAG	33.8 ( 2748)	AGG	6.6 ( 539)
GUU	26.9 ( 2188)	GCU	28.9 ( 2351)	GAU	35.7 ( 2899)	GGU	25.5 ( 2075)
GUC	14.9 ( 1210)	GCC	16.6 ( 1348)	GAC	25.9 ( 2103)	GGC	8.1 ( 655)
GUA	9.9 ( 804)	GCA	15.1 ( 1228)	GAA	37.4 ( 3043)	GGA	19.1 ( 1550)
GUG	12.3 ( 998)	GCG	3.9 ( 314)	GAG	29.0 ( 2360)	GGG	5.8 ( 468)

Coding GC 42.73 % 1st letter GC 48.72 % 2nd letter GC 37.32 % 3rd letter GC 42.16 %