

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA PROGRAMA
INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA
COMITÊ CIENTÍFICO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO cDNA DO HORMÔNIO DE
CRESCIMENTO RECOMBINANTE DE TAMBAQUI NA LEVEDURA
Pichia pastoris

Bolsista: Larissa Matos Batista, FAPEAM

MANAUS

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA PROGRAMA
INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA
COMITÊ CIENTÍFICO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RELATÓRIO FINAL

PIB-B/0066/2014

EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO cDNA DO HORMÔNIO DE
CRESCIMENTO RECOMBINANTE DE TAMBAQUI NA LEVEDURA
Pichia pastoris

Bolsista: Larissa Matos Batista, FAPEAM

Orientador: Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade

Co-orientador: Prof. MSc. Elson Antonio Sadalla Pinto

MANAUS

2015

Sumário

1. Resumo	4
2. Introdução.....	4
3. Material e Métodos	9
3.1. Linhagem Hospedeira	9
3.2. Meios de cultivos.....	9
3.3. Transformação de <i>Pichia pastoris</i> GS115 com o vetor pPIC-tGH.....	10
3.4. Determinação fenotípica dos clones	12
3.5. Seleção dos clones de <i>Pichia pastoris</i> produtores de rtGH (<i>blotting</i> de colônia)	12
3.6. Indução dos clones produtores de rtGH em frascos agitados.....	13
3.7. Análise do produto expresso em gel desnaturante SDS-PAGE.....	14
3.8. Análise <i>Western blotting</i>	15
3.9. Purificação por cromatografia de afinidade	16
4. Resultados e Discussão	16
4.1. Transformação da linhagem hospedeira	16
4.2. Determinação dos fenótipos Mut ⁺ e Mut ^S dos clones recombinantes	16
4.3. <i>Blotting</i> de colônia.....	18
4.4. Indução do hormônio de crescimento recombinante de <i>Pichia pastoris</i> em frascos agitados	19
4.5. Análise do produto expresso em gel desnaturante SDS-PAGE do sobrenadante da cultura	21
4.6. Análise <i>Western blotting</i> do sobrenadante da cultura	22
4.7. Purificação do hormônio de crescimento recombinante do tabaqui	23
4.8. Análise do produto expresso em gel desnaturante SDS-PAGE dos clones purificados	25
4.9. <i>Dot blotting</i> das frações purificadas	26
5. Conclusão	27
Referências.....	29
Cronograma.....	31

1. Resumo

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é a principal espécie nativa cultivada no Brasil, sendo oriunda do rio Amazona e Orinoco, apresenta excelentes qualidades que o enquadra como um dos peixes mais adequados para a piscicultura. Sabe-se que o crescente aumento da pesca em populações naturais fez com que a criação em cativeiro tornasse uma alternativa para diminuição do impacto em estoques naturais, assim, é necessário o uso de tecnologias visando o crescimento de peixes em um tempo menor, diminuindo com isso, o tempo de espera para comercialização e consumo. O objetivo deste trabalho foi expressar o hormônio de crescimento recombinante de tambaqui (rtGH) na levedura *Pichia pastoris* da linhagem GS115. Primeiramente foi realizada a transformação genética da hospedeira selecionada utilizando o plasmídeo recombinante pPIC-tGH previamente construído por Sadalla-Pinto (2012), os clones de *P. pastoris* recombinantes produtores de rtGH foram selecionados em placa de petri contendo meio auxotrófico para histidina e, em seguida realizou-se a indução da expressão do rtGH em sistemas de frascos agitados. Após a indução, procedeu-se com a confirmação da expressão do rtGH por meio do SDS-PAGE e *Western blotting*. Após a confirmação da expressão, o rtGH recombinante foi purificado por cromatografia de afinidade. Ao final da pesquisa obteve-se um acervo de células recombinantes capazes de produzir altos níveis de rtGH. Portanto o uso do rtGH pode ser uma alternativa futura para intensificar o crescimento de peixes durante o cultivo em cativeiro.

Palavras-chave: Tambaqui, hormônio do crescimento, *Pichia pastoris*.

2. Introdução

Com a consequência da escassez do pescado nos estoques pesqueiros naturais, o aumento do preço do peixe fez com que a piscicultura surgisse como alternativa técnica e economicamente viável para produção de alimento proteico em curto espaço de tempo (Sebrae, 2001).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o pescado é a proteína animal mais saudável e consumida no mundo. Os brasileiros ultrapassaram o consumo mínimo de pescado recomendado pela OMS que é de 12 quilos por habitante ao ano. No Brasil, o consumo chega a 14,50 quilos por habitante/ano de acordo com o levantamento realizado (Embrapa, 2012a).

No Amazonas, maior bacia hidrográfica do mundo, o constante aumento da pressão da pesca extrativista sobre os estoques de populações naturais de peixe, associado ao aumento da demanda pelo pescado, vem contribuindo para a propagação da piscicultura no estado. Com o aumento das criações em

cativeiro, agrava-se a necessidade de se desenvolverem novas tecnologias de produção, buscando implementar o rendimento produtivo. Neste cenário, a principal espécie nativa dos rios Amazonas, Orinoco e seus afluentes, cultivada no Brasil, é o tambaqui (*Colossoma macropomum*), sendo considerado o segundo maior peixe de escamas da bacia amazônica, perdendo em porte somente para o pirarucu (*Arapaima gigas*), o tambaqui é destacado como o melhor candidato nativo para a piscicultura intensiva na Amazônia e em outras áreas do Brasil (Embrapa, 2012a; Suframa, 2003).

Dentre as excelentes qualidades do tambaqui, suas características o colocam como um dos peixes mais apropriados para a piscicultura, ele é um peixe redondo, apresenta crescimento rápido, fácil manuseio e o hábito alimentar diverso, sendo onívoro, é capaz de aproveitar diversos tipos de alimentos, desde frutas, caramujos, pequenos peixes, plantas, sementes, entre outros, de acordo com a disponibilidade destes alimentos ao longo do ano. Por exemplo, na época das cheias dos rios amazônicos, a floresta inundada oferece ao tambaqui um rico cardápio de sementes, plantas, frutos, castanhas, pequenos peixes, caramujos, dentre muitos outros alimentos naturais. Estes itens alimentares são facilmente triturados por seus dentes molariformes. Adicionalmente, o tambaqui apresenta grande habilidade em filtrar o zooplâncton presente na água, sendo este um importante alimento durante o período de vazante nos rios, quando os peixes são obrigados a se concentrar na calha dos rios (Kubitza, 2004b; Fernandes, 2005).

O *C. macropomum* (Cuvier, 1818), o tambaqui, é da Família Characidae. É um peixe de escamas, corpo romboidal, nadadeira adiposa curta com raios na extremidade, dentes molariformes e rastros branquiais longos e numerosos. Na natureza alcança porte máximo em torno de 100 cm e acima de 30 kg de peso. A coloração geralmente é parda na metade superior e preta na metade inferior do corpo, mas pode variar para mais clara ou mais escura dependendo da cor da água (Fernandes, 2005; Suframa, 2003).

O pacu, o tambaqui e a pirapitinga, bem como alguns híbridos entre estas espécies, são os peixes redondos de maior importância para a piscicultura comercial no Brasil. Estes peixes também são cultivados em países vizinhos, como é o caso do tambaqui e da pirapitinga, nativos e cultivados no Peru, na Colômbia e na Venezuela (kubitza, 2004a).

Deste modo, o fato de estarmos localizados na bacia amazônica, que é a região que detém a maior parte da mais extensa bacia hidrográfica do mundo, com 6.112.000 Km² cujos moradores possuem o hábito alimentar de consumir peixes, sendo que um dos peixes mais apreciados na Amazônia e em outras regiões é o tambaqui, pelo seu sabor único, consistência, coloração branca da carne, facilidade para obtenção de filés e cuja tecnologia de reprodução e criação em cativeiro é conhecida, tem-se buscado desenvolver novas tecnologias de cultivo do tambaqui com vista ao aumento do seu rendimento (Sebrae, 2001; Souza, 2009; Ibama, 2009).

A diminuição do pescado nos rios associado às pressões de demanda em Manaus tem despertado o desenvolvimento acentuado e desordenado da piscicultura. A criação de espécies em cativeiro tem sido uma estratégia para diminuir a pressão da pesca sobre as populações naturais, satisfazendo as necessidades alimentícias da população local, regional e nacional (Souza, 2009).

Este fato possibilitou a abertura de uma importante porta para o uso da tecnologia do DNA recombinante na piscicultura regional. Atualmente, foram iniciados outros estudos com cDNA e expressão de genes em espécies de peixes amazônicos. Neste aspecto, a expressão de um gene do tambaqui poderá abrir perspectivas para gerar produtos de interesse biotecnológico (Souza, 2009).

Na piscicultura, os genes envolvidos nos processos endócrinos de crescimento, têm um papel de destaque. O hormônio do crescimento (GH) ou somatotropina é um olipeptídeo de aproximadamente 22 kDa, composto de 190 a 204 aminoácidos (incluindo o peptídeo sinal). Sua estrutura protéica é globular sendo constituída de 4 alfa-hélices antiparalelas com 2 pontes dissulfeto entre as cadeias e uma porção aminoterminal invariável (Wallis, 1992).

Pesquisas intensas ao longo das últimas três ou quatro décadas tem demonstrado que a hormônio do crescimento (GH) tem uma posição central como um regulador do sistema endócrino e de funções fisiológicas nos peixes. O GH é um elemento essencial na regulação do crescimento, e é um hormônio com complexas funções metabólicas (Björnsson *et al.*, 2002). Nos peixes, tem muitas funções diferentes e participa de quase todos os principais processos

fisiológicos do corpo, incluindo a regulação iônica e de lipídios, proteínas, equilíbrio osmótico, metabolismo de carboidratos, crescimento do tecido esquelético e tecidos moles, reprodução e a função imunitária (Yousefian e Shirzad, 2011). O GH é um componente principal de um complexo sistema endócrino. Sinais neurais, neuroendócrinos e endócrinos estão integrados no sistema nervoso central e na glândula pituitária para regular a taxa de secreção de GH (Björnsson *et al.*, 2002).

Espera-se que alguma das aplicabilidades do uso do hormônio de crescimento recombinante seja a sua adição em rações de peixes, com vistas a um melhor rendimento no crescimento do peixe e diminuição no tempo de espera para comercialização do pescado (Souza, 2009). O mercado de rações para organismos aquáticos é o que mais cresce no mundo, dobrando a produção na última década. Esse aumento na produção ocorre principalmente devido aos avanços tecnológicos nos sistemas de produção de peixes e rações (Embrapa, 2014b).

O sucesso da expressão heteróloga por meio das técnicas moleculares sugere a possibilidade de produção em larga escala do hormônio de crescimento de peixes, que pode ser utilizado como fator anabólico suplementar em rações comumente utilizadas em piscicultura, o que será uma inovação nas tecnologias de cultivo de pescados (Sadalla-Pinto, 2012).

Assim, estudos sugerem que o uso de leveduras pode trazer benefícios à produção animal, pois através da complementação ou suplementação da alimentação com a levedura *Pichia pastoris*, será possível introduzir outras proteínas no organismo dos animais como forma de estimular seu crescimento e sua imunidade, além de suprir eventuais deficiências nutricionais, que podem aparecer eventualmente em certas dietas (França, 2011).

Segundo Cintra (2010) a levedura *P. pastoris* representa um excelente modelo de expressão heteróloga a ser empregado quando se deseja produzir maiores quantidades de proteína recombinante. *Pichia pastoris* tem muitas vantagens de eucariontes superiores, tais como sistema de expressão, processamento e dobramento de proteína, modificação pós-traducionais que a tornam muito úteis como sistema de expressão de proteína (Invitrogen, 2010).

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* tem sido descrita como um sistema adequado de expressão de proteínas heteróloga devido algumas propriedades favoráveis como: altos níveis de expressão sob o controle do promotor AOX1 que permite a transcrição dos produtos gênicos a ele fusionados sob regulação de metanol, integração do cassete de expressão no genoma da levedura de forma estável (Cereghino e Cregg, 2000; Cregg *et al.*, 2009).

Proteínas endógenas expressas em *P. pastoris* podem ser produzidas quer intracelularmente ou extracelular. Porque esta levedura segrega apenas baixos níveis de proteínas endógenas, a proteína heteróloga secretada constitui a maioria da proteína total no meio (Cereghino e Cregg, 2000).

A expressão de qualquer gene estranho em *P. pastoris* exige três passos básicos: (1) a inserção do gene para uma vetor de expressão; (2) introdução do vetor de expressão no genoma de *P. pastoris*; e (3) o exame de expressão do potencial de estirpes para o produto do gene estranho (Cereghino e Cregg, 2000).

Existem três fenótipos associados ao metabolismo do metanol, e são divididos em: Mut⁺ (*methanol utilization plus*) refere-se a capacidade da estirpe em metabolizar metanol como única fonte de carbono, pela presença dos genes AOX1 e AOX2, contudo o AOX1 é o produto do gene responsável pela maior parte da atividade de oxidase de álcool na célula. A expressão do gene AOX1 é fortemente regulada e induzida por metanol a níveis muito elevados. As estirpes que apresentam fenótipo Mut^s (*methanol utilization slow*) mostram pouco crescimento em meio de metanol pela perda do gene AOX1, resultando em uma redução da capacidade das células em metabolizar metanol, e a Mut⁻ (*methanol utilization minus*), que é incapaz de crescer em metanol como única fonte de carbono devido a uma inativação de ambos os genes de AOX. Porém a vantagem potencial de cepas Mut^s é que elas utilizam menos metanol e, por vezes, expressam níveis elevados de proteína externa do que linhagens tipo selvagem (Mut⁺) (Cereghino e Cregg, 2000; Invitrogen, 2010).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho é expressar o hormônio de crescimento recombinante de tambaqui (rtGH) na levedura *Pichia pastoris* da linhagem GS115. Com o intuito de contribuir para o desenvolvimento de

inovações biotecnológicas, visando ser utilizadas no aumento da produtividade do tambaqui, tornando-o uma espécie mais rentável à piscicultura.

3. Material e Métodos

3.1. Linhagem Hospedeira

***Pichia pastoris* GS115:** A linhagem hospedeira GS115 tem uma mutação no gene histidinol desidrogenase (*his4*) que a impede de sintetizar histidina. Todos os plasmídeos de expressão são portadores do gene HIS4 que complementa *his4* no hospedeiro, então os transformantes são selecionados quanto à sua capacidade para crescer em meio deficiente em histidina (Invitrogen, 2010).

Tabela 1 – Linhagem de *Pichia pastoris* utilizada e seu respectivo genótipo e fenótipo

Linhagem	Genótipo	Fenótipo
GS115	<i>his4</i>	Mut ⁺

Fonte: (Invitrogen, 2010).

3.2. Meios de cultivos

Meio de cultura para manutenção da linhagem de <i>P. pastoris</i>	
YPD (Yeast Extract, Peptone, Dextrose Medium)	Concentração
Extrato de levedura	1%
Peptona	2%
Glicose	2%
Ampicilina	100µg/ml
Agar	2%

Meio de cultura para o aumento de massa celular		Meio de cultura para a indução da expressão da proteína heteróloga	
BMGY-U (Buffered Glycerol Complex Medium)	Concentração	BMMY-U (Buffered Methanol Complex Medium)	Concentração
Extrato de levedura	1%	Extrato de levedura	1%
Peptona	2%	Peptona	2%
Tampão fosfato	100mM	Tampão fosfato	100mM
YNB	1,34%	YNB	1,34%
Glicose	1%	Metanol	0,5%
Ampicilina	100µg/ml	Ampicilina	100µg/ml

Meio de cultura para seleção de células transformantes		Meio de cultura para determinação fenotípica	
MD (<i>Minimal Dextrose Medium</i>)	Concentração	MM (<i>Minimal Methanol Medium</i>)	Concentração
Agar	2%	Agar	2%
YNB	1,34%	YNB	1,34%
Glicose	2%	Metanol	0,5%
Biotina	4x10 ⁻⁵ %	Biotina	4x10 ⁻⁵ %
Ampicilina	100µg/ml	Ampicilina	100µg/ml

3.3. Transformação de *Pichia pastoris* GS115 com o vetor pPIC-tGH

Inicialmente foi necessário proceder com a preparação de células eletrocompetentes de *P. pastoris* GS115 para que, após impulso elétrico, pudessem receber em seu genoma o cassete de expressão contendo o gene codificador do hormônio de crescimento de tambaqui. Essas células foram preparadas de acordo com o protocolo descrito no manual de expressão gênica em *P. pastoris* (Invitrogen, 2010).

Para tal, uma colônia de células de *P. pastoris* GS115 foi inoculada em 5 mL de meio YPD em um *erlenmeyer* de 125 mL e cultivada por 24 horas a 30 °C. Aproximadamente 0,5 mL desse pré-inóculo foram adicionados em 500 mL de meio YPD (em *erlenmeyer* de 2 L) e incubados a 30 °C sob agitação de 200 rpm até a cultura atingir D.O.₆₀₀ de 1,3 a 1,5, que corresponde à fase de

crescimento exponencial com presença de células viáveis. Atingindo esta fase crescimento, as células foram centrifugadas a 1500 g por 5 minutos a 4 °C e ressuspensas em 500 mL de água gelada estéril. Esse passo foi repetido por mais duas vezes utilizando em cada repetição 250 mL de água gelada estéril. Em seguida, as células foram ressuspensas em 20 mL de sorbitol 1 M gelado estéril, novamente centrifugadas a 1500 g por 5 minutos a 4 °C e ressuspensas em 0,5 mL de sorbitol 1 M gelado estéril, completando para um volume final de 1,5 mL após delicada homogeneização. Ao final desse passo as células foram consideradas eletrocompetentes e estocadas em alíquotas de 80 µL em temperatura de -80 °C.

Para transformação das células eletrocompetentes de *P. pastoris* GS115, o vetor pPIC-tGH (Sadalla-Pinto, 2012) foi digerido com a endonuclease *SacI* para liberação do cassete de expressão contendo o cDNA do GH de tambaqui. As condições da reação de digestão foram de acordo com o fabricante (*New England BioLabs*): tampão NEB 3 1X, BSA 100 µg/mL, 5 U de *BglII*, 1,5 µL de DNA em volume final de 20 µL. A reação foi incubada a 37 °C por 3 horas

Para a eletroporação, foram utilizados 80 µL de células eletrocompetentes misturadas com 10 µg do DNA linearizado em volume de 10 µL em água MilliQ autoclavada. O sistema de transformação foi transferido para uma cuveta de eletroporação de 2 mm previamente resfriada e incubado em gelo por 5 minutos. Em seguida, as células foram submetidas à eletroporação de 1500 volts em eletroporador (Eletroporator 2510 – Eppendorf). Imediatamente após a eletroporação, as células foram ressuspensas em 1 mL de sorbitol 1 M gelado para auxiliar na recuperação da parede celular. O conteúdo foi transferido para um microtubo estéril de 1,5 mL e semeados volumes de 100, 200 e 300 µL em placas de *petri* contendo meio MD sem o aminoácido histidina para seleção auxotrófica das células transformantes. As placas foram incubadas a 30 °C até o surgimento de clones recombinantes His⁺, em geral em torno de 24 a 36 horas.

3.4. Determinação fenotípica dos clones

Para determinação dos fenótipos dos clones recombinantes na expressão do GH, os clones foram repicados com o auxílio de palitos estéreis em meio MD, *Minimal Dextrose Medium* (YNB 1,34%; biotina 4×10^{-5} %; glicose 2%; ágar 20 g/L) e MM, *Minimal Methanol Medium* (YNB 1,34%; biotina 4×10^{-5} %; metanol 0,5%; ágar 20 g/L) e incubados a 30°C por três dias com adição de metanol 0,5% nas tampas das placas com meio MM. Os clones de *Pichia pastoris* GS115/pPIC- α AMY funcionaram como controle Mut⁺ e Mut^s. A diferença de crescimento dos clones no meio MM revela seus respectivos fenótipos.

3.5. Seleção dos clones de *Pichia pastoris* produtores de rtGH (*blotting* de colônia)

A seleção dos clones produtores de rtGH foi realizada por meio de *blotting* de colônia de acordo com os procedimentos descritos abaixo.

Diversos clones de *P. pastoris* recombinante das linhagens mencionadas acima foram separadamente repicados em duas placas: uma com o meio de cultura MD, *Minimal Dextrose Medium* (YNB 1,34%; biotina 4×10^{-5} %; glicose 2%; ágar 20 g/L) e a outra com o meio de cultura MM, *Minimal Methanol Medium* (YNB 1,34%; biotina 4×10^{-5} %; metanol 0,5%; ágar 20 g/L). Esta etapa foi realizada com o auxílio de palitos estéreis, e as mesmas colônias foram repicadas nas duas placas, sendo, portanto réplicas entre si. As placas foram incubadas a 30 °C por 24 horas. A placa com meio MD foi estocada a 4 °C e a placa com meio MM foi utilizada para a seleção de clones secretores de rtGH, conforme os procedimentos a seguir.

Uma membrana de nitrocelulose foi colocada sobre as colônias na placa. Em seguida foram colocadas três camadas de papel de filtro, seguida de várias camadas de papel toalha. A placa foi tampada com o auxílio de um peso (aproximadamente 500 g), e novamente incubada por 3 horas a 30 °C para transferência das proteínas do meio à membrana de nitrocelulose. Em seguida, a membrana de nitrocelulose foi lavada com tampão PBST (NaCl 150 mM; Na₂HPO₄ pH 7,2 10 mM; Tween20 0,1%) para retirar o excesso de células e de

meio de cultura. Após, a membrana foi incubada com solução de bloqueio (leite desnatado 5 %, p/v, em PBST). A incubação foi por 1 hora a temperatura ambiente ou por 16 a 20 horas a 4 °C sob agitação branda. Após, a membrana saturada foi lavada 3 vezes com o tampão PBST. Em seguida, a membrana foi embebida em solução contendo o primeiro anticorpo (anti-His-tag C-terminal) e o sistema incubado por 1 hora a temperatura ambiente. Após a incubação a membrana foi lavada 3 vezes com PBST. Em seguida, a membrana, foi embebida em solução contendo o segundo anticorpo conjugado com fosfatase alcalina e o sistema incubado por 1 hora a temperatura ambiente. Após a incubação a membrana foi lavada 3 vezes com PBST e uma vez com APB (Tris-HCl pH 9,5 100 mM; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM). Em seguida foram adicionados 10-20 mL das soluções reveladoras BCIP e NBT (Invitrogen, *BCIP/NBT Kit*) dissolvidos em APB, conforme recomendações do fabricante. Após a incubação de 5 a 15 minutos, sob leve agitação, a reação foi parada através da retirada dos reagentes por sucessivas lavagens com água destilada.

A intensidade e o tamanho das manchas ao redor de cada colônia reflete aproximadamente o nível de secreção da proteína recombinante (rtGH) pelas diferentes colônias/linhagens. As colônias correspondentes aos maiores níveis de secreção foram selecionadas para os experimentos posteriores.

3.6. Indução dos clones produtores de rtGH em frascos agitados

Os clones de *P. pastoris* selecionados no experimento acima foram induzidos em frascos agitados nas condições padronizadas pelo manual de expressão gênica em *P. pastoris* (Invitrogen, 2010). Os procedimentos desta primeira indução estão apresentados a seguir.

Para aumento de massa celular, os clones selecionados no experimento do item anterior (3.5) e o controle negativo GS115/pPIC9 foram inoculados em 30 mL de meio de cultura BMGY-U, *Buffered Glycerol Complex Medium* (extrato de levedura 1%; peptona 2%, tampão fosfato pH 6,0 100mM; YNB ou uréia 1,34%, biotina 4×10^{-5} %; glicerol 1%; 100 µg/mL de ampicilina) em *erlenmeyer* de 250 mL e incubados a 30 °C sob agitação de 250 rpm até que a cultura atingisse D.O.₆₀₀ (Densidade Óptica a 600 nanômetro) entre 2-6, em

tempo aproximado de 18 a 24 horas. Ao atingir a D.O.₆₀₀ necessária, as culturas foram centrifugadas a 3000 rpm/10 minutos a 4 °C e ressuspensas em 50 mL de meio BMMY-U, *Buffered Methanol Complex Medium* (extrato de levedura 1%; peptona 2%, tampão fosfato pH 6,0 100mM; YNB ou uréia 1,34%, biotina 4×10^{-5} %; metanol 0,5%; 100 µg/mL de ampicilina) em frascos *erlenmeyer* de 500 mL a D.O.₆₀₀ = 1,0. A indução do promotor AOX1 foi realizada por adição de metanol absoluto a cada 24 horas às culturas celulares, mantendo uma concentração final de 0,5 % (v/v). A indução da expressão gênica foi realizada durante 120 horas a 30 °C sob agitação constante de 250 rpm.

Durante a indução foi realizada coleta das culturas nos intervalos de 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h de indução. As alíquotas das culturas foram centrifugadas a 12000 rpm por 3 minutos a 4 °C e os sobrenadantes imediatamente conservados a -80 °C para posteriores análises.

3.7. Análise do produto expresso em gel desnaturante SDS-PAGE

Os sobrenadantes das culturas coletadas durante o experimento do item 3.6 foram analisados em gel desnaturante SDS-PAGE, conforme modificações da metodologia descrita por Sambrook et al. (1989).

Alíquotas de aproximadamente 4 mL dos sobrenadantes coletados nos tempos de 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h de indução foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) a uma concentração final 10 %. Após a centrifugação em 12000 rpm a 4 °C, os *pellets* das proteínas precipitadas foram lavados com acetona 100 % gelada e em seguida ressuspensos em 100 µL de tampão de amostra 1X SDS-PAGE (200 mM Tris pH 6,8; 0,1 % azul de bromofenol (p/v); 4 % SDS (v/v); 4 % β-mercaptoetanol; 20 % glicerol (v/v)). Em seguida, as amostras foram fervidas a 100 °C em banho-maria por 5 minutos e prontamente incubadas em gelo até a aplicação no gel SDS-PAGE. As amostras foram aplicadas em um sistema de minigel com gradientes de poliacrilamida de 5 % concentrador e 15 % separador. A eletroforese foi realizada em tempo aproximado de 2-4 horas nas seguintes condições: tensão 200 volts, corrente 50 mA e potência 30W. O marcador molecular utilizado foi o

GH de humano isoforma de 20 kDa, gentilmente cedido pela empresa Cristália-Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA.

Após a corrida eletroforética, o gel com as proteínas separadas foi submerso por 30 minutos em solução fixadora (ácido acético 10 %, metanol 40 %) e em seguida corado com azul brilhante de *Coomassie* (0,1 % de *Coomassie* G-250 (p/v), ácido fosfórico 2 % (v/v), sulfato de amônio 10 % (p/v), metanol 20 % (v/v)) por incubação *overnight*. Após esse período, o gel foi submerso em água destilada para perder o excesso de corante para que sua imagem fosse então documentada por digitalização em *scanner* (LabScan 5.0, GE Healthcare).

A densidade da banda foi utilizada para estimar a concentração do rtGH utilizando o BSA como controle de concentração conhecida.

3.8. Análise *Western blotting*

Para confirmação do rtGH nos sobrenadantes das culturas de *P. pastoris* recombinantes induzidas por metanol foi realizado *Western blotting* utilizando um anticorpo primário que reage especificamente com a cauda de seis resíduos de histidina fusionada em C-terminal da proteína recombinante.

Após a corrida eletroforética em gel SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema de transferência semi-seco (Trans-Blot®SD, Semi-Dry Transf Cell, Bio-Rad) durante aproximadamente uma 1 h nas seguintes condições: 10 volts, 0,13 A, 1 W. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose com as proteínas imobilizadas foi tratada com o anticorpo primário na diluição de 1:2000. O anticorpo secundário e os demais reagentes utilizados foram componentes do *kit WesternBreeze® Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit* (Invitrogen), cujos procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante. Como controle negativo foi utilizado *P. pastoris* GS115/pPIC-αAMY. Após a revelação das amostras na membrana, a imagem foi documentada por digitalização em *scanner*.

3.9. Purificação por cromatografia de afinidade

A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em sistema Akta Purifier (GE Healthcare), utilizando-se a coluna comercial HisTrap HP 1mL (GE Healthcare), que possui um íon metal, no caso Níquel, ligado à resina, o qual tem afinidade por proteínas com calda de histidina.

Um volume de 35 mL do sobrenadante da cultura foi injetado na coluna cromatográfica HisTrap HP pré equilibrada com Tampão A (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10% Glicerol) fazendo com que a proteína que contém a calda de histidina interajam com a coluna de níquel. Após a ligação a coluna foi lavada com 2 mL de Tampão A para que as moléculas que não interagiram com a níquel pudessem ser removidas e se iniciasse processo de eluição. Para que a calda de histidina se dissocie da coluna de níquel, injeta-se imidazol, um composto que possui maior afinidade ao níquel que a histidina. A eluição foi feita em um gradiente linear de 0 a 50% de Tampão B (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10% Glicerol, 500 mM Imidazol), em um fluxo de 1 mL/min, coletando-se frações de 1 mL. Os picos do cromatograma foram analisados em SDS-PAGE a 15%.

4. Resultados e Discussão

4.1. Transformação da linhagem hospedeira

A linhagem de *P. pastoris* GS115 foi transformada com sucesso utilizando o plasmídeo recombinante pPIC-tGH (construído por Sadalla-Pinto, 2012), e utilizada nos experimentos de determinação do fenótipo, *blotting* de colônia, indução em meio líquido, análise em gel desnaturante SDS-PAGE, *western blotting* e purificação.

4.2. Determinação dos fenótipos Mut⁺ e Mut^s dos clones recombinantes

A diferença de crescimento dos clones no meio MM, contendo metanol como única fonte de carbono é a metodologia recomendada para determinação dos fenótipos Mut⁺ e Mut^s na levedura *P. pastoris* após transformação. Clones

Mut⁺ e Mut^s apresentam crescimento semelhante em meio MD que contem glicose, porém quando cultivados em meio MM que contem metanol, os clones Mut^s apresentam um crescimento lento se comparado com os clones Mut⁺, que possuem a capacidade de crescer tanto em meio MM quanto em meio MD, pela presença do gene AOX1. A diferença na velocidade de crescimento dos clones no meio MM revelou seus respectivos fenótipos, assim como foi observado por Carmo (2010). Foram realizados determinação fenotípica nas placas 1A, 1B (Figura 1 e 2), e das placas 1D e 1E.

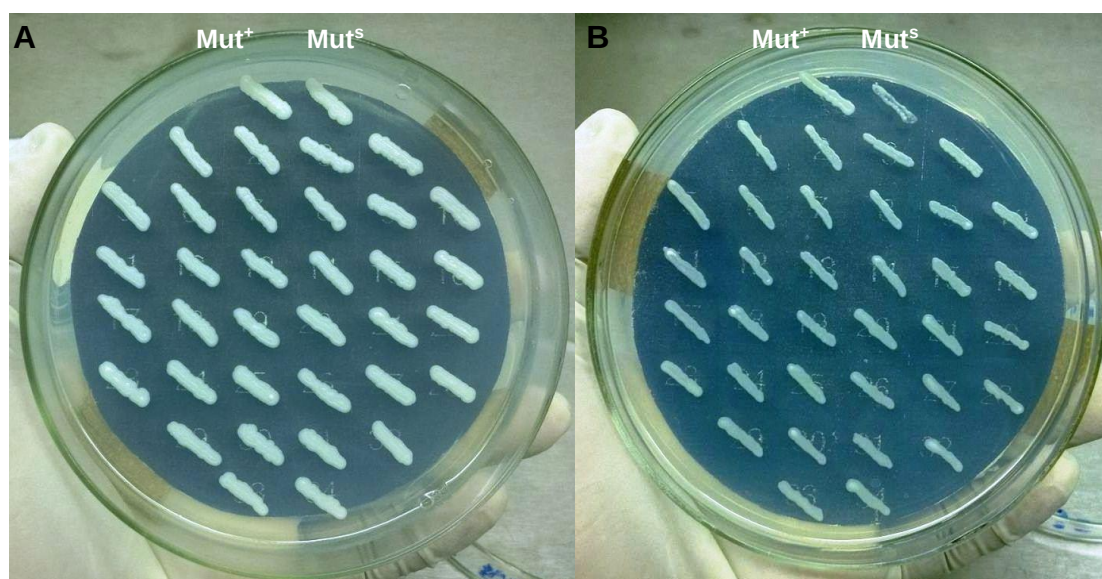


Figura 1: (A) Placa 1A de *P. pastoris* GS115 pPIC-tGH, em meio MD (*Minimal Dextrose Medium*). (B) Placa 1A de *P. pastoris* GS115 pPIC-tGH, em meio MM (*Minimal Methanol Medium*). Controle Mut⁺ e Mut^s *P. pastoris* GS115/pPIC- α AMY .

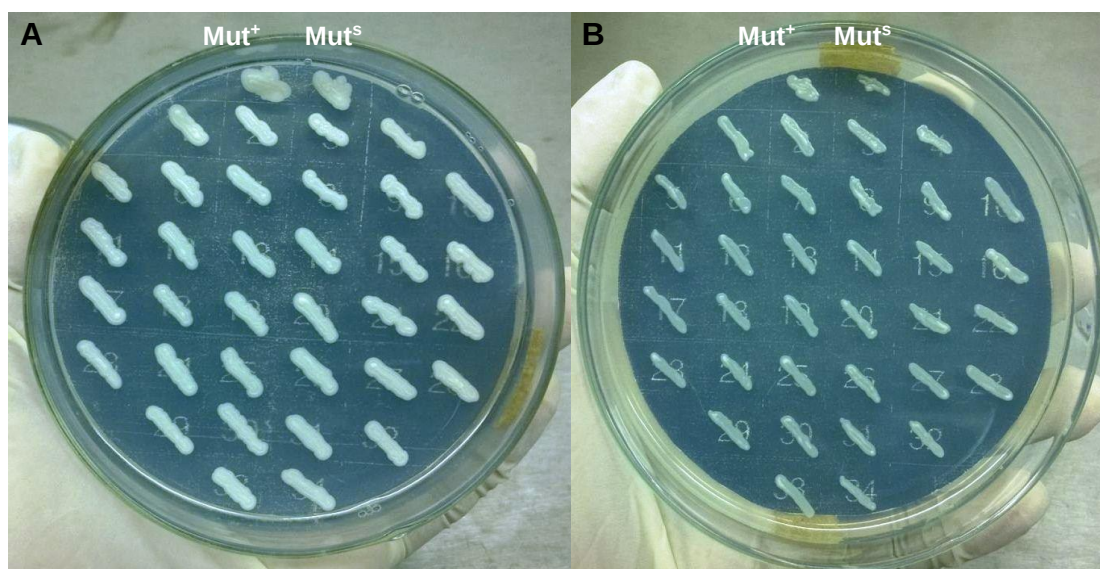


Figura 2: (A) Placa 1B de *P. pastoris* GS115 pPIC-tGH, em meio MD (*Minimal Dextrose Medium*). (B) Placa 1B de *P. pastoris* GS115 pPIC-tGH, em meio MM (*Minimal Methanol Medium*). Controle Mut⁺ e Mut^S *P. pastoris* GS115/pPIC- α AMY.

Na parte superior das placas estão identificados os controles Mut⁺ e Mut^S, a partir deles é possível verificar a diferença na velocidade de crescimento quando cultivados em meio MM. De acordo com as figuras apresentadas acima podemos concluir que todos os clones transformantes podem ser fenotipicamente considerados como Mut⁺.

4.3. *Blotting* de colônia

A intensidade e o tamanho das manchas em cada célula reflete aproximadamente o nível de secreção da proteína recombinante (rtGH), ou seja, as manchas mais intensas possivelmente são indicativos de clones com níveis de expressão mais elevados. Os clones que não apresentaram nenhuma mancha não expressaram o rtGH. A figura 3 abaixo mostra os resultados obtidos no *blotting* de colônias. Os clones que revelaram maior intensidade na mancha foram selecionados para os experimentos posteriores de indução do rtGH em frascos agitados.

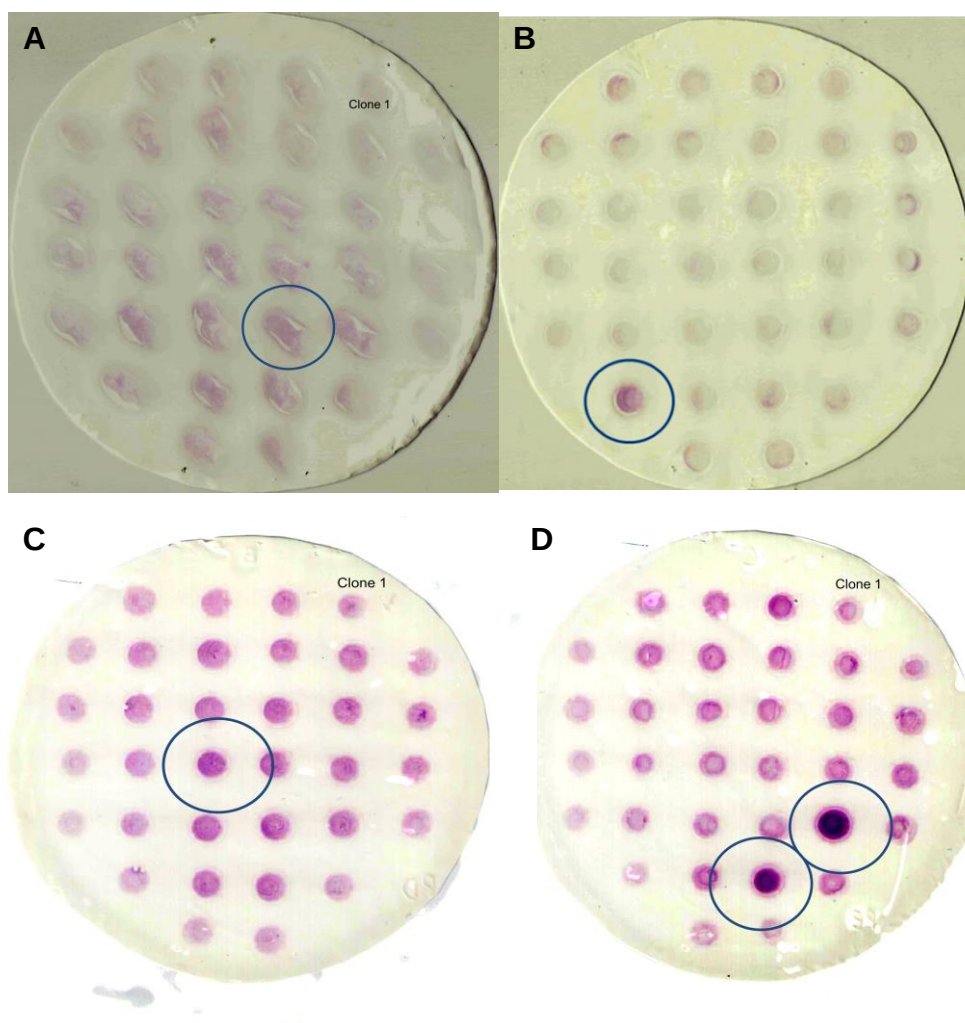


Figura 3: *Blotting* de Colônia, (A) placa 1A, (B) placa 1B, (C) placa 1D e (D) placa 1E de *P. pastoris* GS115 pPIC-tGH. (A) clone 20 da placa 1A, (B) clone 32 da placa 1B, (C) clone 20 da placa 1D e (D) clone 24 e 30 da placa 1E destacados por círculos foram selecionados para indução em frascos agitados.

4.4. Indução do hormônio de crescimento recombinante de *Pichia pastoris* em frascos agitados

As linhagens de *Pichia pastoris* recombinantes cresceram adequadamente durante todo o processo de indução em frascos agitados, sendo assim, o experimento foi realizado até 120 horas, alcançando o crescimento de massa celular adequado (Figura 4). Para se ter um resultado em g/L de massa celular, houve a realização de uma conversão de D.O em g/L, usando a fórmula $\text{g/L} = 0,22 \times \text{D.O.}$

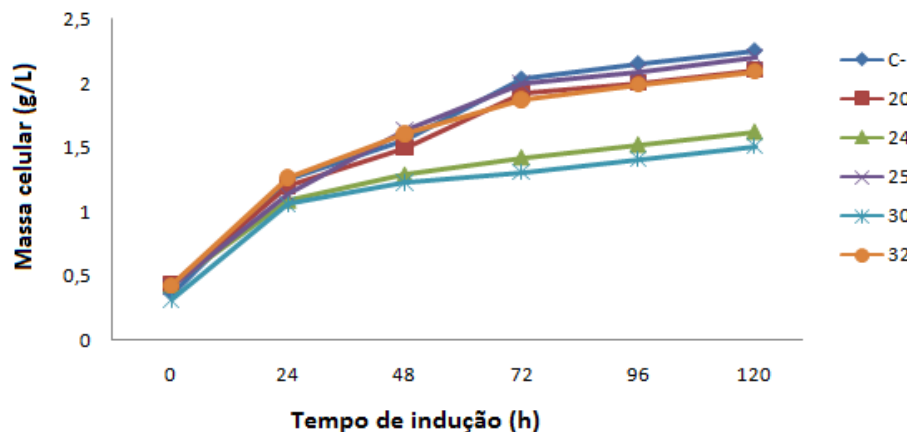


Figura 4: Gráfico da cinética do crescimento dos clones de *Pichia pastoris* GS115 recombinantes durante a indução com metanol. Clones 20, 24, 25, 30 e 32: GS115/pPIC-tGH/Mut⁺; C⁻: clone GS115/pPIC-αAMY (controle negativo).

Carmo (2010) e Sadalla-Pinto (2012) (Figura 5), obtiveram de suas linhagens GS115 de *Pichia pastoris* um aumento durante todo o tempo de indução, que corresponde a capacidade das células em metabolizar o metanol, esses resultados corroboram com os encontrados dos clones recombinantes. O aumento contínuo da massa celular durante todo o período de indução por metanol significa que a cultura não alcançou a fase estacionária nesse período (Sadalla-Pinto, 2012).

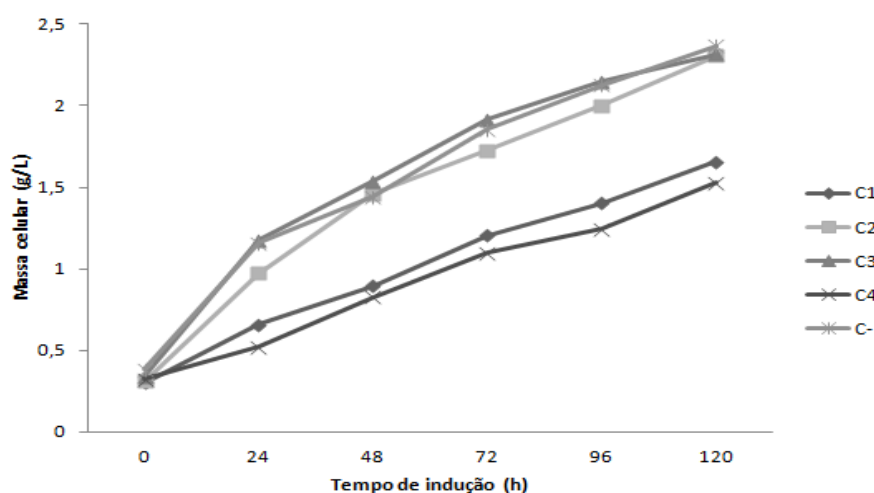


Figura 5: Gráfico da cinética do crescimento de clones de *Pichia pastoris* GS115 recombinantes durante a indução com metanol. C1 e C4: clones GS115/pPIC-tGH/Mut^s; C2 e C3: clones GS115/pPIC-tGH/Mut⁺; C⁻: clone GS115/pPIC9/Mut⁺ (controle negativo).

4.5. Análise do produto expresso em gel desnaturante SDS-PAGE do sobrenadante da cultura

Os clones selecionados na indução de frascos agitados foram submetidos à análise do gel desnaturante de poliacrilamida SDS-PAGE, para confirmação da expressão do rtGH. A partir disso, foi possível visualizar a banda correspondente a proteína tGH recombinante, de aproximadamente 22-23 KDa (Figura 06), assim como foi obtido por Sadalla-Pinto (2012) e Souza (2009), que expressaram o rtGH, obtendo o mesmo tamanho da proteína que foi encontrado neste trabalhos. Segundo Sadalla-Pinto (2012), a existência de dois sítios potenciais de glicosilação na sequência polipeptídica do tGH, faz com que a ocorrência de glicosilação afete a migração eletroforética das proteínas no gel SDS-PAGE, por isso deduz-se que a elevação da massa estimada do tGH recombinante de 21,5 kDa para ~ 23 kDa obtida nos experimentos realizados seja resultado da presença de glicosilação durante o processamento pós-traducional da proteína recombinante na via secretória (Sadalla-Pinto, 2012).

A partir dos dados mostrados na figura 06, pode-se notar que não houve a expressão da proteína recombinante no controle negativo, que corresponde a hospedeira GS115 transformada expressando a proteína α AMY, pela ausência da banda proteica na altura correspondente a aproximadamente ~ 23 KDa do rtGH. Da mesma forma todos os clones de Jia *et al.* (2014) são estirpes Mut⁺ de *P. pastoris* GS115/Ppi9K-rmaGH e expressaram o hormônio de crescimento recombinante de *Misgurnus anguillicaudatus* com a proteína extracelular de aproximadamente 24 KDa, com o tamanho padrão de maGH, e com a falta desta mesma proteína no controle negativo.

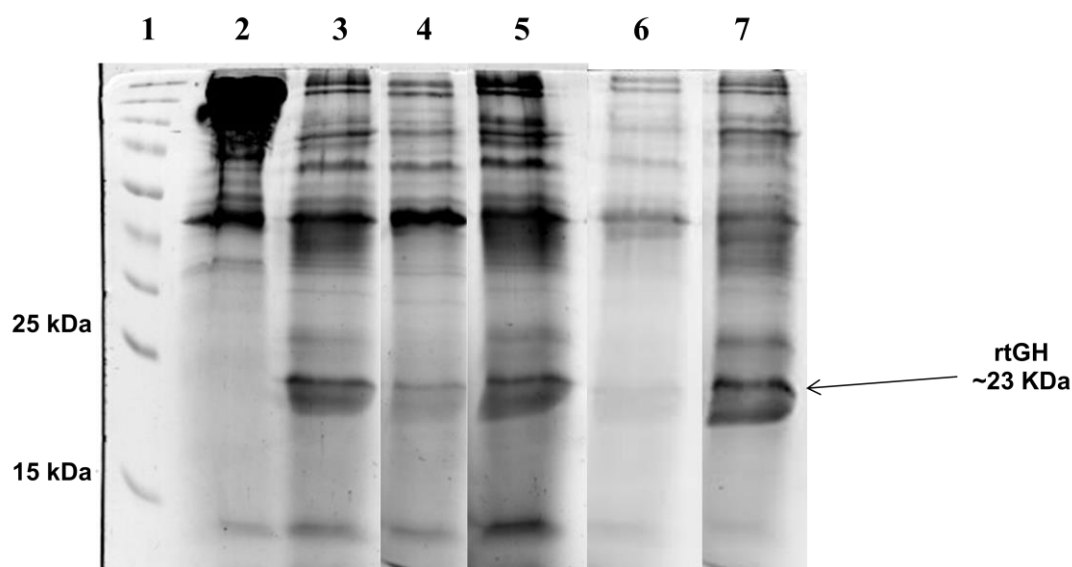


Figura 06: Perfil eletroforético de proteínas em gel SDS-PAGE 15 % da expressão do GH recombinante de tabaco nos clones 20, 24, 25, 30 e 32 (*Pichia pastoris* GS115/pPIC-tGH/Mut+). Poço 1: Marcador Thermo Scientific Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder; Poço 2: C⁻ (GS115/pPIC- α AMY, controle negativo); Poço 3: Clone 20; Poço 4: Clone 24; Poço 5: Clone 25; Poço 6: Clone 30 e Poço 7: Clone 32.

4.6. Análise *Western blotting* do sobrenadante da cultura

Para confirmação do rtGH nos sobrenadantes das culturas de *P. pastoris* induzidas por metanol foi realizado *Western blotting* utilizando um anticorpo primário que reage especificamente com a cauda de seis resíduos de histidina fusionada em C-terminal da proteína recombinante.

A análise em *Western blotting* confirmou a presença do tGH recombinante mostrando uma banda de proteína de peso molecular aproximado entre 15 e 25 KDa, indicando que os clones estão expressando a proteína desejada pela presença de bandas coradas e a ausência desta banda no controle negativo, assim como Acosta *et al.* (2009) conseguiu expressar o tiGH, visualizado no SDS-PAGE 15%, , confirmando a expressão por *western blotting*, com bandas entre 15 e 25 KDa.

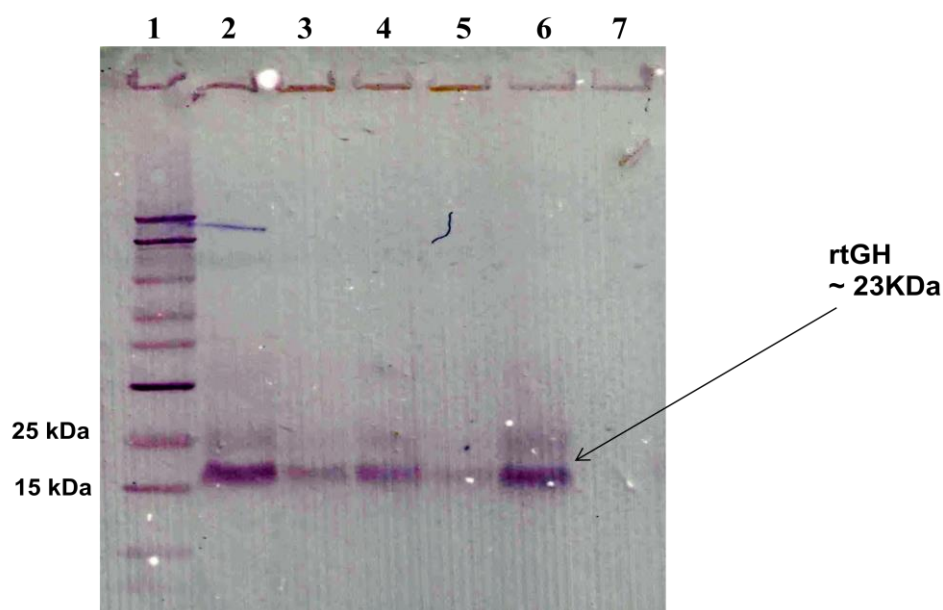


Figura 07: Análise por *Western blotting* da expressão do GH recombinante de tambaqui nos clones de *Pichia pastoris* Mut⁺. 1: marcador com cauda histidina (Invitrogen); 2-6: Clones 20, 24, 25, 30 e 32 GS115 antes da purificação; 7: controle negativo; 8 e 9: Clone 20 e 24 pós coluna de níquel; 10: controle negativo no tempo de 72 h de indução.

4.7. Purificação do hormônio de crescimento recombinante do tambaqui

Após a escolha dos clones pelo *blotting* de colônia, a indução e confirmação da expressão por *Pichia pastoris* em SDS-PAGE e *Western blotting*, foi realizado a purificação da proteína recombinante do sobrenadante da cultura dos clones 20, 24, 25, 30 e 32 por cromatografia de afinidade, com o auxílio da coluna de níquel (Figuras 8). O aumento da concentração de imidazol faz com que as proteínas de baixa afinidade sejam primeiro eluídas/desligadas da coluna e, posteriormente, as de alta afinidade, que é o caso do rtGH devido a presença da calda de histidina.

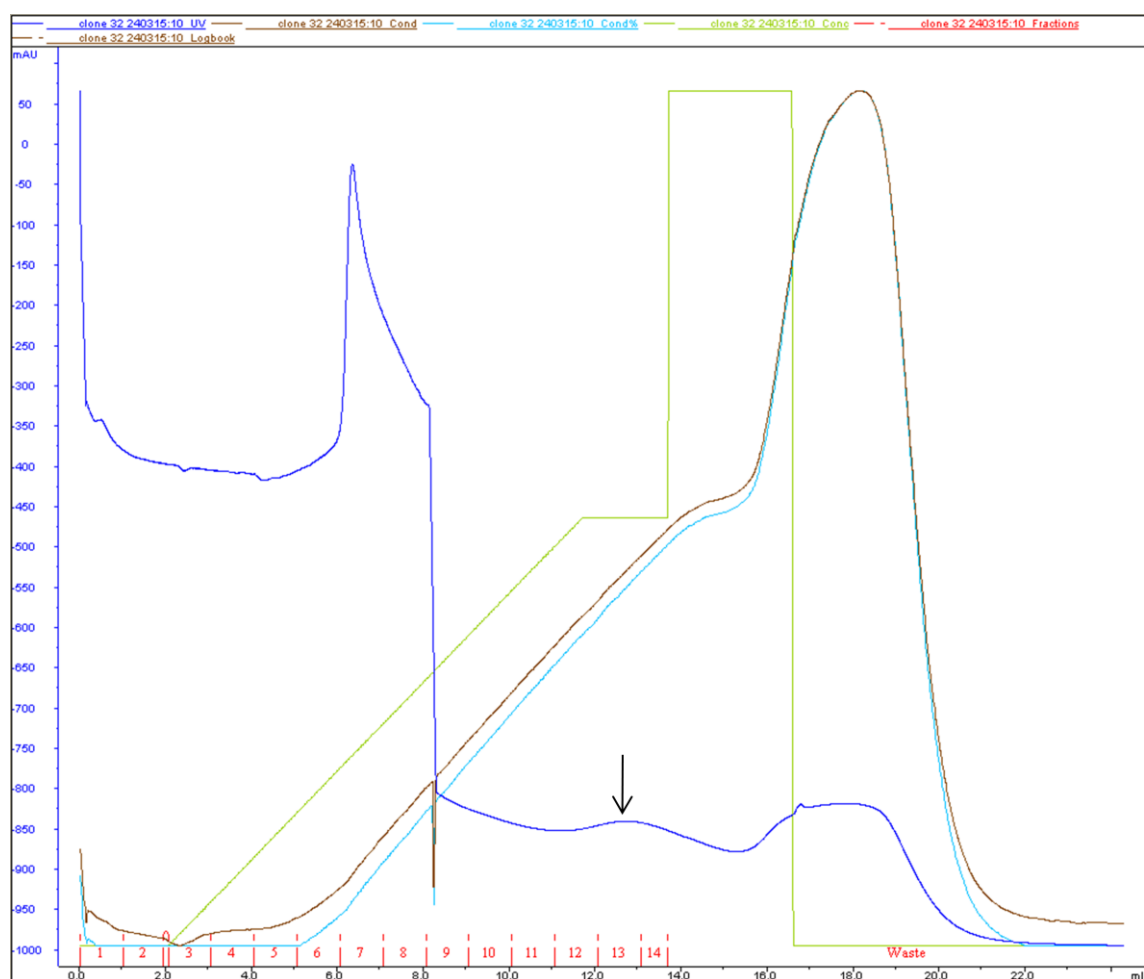


Figura 08: Gráfico do clone 32 no processo de purificação por cromatografia de afinidade. A seta indica a fração que corresponde ao pico de eluição do rtGH.

A escolha das frações foi baseada na ocorrência de picos, correspondente à linha azul marinho, mostrada nos gráficos, que estão listadas na tabela abaixo.

Tabela 2 – Clones purificados e suas respectivas frações selecionadas nos picos

Clones	Frações
(Placa 1D) 20	23, 24 e 25
(Placa 1E) 24	12, 13 e 14
(Placa 1A) 25	12, 13 e 14
(Placa 1E) 30	12, 13 e 14
(Placa 1B) 32	11, 12, 13 e 14

4.8. Análise do produto expresso em gel desnaturante SDS-PAGE dos clones purificados

Os sobrenadantes da indução dos clones 20, 24, 25, 30 e 32 foram submetidos à purificação por cromatografia de afinidade. Nas figuras 9 e 10 está mostrando o gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% das frações purificadas.

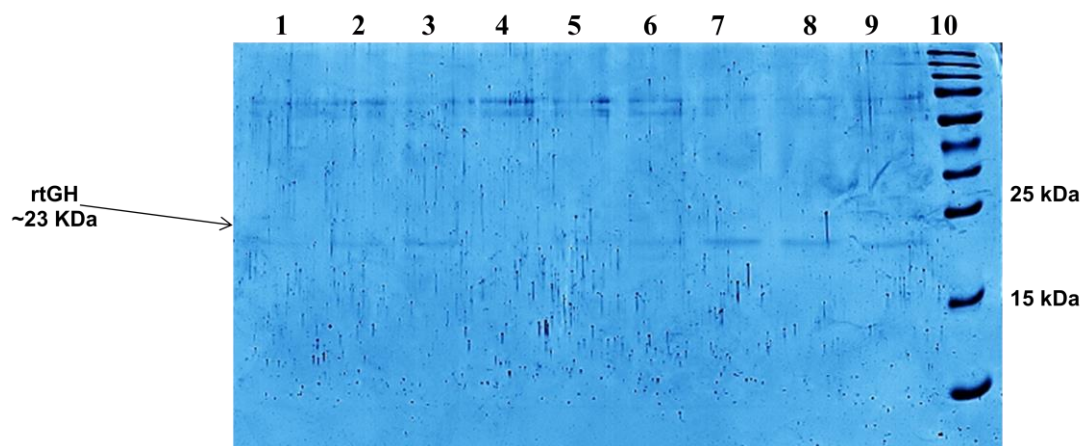


Figura 09: Perfil eletroforético das frações purificadas em gel SDS-PAGE 15 % da expressão do GH recombinante de tambaqui nos clones 20, 24 e 25 (*Pichia pastoris* GS115/pPIC-tGH/Mut+). Poços 1-3: Clone 25, frações 14, 13 e 12 respectivamente; Poços 4-6: Clone 24, frações 14, 13 e 12 respectivamente; Poços 7-9: Clone 20, frações 25, 24 e 23 respectivamente; Poço 10: Marcador Thermo Scientific Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder.

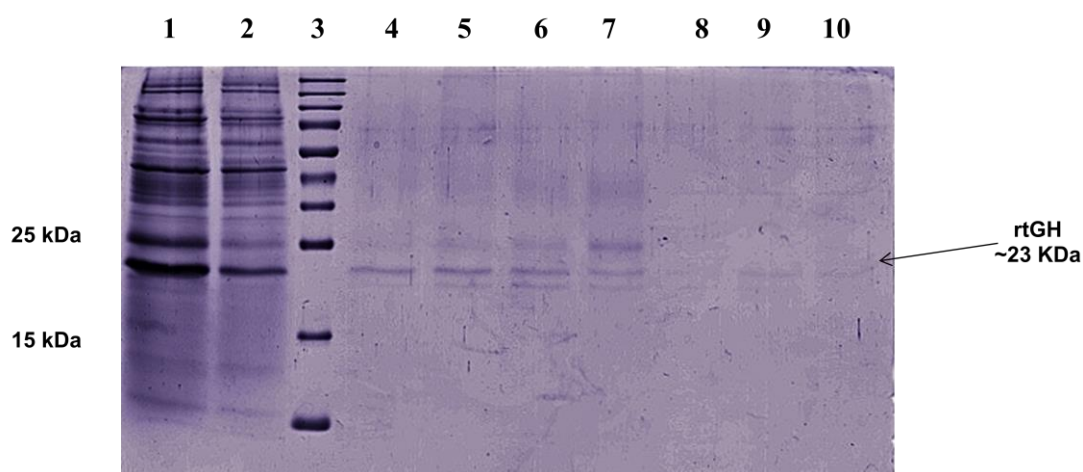


Figura 10: Perfil eletroforético das frações purificadas em gel SDS-PAGE 15 % da expressão do GH recombinante de tambaqui nos clones 30 e 32 (*Pichia pastoris* GS115/pPIC-tGH/Mut+). Poço 1: Clone 32 antes da purificação; Poço 2: Clone 20 antes da purificação; Poço 3: Marcador Thermo Scientific Spectra

Multicolor Broad Range Protein Ladder; Poço 4-7: Clone 32, frações 14, 13, 12 e 11 respectivamente; Poços 8-10: Clone 30, frações 14, 13 e 12 respectivamente.

Visto que os clones 20 e 32 mostraram maior e melhor expressão do tGH recombinante entre todos os outros clones que foi utilizado nos experimentos, realizou-se um gel SDS-PAGE apenas das frações destes dois clones, apresentado na figura abaixo.

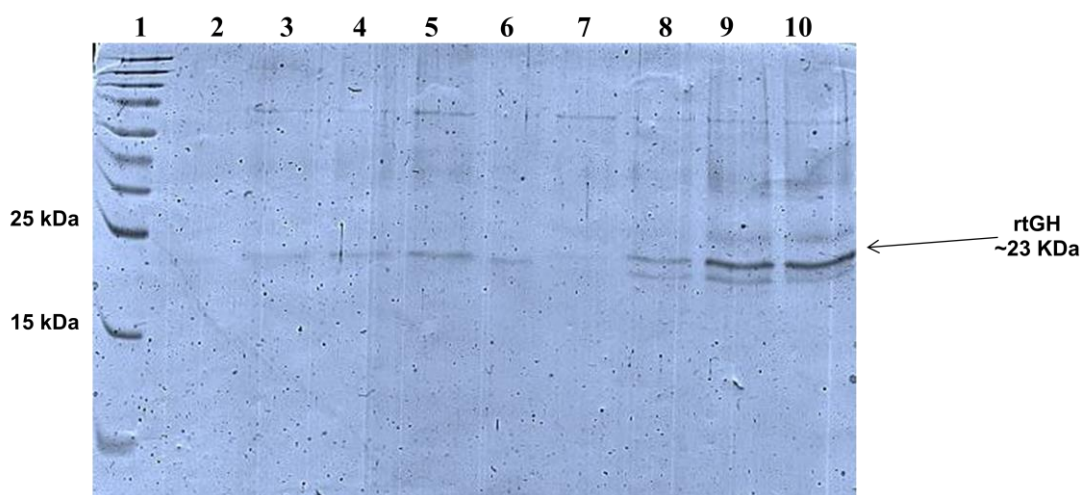


Figura 11: Perfil eletroforético das frações purificadas dos clones 20 e 32 em gel SDS-PAGE 15 % da expressão do GH recombinante de tambaqui (*Pichia pastoris* GS115/pPIC-tGH/Mut⁺). Poço 1: Marcador Thermo Scientific Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder Poço 2: Clone 20, fração 24 não precipitado; Poço 3-5: Clone 20, frações 23, 24 e 25 respectivamente; Poço 6: Clone 32, frações 13 não precipitado; Poços 7-10: Clone 32, frações 11, 12, 13 e 14 respectivamente.

4.9. Dot blotting das frações purificadas

Com a confirmação da expressão do tGH recombinante pelo gel de poliacrilamida SDS-PAGE e *western blotting*, executou um *dot blotting* das frações dos clones purificados utilizados nos experimentos anteriores. A partir dos resultados da Figura 12, mostra que os clones que obtiveram manchas mais intensas, foram os clones 20 e 32, das quatro frações e três frações utilizadas respectivamente, apresentaram níveis de expressam mais elevados

de rtGH, enquanto que os clones 24, 25 e 30 mostraram níveis de expressam mais baixos, conforme a intensidade das manchas.

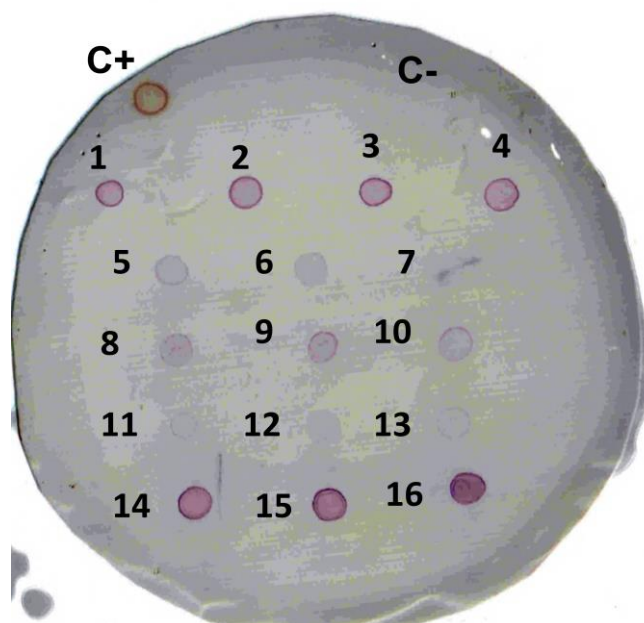


Figura 12: Dot Blotting das frações da purificação. C⁺: Controle positivo (*Pichia pastoris* GS115/pPIC-tGH); C⁻: Controle negativo (*Pichia pastoris* GS115/pPIC- α AMY); **1:** Clone 20, fração 24; **2:** Clone 20, fração 25; **3:** Clone 20, fração 26; **4:** Clone 20, fração 27; **5:** Clone 24, fração 12; **6:** Clone 24, fração 13; **7:** Clone 24, fração 14; **8:** Clone 25, fração 12; **9:** Clone 25, fração 13; **10:** Clone 25, fração 14; **11:** Clone 30, fração 12; **12:** Clone 30, fração 13; **13:** Clone 30, fração 14; **14:** Clone 32, fração 12; **15:** Clone 32, fração 13; **16:** Clone 32, fração 14.

5. Conclusão

Neste trabalho a linhagem GS115 de *P. pastoris* foi transformada com o cassete de expressão contendo o gene codificador do hormônio de crescimento de tambaqui. Realizou-se a determinação fenotípica, indicando que todos os clones são Mut⁺.

O hormônio de crescimento recombinante do tambaqui foi expresso com sucesso na levedura *Pichia pastoris* da linhagem GS115 e a presença da proteína recombinante foi confirmada no sobrenadante da cultura.

Mediante o exposto, o hormônio de crescimento recombinante do tambaqui foi purificado por cromatografia de afinidade, e as frações purificadas dos 5 clones foram analisados por SDS-PAGE além de ter sido feito um *Dot blotting* dos purificados, assim, os resultados obtidos nesta etapa confirmaram os resultados alcançados em experimentos anteriores, mostrando que os clones 20 e 32 são os melhores produtores se comparado com os outros clones que foram trabalhados, pela banda mais forte no gel e a intensidade da mancha no *Dot blotting*.

Portanto, o próximo passo é otimizar o bioprocesso de produção do hormônio de crescimento recombinante do tambaqui na levedura *P. pastoris*, da linhagem GS115, com o intuito principal de determinar os parâmetros ótimos de produtividade, visando obter um melhor e maior rendimento do rtGH, para futuramente ser empregado nas rações utilizadas na piscicultura, com o objetivo de que o pescado apresente crescimento acelerado aos demais que não se alimentam da ração, além de promover o crescimento, a utilização do GH atrás consigo outros benefícios como ajudar na imunidade e na reprodução.

6. Referências

- BJÖRNSSON, B. T.; JOHANSSON, V.; BENEDET, S.; EINARSDOTTIR, I. E.; HILDAHL, J.; AGUSTSSON, T.; JÖNSSON, E. 2002. **Growth hormone endocrinology of salmonids: regulatory mechanisms and mode of action.** *Fish Physiology and Biochemistry* **27**: p. 227–242.
- CARMO, E. J. 2010. **Clonagem e expressão regulada do cDNA da glicoamilase de *Aspergillus awamori* em *Pichia pastoris*.** Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.
- CEREGHINO, J.L.; CREGG, J.M. 2000. **Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*.** FEMS Microbiology Reviews, 24: 45-66p.
- CINTRA, L. C. 2010. **Clonagem e expressão do gene da tiorredoxina 1 de *Paracoccidioides brasiliensis* em *Pichia pastoris*.** Universidade Federal de Goiás - Goiânia.
- CREGG, J.M.; TOLSTORUKOV, I.; KUSARI, A.; SUNGA, J.; MADDEN, K.; CHAPPELL, T. 2009. **Expression in the yeast *Pichia pastoris*.** Methods in Enzymology, Vol. 463, 169-188p.
- EMBRAPA. Moraes, R. R. *et al.* 2012a. **Anais da IX Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental/** (editado por) Regina Caetano Quisen *et al.* - Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental.
- EMBRAPA. Iwashita, M. K. P; Moro, G. V.; Nakandakare, I. B. 2014b. **Incorporação de aditivos na ração de peixes.** Palmas – Tocantins.
- FERNANDES, F. R. R. 2005. **Piscicultura: sustentabilidade e preservação das Espécies tambaqui (*colossoma macropomum*) e Matrinxã (*brycon cephalus*).** Anais do X Encontro de Geógrafos da América Latina – Universidade de São Paulo.
- FRANÇA, R. C. 2011. **Avaliação do Potencial Probiótico da Levedura *Pichia pastoris*.** Universidade Federal de Pelotas- Pelotas.
- IBAMA. 2009. **Começa amanhã o defeso do Tambaqui.** Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/>>. Acesso em: 22 de Dez. 2014.
- INVITROGEN. 2010. **For Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*.**
- ACOSTA, J.; ESTRADA, M. P.; CARPIO, Y.; RUIZ, O.; MORALES, R.; MARTÍNEZ, E.; VALDÉS, J.; BORROTO, C.; BESADA, V.; SÁNCHEZ, A.; HERRERA, F. 2009. **Tilapia somatotropin polypeptides: potent enhancers of fish growth and innate immunity.** Biotechnología Aplicada, Vol.26, nº.3.

JIA, Y.; JI, X.; WANG, Q.; WANG, L.; LI, N.; DU, Q.; CHANG, Z. 2014. ***anguillicaudatus* em *Pichia pastoris* promove o crescimento de Larvas de *M. Anguillicaudatus***. Pakistan J. Zool., vol. 46(4), p. 975-981.

KUBITZA, F. 2004b. **IMNV: o vírus que ameaça a carcinicultura brasileira**. Panorama da Aquicultura, Vol. 14, nº 83, maio/junho.

KUBITZA, F. 2004a. **Tambaqui, pacu e híbridos**. Panorama da Aquicultura, Vol. 14, nº 82, março/abril.

SADALLA-PINTO, E. A. 2012. **Clonagem e expressão do cDNA codificador do Hormônio de crescimento de tambaqui (*colossoma Macropomum*) na levedura *Pichia pastoris***. Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus.

SEBRAE. 2001. **Criação Comercial de Peixes em Viveiros ou Açudes**, Disponível em: <<http://www.dce.sebrae.com.br/>>. Acesso em: 20 dez. 2014.

SOUZA, A. R. B. 2009. **Análise do transcrito de etiquetas de sequências expressas da hipófise e parte do cérebro do tambaqui (*Colossoma macropomum*) e expressão do cDNA do hormônio de crescimento em *Pichia pastoris***. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA, set.

SUFRAMA. 2003. **Potencialidades regionais estudo de viabilidade econômica: piscicultura**.

WALLIS, M. 1992. **The expanding growth hormone/prolactin family**. *J. Mol. Endo.*, 9:185-188.

YOUSEFIAN, M.; SHIRZAD, E. 2011. **The review of the effect of growth hormone on immune system, metabolism and osmoregulation of fish**. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 5(5):467-475.

7. Cronograma

Meta/Atividades	Período											
	2014					2015						
	Agos.	Set.	Out.	Nov.	Dez.	Jan.	Fev.	Mar.	Abril	Maió	Jun.	Jul.
Revisão/Pesquisa bibliográfica	R	R	R	R	R	R	AR	AR	AR	AR	AR	AR
Transformação da levedura com o vetor pPIC-tGH		R										
Indução em meio sólido dos clones de P. pastoris recombinantes produtores de rtGH				R	R							
Indução em meio líquido em sistema de frascos agitados dos clones de P. pastoris recombinantes produtores de rtGH			R	R	R							
Análise do produto expresso em gel SDS-PAGE					R							
Análise do produto expresso por Western Blotting									R	R		
Elaboração do Resumo e Relatório Final										R	R	
Preparo da Apresentação Final para Congresso												R

LEGENDA: **R** = Atividade Realizada; **AR** = Atividade a Realizar.