

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

Produção de proteínas heterólogas em microalga

João Vitor Dutra Molino

Tese para obtenção do Título de Doutor
Orientador: Prof. Dr. João Carlos Monteiro de
Carvalho

São Paulo

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

Produção de proteínas heterólogas em microalga

João Vitor Dutra Molino

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências
Farmacêuticas

Área de concentração: Tecnologia de
Fermentações

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Monteiro de
Carvalho

São Paulo
2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

M723p Molino, João Vitor Dutra
Produção de proteínas heterólogas em microalga / João Vitor
Dutra Molino. -- São Paulo, 2017.
131p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-
Farmacêutica.

Orientador: Carvalho, João Carlos Monteiro de

1. Microbiologia aplicada 2. Biotecnologia farmacêutica 3. Biologia
molecular I. T. II. Carvalho, João Carlos Monteiro de, orientador.

660.6 CDD

MOLINO, JVD. **Produção de proteínas heterólogas em microalga.** Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de Doutor

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho
Orientador/presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2017

DEDICATORIA

À minha família, por cada palavra, gesto e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho, pela atenção e apoio durante o projeto e orientação.

Aos meus pais, João Anselmo e Lucília, por me apontarem o caminho e sempre apoiarem meus sonhos, mesmo quando eles me levam para longe.

Ao meu irmão, Luiz Henrique, pela sua capacidade infindável de compreensão e sensibilidade que mesmo longe sempre está pronto para ajudar com palavras. E a minha irmã agregada, Fernanda, que meu irmão encontrou e sempre é alegre.

À minha nova irmã, Renata, que em pouco tempo já está em nossos corações.

À meu primo-irmão, Camilo, pelos exemplos de dedicação e humor.

Aos meus sogros, Cláudio e Luzia, pela hospitalidade e compreensão durante esses anos.

À minha cunhada e em breve cunhado, Carine e Lucas, pela amizade e companheirismo.

Ao prof. Stephen Mayfield, por me dar a oportunidade de trabalhar em seu laboratório e mostrar o espírito de um pesquisador.

Aos meus colegas na UCSD, pelas conversas durante o almoço, as conversas de laboratório e companheirismo.

Aos meus amigos, Livia e Victor, pela amizade e apoio durante e após nosso tempo em San Diego.

Aos meus amigos, Fernanda, Rodrigo, Thiago, Vanessa, Bruno e Luciana, que San Diego reuniu, pelas risadas e conversas.

Ao time do iGEM AlgAranha pela dedicação e exemplo de comprometimento.

Ao grupo de Hardware Livre USP, em especial ao Bruno, pelo apoio a ideias.

Aos técnicos administrativos, Wendy, Bryan, Bryan, Jennifer, pelo apoio e dedicação que facilitou minha estadia em San Diego.

Aos funcionários da FCF-USP, pelo apoio durante esses anos de pesquisa.

Aos meus amigos da USP, em especial André, Valter, Ignácio, Camila, Marcelo e Alex pelos cafés e conversas.

Ao Zé ruela de quatro patas, Lego, pela energia alegre e companheira.

Às bilhões de células de microalga que foram utilizadas nesse estudo.

À comunidade maker, pela inspiração proveniente de seu movimento.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro.

À todos que mesmo por uma fração de segundo compartilharam suas vidas comigo e influenciaram o meu dia-a-dia.

E por último, a minha esposa, Caroline, cujo amor e dedicação são irretribuíveis, por sua fibra e lindo coração que sempre me apoiou. É fácil ser feliz com você, não importando o tempo e lugar.

Epígrafe

Look down, and see the beggars at your feet
Look down and show some mercy if you can
Look down and see
The sweepings of the streets
Look down, look down,
Upon your fellow man!

Les misérables (1)

RESUMO

MOLINO, JVD. **Produção de proteínas heterólogas em microalga**. 2017. 131 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O objetivo desta tese foi explorar o sistema de produção de proteínas heterólogas em microalga com ênfase em *Chlamydomonas reinhardtii* por meio de: (1) desenvolvimento de um fotobiorreator tubular fechado de escala laboratorial, utilizando técnicas de manufatura digital; (2) avaliação de 7 diferentes proteínas fluorescentes (mTagBFP, Cerulean, Emerald, crGFP, cOFP, tdTomato e mCherry), como sistema reporter de secreção de proteínas em microalga; (3) avaliação do fotobiorreator desenvolvido utilizando cultivo de cepas recombinantes; (4) desenvolvimento de novos peptídeos sinais para secreção de proteínas em *C. reinhardtii*; (5) avaliação da produção de um biofármaco (hialuronidase) em microalgas, por meio da expressão de duas isoenzimas codificadas pelos genes HYA1 e SPAM1 em *C. reinhardtii*. O fotobiorreator tubular foi avaliado quanto a sua capacidade de resistir ao processo de esterilização por autoclavação e seu desempenho por meio do cultivo de cepa recombinante secretando mCherry. A fluorescência das proteínas fluorescentes foi medida por leitor de placas de fluorescência e visualizada intracelularmente por microscopia confocal de fluorescência. A atividade de hialuronidase foi determinada através de um ensaio enzimático turbidimétrico. O desenvolvimento do fotobiorreator resultou em um sistema fechado resistente a autoclavação, com capacidade de cultivo de cepas recombinantes de *C. reinhardtii*. Esse fotobiorreator proporcionou uma produtividade máxima de 10 mg/L.d de mCherry da cepa recombinante em sistema fechado, com velocidade específica de crescimento máxima de 1,27 d⁻¹ para a cepa recombinante testada. Todas as proteínas fluorescentes avaliadas apresentaram capacidade de secreção por *C. reinhardtii*, com diferentes níveis de interferências em sua medição, permitindo a escolha da mCherry como proteína reporter. Entre os peptídeos sinais avaliados (quatro descritos na literatura – BiP, ARS1, CAH1 e IBP1 - e seis preditos), o peptídeo predito “SP5” foi o que apresentou maior capacidade de secreção, determinado por níveis de fluorescência no sobrenadante. A avaliação dos peptídeos sinais constatou a necessidade de explorar o desenvolvimento de sistemas de expressão (e.g. vetores de expressão) aliados a análises computacionais, como o SignalP 4.0. Por último, os dados desse estudo mostram que *C. reinhardtii* transformadas com o vetor de expressão foi capaz de produzir as duas isoformas de hialuronidase em sua forma ativa, evidenciando a capacidade desse sistema para a produção de biofármacos. Portanto, nesta tese o sistema de expressão de proteínas heterólogas baseado em

microalgas foi explorado, atingindo os objetivos propostos. O fotobiorreator desenvolvido tem a capacidade de esterilização em escala laboratorial (1) e em cultivo com cepa recombinante propiciou elevada produtividade (3). As proteínas vermelhas fluorescentes apresentaram-se como as proteínas com menores interferências para estudos de secreção em *C. reinhardtii* (2). Além disso, o peptídeo predito SP5 apresentou o melhor desempenho na secreção de proteínas (4) e o vetor de expressão empregado permitiu a identificação de cepas produtoras de biofármaco hialuronidase (5). Portanto, o sistema de produção de proteínas heterólogas por microalgas é um sistema promissor e poderá permitir, utilizando sistemas de secreção, obter proteínas de alto valor comercial a baixos custos, empregando a secreção e técnicas de cultivo como a fermentação extrativa.

Palavras-chave: Bioprocesso. Microalga. *Chlamydomonas reinhardtii*. Fotobiorreator. Biofármaco.

ABSTRACT

MOLINO, JVD. **Production of heterologous protein in microalga**. 2017. 131 p. Doctoral thesis– School of Pharmaceutical Science, University of São Paulo, São Paulo, 2017.

In this thesis, the heterologous protein production in microalgae with emphasis on *Chlamydomonas reinhardtii* was explored through: (1) development of a laboratory scale closed tubular photobioreactor using digital manufacturing techniques; (2) evaluation of different fluorescent proteins (mTagBFP, Cerulean, Emerald, crGFP, cOFP, tdTomato and mCherry) as a reporter system for protein secretion in microalgae (3) evaluation of photobioreactor developed using recombinant strains culture; (4) development of new signals peptides for protein secretion in *C. reinhardtii* (5) expression evaluation of a biopharmaceutical (Hyaluronidase) in microalgae, through the expression of two isoenzymes encoded by the HYA1 and SPAM1 genes in *C. reinhardtii*. The tubular photobioreactor was evaluated for its ability to resist sterilization process by autoclaving and its performance by culturing recombinant strain secreting mCherry. Fluorescence of fluorescent proteins was measured by fluorescence plate reader and observed intracellularly by confocal fluorescence microscopy. The hyaluronidase activity was determined by a turbidimetric enzymatic assay. The development of the photobioreactor resulted in a closed system resistant to autoclaving, capable of culturing recombinant strains of *C. reinhardtii*. This recombinant strain achieved a maximum productivity of 10 mg/L.day of mcherry in the closed system, with a maximum growth rate of 1.27 d⁻¹ for the recombinant strain tested. All the fluorescent proteins evaluated had *C. reinhardtii* secretion capacity, with different interference levels in their measurement, allowing the selection of mCherry as a reporter protein. Among the evaluated peptides (four described in the literature - BiP, ARS1, CAH1 and IBP1 - and six predicted), the predicted peptide "SP5" was the one that presented greater capacity of secretion, determined by levels of fluorescence in the supernatant. The results of this study point out the need to explore the development of biological systems (i.e., expression vectors) allied to computational analysis. Finally, the data from this study showed that *C. reinhardtii* could produce the two isoforms of hyaluronidase in its active form, evidencing the capacity of this system to produce biopharmaceuticals. Therefore, in this thesis the heterologous protein expression system based on microalgae was explored, reaching the proposed objectives. The developed photobioreactor has sterilization capability in laboratorial scale (1) and in culture with recombinant strain had high productivity (3). The red fluorescent proteins was found as the most suitable proteins for studies of secretion in *C. reinhardtii* with lower interference levels(2). In addition, the predicted SP5 peptide

showed the best performance in protein secretion (4) and the expression vector employed allowed the identification of strains producing biopharmaceutical hyaluronidase (5). Therefore, the system of heterologous proteins production by microalgae is promising and will allow, using secretion systems, to obtain proteins of high commercial value at low costs, using secretion and cultivation techniques such as extractive fermentation.

Keywords: Bioprocess, microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii*, photobioreactor, biopharmaceutical.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

- Figura 3-1: Análise de fluorescência e western blot do lisado celular da célula selvagem e transformadas. 62
- Figura 3-2: Análise de fluorescência e western blot do sobrenadante celular da cepa selvagem e transformantes. 64

ESQUEMAS

- Esquema 1-1: Diagrama de relação entre o escopo do projeto e bioprocessos. O objetivo do estudo é realizar modificações no núcleo de *Chlamydomonas reinhardtii* e avaliar seu desempenho como célula produtora de proteínas heterólogas. 23
- Esquema 2-1: Vetores de expressão para proteínas fluorescentes. 35
- Esquema 2-2: Diferentes versões do peptídeo sinal de ARS1 gerados pelos plasmídeos pJP22 e pJP23 após tradução e clivagem do peptídeo 2A. 36
- Esquema 2-3: Fluxo do experimento de avaliação de fluorescência. 38
- Esquema 3-1: Vetores de expressão com e sem peptídeo sinal. 53
- Esquema 3-2: Fluxo do experimento de avaliação de fluorescência. Colônias resistentes a zeocina foram cultivadas em microplacas sobre iluminação contínua. 55
- Esquema 4-1: Esquema dos vetores de expressão para hialuronidase, pAH04, pJP22 e pJP30. 75
- Esquema 4-2: Cadeias de aminoácidos de HYAL1. 76
- Esquema 4-3: Cadeias de aminoácidos de PH20. 76

FLUXOGRAMA

- Fluxograma 2-1: Processo de decisão da escolha de proteína fluorescente. 41

FOTOGRAFIAS

- Fotografia 2-1: Microscopia de fluorescência *C. reinhardtii* expressando mCherry. 48

Fotografia 2-2: Microscopia de fluorescência em células vivas de cepas expressando proteínas fluorescentes.	49
Fotografia 3-1: SDS-PAGE de amostras de lisado com o mesmo conteúdo proteico por poço de cepas expressando mCherry em diferentes construções	65
Fotografia 3-2: SDS-PAGE de amostras de sobrenadante concentradas 30X de cepas expressando mCherry em diferentes construções	66
Fotografia 4-1: Western blot do lisado de construções de PH20.	86
Fotografia 4-2: Western blot do lisado de construções de HYAL1.	87
Fotografia 5-1: Fotobiorreator v1 3,5L. Tubos de vidro borossilicato e silicone apoiados em estrutura de polipropileno e barras roscadas de aço inoxidável.	101
Fotografia 5-2: Fotobiorreator v2 3,5L. A – Projeto em CAD do fotobiorreator v2. B – Protótipo do fotobiorreator v2 sendo testado em cultivo com <i>Spirulina platensis</i> .	102
Fotografia 5-3: Fotobiorreator v3 3,5L. A – fotobiorreator v3 em posição de cultivo, com cultivo de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , cepa selvagem CC1690 a $1,75 \times 10^5$ células por mL. B – fotobiorreator v3 após 5 dias de cultivo com densidade celular de 2×10^7 células por mL.	103
Fotografia 5-4: Selo de silicone. A – Foto aproximada do selo de silicone, com cavidades para tubos e sondas. B – Selo em posição de trabalho no fotobiorreator v3 3,5L.	104
Fotografia 5-5: Fotobiorreator v3 3,5L dentro da autoclave, em posição desmontado.	104
Fotografia 5-6: Fotobiorreator v4 3,5L. Estrutura de polipropileno e barras metálicas.	105
Fotografia 5-7: Amostrador fabricado com silicone e tubo “T” de polipropileno. Fixação do silicone feita com fio de nylon.	106
Fotografia 5-8: Sistema de fixação do frasco do fotobiorreator v4 3,5L.	106
Fotografia 5-9: Protótipo de painel de LED v1. Painel facilmente removível, permitindo remoção da estrutura para limpeza e esterilização dos tubos.	107
Fotografia 5-10: Protótipo de painel de LED v2 com regulador de intensidade de luz	108
Fotografia 5-11: Projeto e protótipo de painel de LED v3. A – Projeto do painel de LED em arquivo CAD. B - Protótipo de painel de LED v3 usando chapas de acrílico transparente (~3mm) cortadas a laser.	109
Fotografia 5-12: Análise do software de contagem de células. Contornos vermelhos indicam as células identificadas pelo programa. Gráfico na porção direita demonstra a contagem realizada pelo tempo.	110
Fotografia 5-13: OpenCyclop - Contador de células.	111
Fotografia 2-14: Estante de microtubos de acrílico	127

Fotografia 2-15: Sistema de miniprep a vácuo e forma para preparo de gel de agarose.	128
Fotografia 2-16: Cuba de eletroforese de agarose.	128
Fotografia 2-17: Eletroforese de gel de agarose teste da cuba.	129
Fotografia 2-18: Microcentrífuga em estrutura de MDF 6mm e projeto em autoCAD.	130
Fotografia 2-19: Protótipo de fotodocumentador de géis de agarose.	131

GRÁFICOS

Gráfico 2-1: Porcentagem de colônias positivas com cada uma das três versões dos plasmídeos.	42
Gráfico 2-2: Fluorescência média relativa ao controle positivo para cada proteína fluorescente.	43
Gráfico 2-3: Porcentagem de fluorescência no sobrenadante comparado com o total do cultivo.	44
Gráfico 2-4: Espectro de absorvância de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , cepa selvagem CC1690 com faixas representando a região entre o comprimento de excitação e emissão de cada proteína fluorescente.	45
Gráfico 3-1: Média de fluorescência de mCherry para cada construção no cultivo e no sobrenadante.	59
Gráfico 3-2: Porcentagem média de fluorescência de mCherry no sobrenadante das colônias positivas para diferentes construções com e sem peptídeo sinal.	61
Gráfico 3-3: Análise de densitometria de mCherry feita a partir de SDS-PAGE em amostras do sobrenadante concentradas 30X.	67
Gráfico 3-4: Porcentagem de densidade de pixels da banda de mCherry comparada com o total presente na amostra.	68
Gráfico 3-5: Curva de crescimento de cepa parental selvagem CC1690 em FBR v4, em meio TAP.	69
Gráfico 3-6: Curva de crescimento de cepa com construção pJP22mCherry em FBR v4, em meio TAP.	70
Gráfico 3-7: Produção de mCherry em FBR v4 medido por fluorescência de mCherry no sobrenadante do cultivo.	70
Gráfico 4-1: Ensaio de bioatividade de sobrenadante para construções com HYAL1.	82
Gráfico 4-2: Ensaio de bioatividade no sobrenadante para construções com PH20.	82
Gráfico 4-3: Ensaio de bioatividade do lisado para construções com HYAL1.	83

Gráfico 4-4: Estimativa da atividade de hialuronidase no sobrenadante em diferentes valores de concentração da amostra	84
Gráfico 4-5: Ensaio de bioatividade no lisado para construções com PH20.	86
Gráfico 4-6: Fluorescência de clorofila do material lisado por sonicação com diferentes tensoativos	88
Gráfico 4-7: Ensaio de bioatividade de lisado de cepas positivas para construções com PH20 do segundo screening.	89
Gráfico 5-1: Análise da tendência do custo de produção por unidade utilizando moldagem por injeção e manufatura digital aditiva. Comparação entre dois sistemas de manufatura.	93
Gráfico 5-2: Representação gráfica do custo por peça com o aumento da complexidade ou customização necessária na fabricação. Comparação entre manufatura tradicional e a manufatura aditiva.	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-1: Comparação das características de sistemas de expressão de proteínas heterólogas.	28
Tabela 2-1: Sumário das condições de leitura de fluorescência de cada proteína fluorescente.	38
Tabela 3-1: Lista de peptídeos sinais usados em experimentos de secreção.	58
Tabela 4-1: Lista de construções com hialuronidase.	77
Tabela 4-2: Número de colônias positivas no screening por cepas produtoras de hialuronidase.	80
Tabela 5-1: Comparação das características entre os fotobiorreatores fechados e abertos.	95
Tabela 5-2: Lista de open hardwares para laboratórios de biologia.	97
Tabela 5-3: Comparação entre as diferentes versões dos fotobiorreatores construídos.	100
Tabela 5-4: Comparação das características entre 3 versões de painéis de LED desenvolvidos.	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABS - Acrilonitrila butadieno estireno
- ANVISA - Agência nacional de vigilância sanitária
- ARS1 - Arilsulfatase 1
- BCIP - 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
- BFP - *Blue fluorescent protein* – Proteína fluorescente azul
- BiP - *Binding protein*
- CAD – *Computer assisted design* - Desenho assistido por computador
- CAH1 - *Carbonic Anhydrase 1* – Anidrase Carbônica
- CHO - *Chinese hamster ovary cells* – Células de ovário de hamster chinês
- CID - Contraste de interferência diferencial
- CNC - Controle numérico computadorizado
- EPOs - Eritropoietinas
- FDA - *Food and Drug Administration*
- GFP - *Green fluorescent protein* – Proteína fluorescente verde
- GNU - *GNU is not a Unix* – (O Unix é um sistema operacional de multitarefa preemptiva)
- GPI – *Glycosylphosphatidylinositol* – Glicosilfosfatidilinositol
- GRAS - *Generally regarded as safe*
- IBP - *Ice Binding protein* – Proteína que liga ao gelo.
- iGEM - *International genetic engineering machine*
- ISM - *in situ microscopy* – Microscopia *in situ*
- LED - *Light emitting diode* – Diodo emissor de luz
- MA - Manufatura aditiva
- MCS - *Multiple cloning site* – Sítio de clonagem múltiplo
- MDF - *Medium density fibreboard* - Placa de fibra de madeira de média densidade
- MI - Moldagem por injeção
- NBT - Nitro azul tetrazólio
- NIH - *National Institute of Health*
- OFP - *Orange fluorescent protein* – Proteína fluorescente laranja
- OGM - Organismo geneticamente modificado
- PAGE - *Poliacrylamid gel electrophoresis* – Eletroforese de gel de poliacrilamida
- PAR - *Photosynthetically active radiation* – Radiação fotossinteticamente ativa
- PAR1 - Promotor nuclear quimérico

PCR - *Polymerase chain reaction* – Reação de polimerase em cadeia
PF - Proteína fluorescente
pJP - *Just a plasmid* – (Nome escolhido para os plasmídeos gerados nessa tese)
PLA - Ácido poli-lático
PMMA – *Poly (methyl methacrylate)* - Polimetil-metacrilato
PP - Polipropileno
PST – Proteínas solúveis totais
RE – Retículo endoplasmático
RFP - *Red fluorescent protein* – Proteína fluorescente vermelha
RGB - *Red Green Blue* – Vermelho, verde e azul
RNC - *Ribosome nascent chain* – cadeia nascente do ribossomo
RPM - Rotações por minuto
SDS - Sódio dodecil sulfato
SP - *Signal peptide* – Peptídeo sinal
SRP - *Signal recognition particle* – Partícula reconhecedora do sinal
SUS - Sistema Único de Saúde
TAP - *Tris acetate phosphate medium* – Meio tris acetato e fosfato
TBS-T - *Tris buffer saline in Tween 20* – Tampão tris salino com Tween 20
Tg – Temperatura de transição vítrea
tPA - Ativador de plasminogênio tecidual
UA – Unidade arbitrária de absorvância
UAF – Unidade arbitrária de fluorescência
UTR - *Untranslated region*
UV - Ultravioleta

LINKS

Link para apresentação: http://prezi.com/wnrecu2rzjjc/?utm_campaign=share&utm_medium=copy

Link para vídeo da apresentação: <https://youtu.be/4DQDCijnwoQ>

QR Code para vídeo da apresentação:



SUMÁRIO

1. CAPÍTULO – INTRODUÇÃO GERAL.....	23
1.1. VISÃO GERAL DA TESE.....	23
1.2. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	24
1.2.1. BIOPROCESSOS.....	26
1.2.2. SISTEMAS DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS	27
1.2.3. MICROALGAS.....	29
1.2.4. PEPTÍDEO SINAL	31
2. CAPÍTULO – SECREÇÃO DE PROTEÍNAS FLUORESCENTES.....	33
2.1. INTRODUÇÃO.....	33
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS	34
2.2.1. CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS.....	34
2.2.1. TRANSFORMAÇÕES DE C. REINHARDTII E CONDIÇÕES DE CULTIVO	37
2.2.2. EXPERIMENTOS EM MICROPLACA COM ANÁLISE EM LEITOR DE	
MICROPLACAS	37
2.2.3. MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA	39
2.2.4. SOFTWARES	39
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
2.3.1. SELEÇÃO DE PROTEÍNA FLUORESCENTE	40
2.3.2. MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA	47
2.4. CONCLUSÃO.....	49
3. CAPÍTULO – AVALIAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PEPTÍDEOS SINAIS	51
3.1. INTRODUÇÃO.....	51
3.1. MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1.1. CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS.....	52
3.1.1. TRANSFORMAÇÕES DE CHLAMYDOMONAS REINHARDTII E	
CONDIÇÕES DE CULTIVO	54
3.1.2. EXPERIMENTOS EM MICROPLACA COM ANÁLISE EM LEITOR DE	
MICROPLACAS	55
3.1.3. WESTERN BLOT.....	56
3.1.4. COLORAÇÃO POR COMASSIE BLUE.....	56
3.1.5. PROTEÍNA SOLÚVEL TOTAL.....	56
3.1.6. ESTATÍSTICA.....	57

3.1.7.	SOFTWARES	57
3.2.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
3.2.1.	SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS SINAIS.....	57
3.2.2.	COMPARAÇÃO DE PEPTÍDEOS SINAIS.....	58
3.1.	CONCLUSÃO.....	72
4.	CAPÍTULO – EXPRESSÃO DE HIALURONIDASE EM CHLAMYDOMONAS REINHARDTII.....	73
4.1.	INTRODUÇÃO.....	73
4.2.	MATERIAIS E MÉTODOS	74
4.2.1.	CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS.....	74
4.2.2.	TRANSFORMAÇÕES DE C. REINHARDTII E CONDIÇÕES DE CULTIVO	77
4.2.1.	WESTERN BLOT.....	77
4.2.2.	ENSAIO DE ATIVIDADE DE HIALURONIDASE.....	78
4.2.3.	SCREENING DE CEPAS PRODUTORAS DE HIALURONIDASE.....	79
4.2.4.	AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE LISE.....	79
4.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
4.3.1.	PRIMEIRO SCREENING.....	79
4.3.1.1.	Avaliação de Cepas candidatas	82
4.3.2.	DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE LISE	88
4.3.1.	SEGUNDO SCREENING.....	89
4.4.	CONCLUSÃO.....	90
5.	CAPÍTULO – DESENVOLVIMENTO DE EQUIPAMENTOS DE LABORATÓRIO	91
5.1.	INTRODUÇÃO.....	91
5.1.1.	MANUFATURA DIGITAL.....	92
5.1.2.	FOTOBIOREACTORES	94
5.1.3.	EQUIPAMENTOS DE PROJETO ABERTO – OPEN HARDWARE.....	97
5.2.	MATERIAIS E MÉTODOS	98
5.2.1.	MATERIAIS	98
5.2.2.	MÉTODOS.....	98
5.2.2.1.	Manufatura digital aditiva.....	98
5.2.2.2.	Manufatura digital subtrativa.....	99
5.2.2.3.	Peças de silicone.....	99

5.2.2.4.	Testes de autoclavagem	99
5.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	100
5.3.1.	DESENVOLVIMENTO DE FOTOBIORREATOR – 3,5L.....	100
5.3.1.1.	Fotobiorreator – 3,5L	100
5.3.1.2.	Painel de LED	106
5.3.1.3.	Open cyclop - ISM Microscópio.....	110
5.4.	CONCLUSÃO.....	111
6.	CAPÍTULO – SUMÁRIO E TRABALHOS FUTUROS	113
6.1.	SUMÁRIO DA TESE	113
6.2.	CONCLUSÃO.....	115
6.3.	TRABALHOS FUTUROS	115
7.	REFERENCIAS	117
	APÊNDICE A - EQUIPAMENTOS DE LABORATÓRIO.....	127

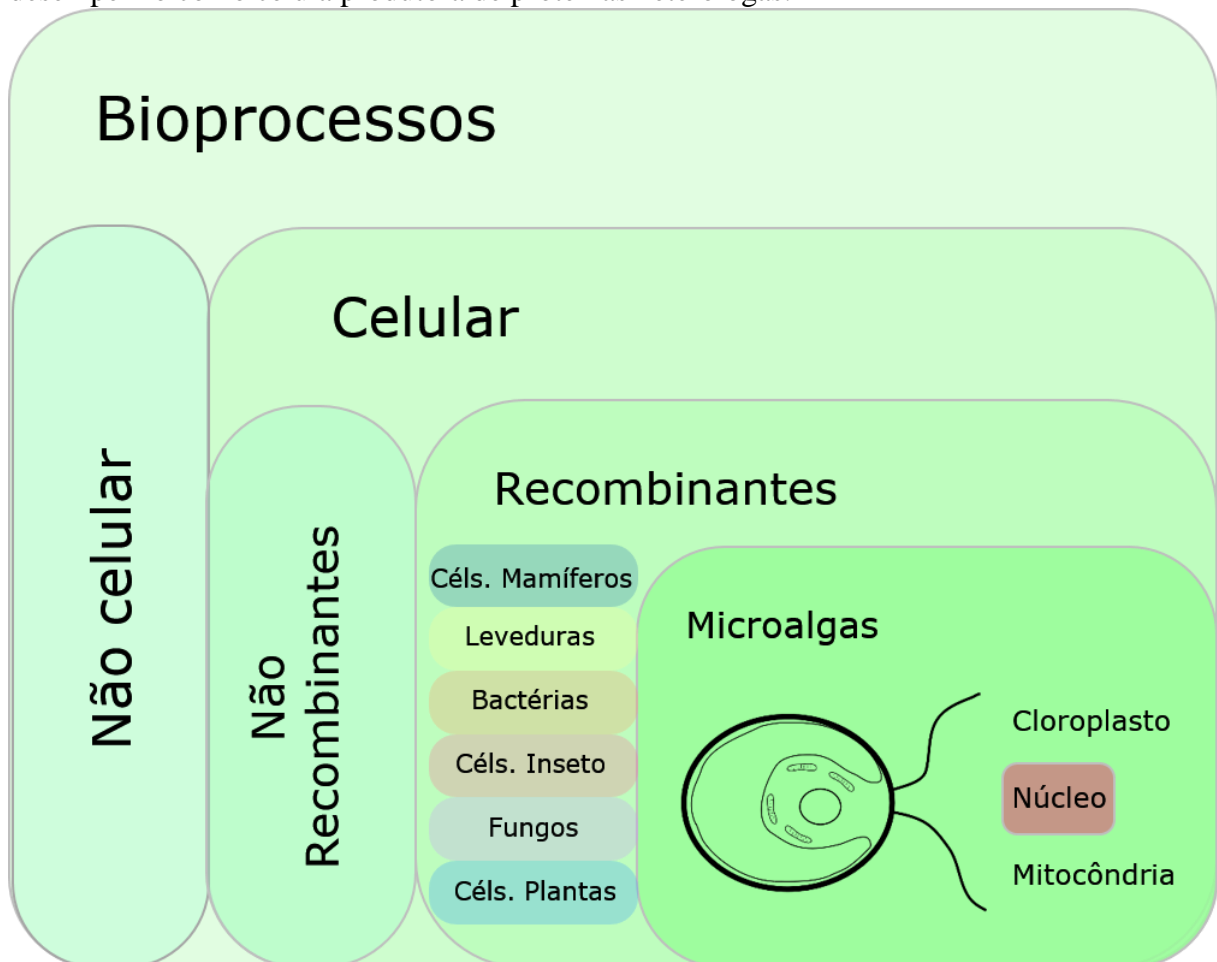
1. CAPÍTULO – INTRODUÇÃO GERAL

1.1. VISÃO GERAL DA TESE

O principal objetivo deste estudo foi desenvolver e avaliar a produção de proteínas heterólogas em microalgas, utilizando a *Chlamydomonas reinhardtii* como modelo, em escala laboratorial e em fotobiorreatores a partir de modificações no núcleo com cepas recombinantes secretoras de proteínas.

Nos capítulos seguintes, serão discutidos alguns aspectos de bioprocessos envolvendo microalgas, assim como o desenvolvimento de algumas ferramentas para a avaliação dessa tecnologia. O Esquema 1-1 apresenta um diagrama situando o alvo do estudo com o contexto em que está inserido.

Esquema 1-1: Diagrama de relação entre o escopo do projeto e bioprocessos. O objetivo do estudo é realizar modificações no núcleo de *Chlamydomonas reinhardtii* e avaliar seu desempenho como célula produtora de proteínas heterólogas.



Nota: Céls – células.

Fonte: Autor.

Este capítulo, a partir do item 1.2 contextualiza o estudo na área de produção de proteínas heterólogas, apresentando uma revisão da literatura sobre o tema e o sistema de expressão em microalgas proposto na tese. No capítulo 2 está a descrição do desenvolvimento de um fotobiorreator tubular, com iluminação artificial por LED para estudos de produção de proteínas heterólogas em microalgas. O capítulo 3 apresenta a avaliação de diferentes proteínas fluorescentes como proteínas repórter em estudos de secreção de proteínas em microalgas, fundamental para rápida avaliação da tecnologia de cultivo com secreção no sobrenadante do produto de interesse. O capítulo 4 tem como objetivo o desenvolvimento de peptídeos sinais para o sistema de expressão de microalgas de expressão, utilizando uma proteína fluorescente escolhida a partir dos resultados do capítulo 3. O capítulo 5 avalia a produção de uma proteína heteróloga de interesse terapêutico nesse sistema de expressão. O capítulo 6, apresenta as considerações finais e etapas futuras dessa linha de pesquisa.

O objetivo dessa tese é avaliar o sistema de expressão de proteínas heterólogas baseados em microalgas, quanto a parâmetros cinéticos de cultivo em fotobiorreator tubular, além de desenvolver sistemas de secreção de proteínas, que permitam abordagens de desenvolvimento de bioprocessos, como a fermentação extrativa.

1.2. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O desenvolvimento humano está intrinsicamente relacionado com a nossa capacidade de utilizar organismos vivos em nosso benefício, desde usos alimentícios até a manufatura de nanomateriais com propriedades curativas (2). Atualmente, utilizamos organismos vivos em diversos segmentos de nossa sociedade e, com o avanço da ciência, mais aplicações serão desenvolvidas. A natureza dessas aplicações são diversas como: tratamento de resíduos humanos (3), em tratamentos médicos (4), na produção de biocombustíveis (5), enzimas para diferentes setores industriais (6), medicamentos (7,8), solventes (9), biopolímeros (10), alimento humano e animal (11).

O emprego de organismos vivos em bioprocessos e produtos é uma parcela importante da economia atual, movimentando na Europa 2 trilhões de euros e empregando mais de 22 milhões de pessoas em 2015 (12). No Estados Unidos, a bioeconomia movimentou USD 369 bilhões e 4 milhões de empregos diretos em 2013, com estimativas de crescimento anual de 2% no número de empregos (13).

Ainda, dentro da área da bioeconomia está inserido o uso de organismos geneticamente modificados (OGMs), por meio da tecnologia do DNA recombinante. O desenvolvimento de

técnicas de engenharia genética aliada a tecnologia do DNA recombinante, permitiu o desenvolvimento de organismos com propriedades outrora não disponíveis. Um exemplo de sucesso das tecnologias desenvolvidas foi a inserção de uma via metabólica de *Artemisia annua* em levedura para a produção de um antimalárico, a artemisinina (8). Assim, o uso de leveduras permitiu a produção desse fármaco em processos fechados, evitando problemas da cadeia de produção baseada no plantio de *Artemisia annua*, como o período de entressafra dessa cultura que afetava o abastecimento desse composto ao mercado mundial.

Levedura é uma entre várias plataformas disponíveis para o desenvolvimento de bioprocessos por OGMs, cada qual com vantagens e desvantagens inerentes a cada organismo utilizado. Essa variedade de características tornam os estudos de processos com OGMs fundamentais para a escolha do organismo ideal para a produção do produto proposto. Por exemplo, plantas geneticamente modificadas são principalmente utilizadas em culturas extensivas de produção de alimento, bactérias para a produção de proteínas de baixa complexidade, leveduras para a produção de proteínas com algumas modificações pós-traducionais e, células de mamífero para proteínas com padrões de modificações próximas a humana. Contudo, cada um desses sistemas de expressão não se restringe a um grupo de aplicações. O aumento do conhecimento e capacidade de inserir novas modificações nos OGMs expandem gradativamente o espectro de aplicações de cada uma dessas plataformas. Tecnologias como adição de vias metabólicas (8), alteração de sistemas de modificação pós-traducional (14) e até produção de eletricidade diretamente de um cultivo (15), estão disponíveis e demonstram a diversidade e potencial dessas técnicas.

Nesse contexto, está inserido o sistema de expressão baseado em microalgas, organismos unicelulares, capazes de realizar fotossíntese que possuem características interessantes para um sistema de expressão. Microalgas são organismos com baixos requerimentos nutricionais, com capacidade de realizar modificações pós-traducionais e com relativa disponibilidades de ferramentas para modificações genéticas. Além disso, assim como as plantas, as microalgas possuem 3 genomas manipuláveis em seu interior, que podem ser utilizados para diversas aplicações biotecnológicas, desde aplicações para biocombustíveis até a produção de biofármacos (16,17). Apesar de sistemas baseados em microalgas afetarem diferentes setores da bioeconomia, o presente trabalho focou na expressão de proteínas como produto e, alguns aspectos dessa aplicação foram aqui abordados e discutidos.

1.2.1. BIOPROCESSOS

Bioprocessos estão ligados a atividade inventiva humana e são utilizados desde a antiguidade (18), como por exemplo a fermentação alcoólica para a produção de diferentes bebidas, como cerveja e vinho (19). Para obter o produto desejado, os bioprocessos podem utilizar tanto as células vivas completas como também seus componentes, como enzimas ou organelas (20). Apesar da definição de bioprocessos abranger organismos multicelulares e componentes de células, no presente trabalho foi dada ênfase em processos de sistemas unicelulares.

Os bioprocessos são conduzidos em biorreatores, em que a conversão química do substrato, por agentes biológicos, origina o produto desejado. O transporte de energia e matéria são fundamentais para os bioprocessos e dependem intrinsecamente do componente biológico utilizado (21). Os biorreatores são aparatos em que o bioprocessos se desenvolve, sendo o vaso agitado o seu exemplo clássico (22). Destaca-se que nos bioprocessos, as condições para a conversão química devem ser supridas durante todo o processo, seja ele por componentes celulares ou células inteiras. Os requerimentos e condições ideais para cada tipo de sistema deve ser desenvolvido de forma personalizada, dado a complexidade dos organismos empregados. Por exemplo, os requerimentos nutricionais e físicos de organismos como bactérias são diferentes dos necessários para leveduras, que da mesma forma serão diferentes entre cepas de uma mesma espécie (23). Esses requerimentos estão intrinsecamente ligados a estrutura e metabolismo dos organismos empregados no bioprocessos. Portanto, o desenvolvimento de um bioprocessos efetivo envolve uma extensa busca na literatura de informações sobre o organismo a ser cultivado e as condições experimentais a serem avaliadas (24). A revisão da literatura permite desenhar um ponto inicial de teste e o escopo de experimentações, que devem ser realizadas na busca por maiores produtividades. Porém, diversos aparatos são necessários para a avaliação inicial dos bioprocessos de cultivo, sendo o biorreator a peça central. Esse protagonismo dos biorreatores se deve ao seu emprego para controlar condições de cultivo (temperatura, agitação, aeração etc) e suprir as necessidades metabólicas das células cultivadas.

Os bioprocessos estão divididos em duas grandes etapas: processos a montante (*upstream*) e processos a jusantes (*downstream*). Os processos a montante, referem-se desde o isolamento e cultivo inicial das células, a propagação das células em germinadores e cultivo das células em biorreatores, até sua colheita final, bem como do produto gerado. E os processos a jusantes se referem à parte em que o produto proveniente da etapa a montante é processado para satisfazer os requisitos de pureza e qualidade. Apesar das células serem o alvo final em alguns

bioprocessos (25) e sua recuperação ser feita com técnicas como decantação, existem bioprocessos onde o produto final exige a recuperação do produto de uma matriz complexa em graus elevados de pureza. Esse é o caso por exemplo de biofármacos, em que a biomolécula alvo está misturada com outras proteínas com propriedades similares complicando a sua separação e purificação (26). Idealmente, o desenvolvimento de um bioprocessos deve integrar essas duas etapas para potencializar o uso dos recursos empregados no mesmo e aumentar os rendimentos e qualidade do produto. Por exemplo, a montagem, como o desenvolvimento de sistemas de secreção da molécula alvo para o meio reacional, tendem a facilitar as etapas de captura e purificação do produto alvo nos processos a jusante, diminuindo o custo e aumentando qualidade final do produto (27).

1.2.2. SISTEMAS DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS

Diversos sistemas de expressão de proteínas heterólogas estão sendo desenvolvidos e utilizados para a produção de um vasto espectro de produtos (8,10,28,29). A escolha do tipo de sistema de expressão mais apropriado baseia-se nas prioridades de desempenho e necessidade de cada proteína heteróloga a ser produzida. Os sistemas baseados em bactérias são amplamente utilizados por estas apresentarem alta velocidade de crescimento, serem facilmente modificados, e por, geralmente, atingir altos rendimentos de expressão de proteína recombinante. No entanto, sistemas procarióticos não possuem alguns sistemas de modificação pós-traducionais essenciais para algumas proteínas. Apesar das iniciativas para inserir o aparato necessário para a modificação pós-translacional, estes estão em desenvolvimento, potencialmente eliminando essa limitação (30). Além da ausência das modificações pós-traducionais, algumas proteínas são acumuladas em corpos de inclusão e requerem etapas adicionais de renaturação e, ainda, etapas para remoção das endotoxinas para se obter o produto desejado (31).

Outro sistema de expressão com alta velocidade de crescimento, disponibilidade de sistemas de glicosilação e capacidade de formação de pontes dissulfeto é o sistema baseado em leveduras. Apesar dessas vantagens, as proteínas recombinantes produzidas neste sistema são tipicamente hiperglicosiladas, com perfil de glicosilação rico em manose. Para algumas categorias de proteínas, como biofármacos, esse padrão de glicosilação pode resultar em epítomos imunogênicos, comprometendo o tempo de meia-vida *in vivo*, e a eficácia terapêutica do biofármaco (7). Estratégias como a humanização de cepas de levedura é uma possível solução e, foi testada com algum sucesso (32).

As células de mamíferos são o sistema de escolha para a produção de proteínas terapêuticas complexas pois, apresentam capacidade de produção de proteínas com o enovelamento correto (7). Esse sistema de expressão representava, em 2014, 56% dos bioprocessos aprovados para a produção de biofármacos (7). De fato, proteínas terapêuticas complexas, tais como anticorpos, são produzidas principalmente em cultura de células de mamíferos transgênicos. No entanto, devido ao custo de produção elevado, principalmente quando comparado a sistemas de plantas, as aplicações do sistema com célula de mamífero se restringe a biofármacos. O custo médio de produção de anticorpos em células de mamíferos atinge aproximadamente USD 150 por grama de anticorpo, enquanto que em sistemas com plantas cerca de US\$ 0,05 por grama (33,34).

O sistema de microalgas provavelmente pode rivalizar com o sistema de plantas terrestres, uma vez que o custo com meios de cultivo é baixo, cerca de US\$ 0,002 por litro (33). Apesar da necessidade de maior desenvolvimento, os sistemas baseados em microalgas necessitam de componentes simples e baratos para crescimento (24). Além disso, as microalgas possuem maquinário metabólico para o processamento de proteínas após transcrição e tradução e, possuem alta velocidade de crescimento quando comparado a plantas (35). A Tabela 1-1 resume os principais sistemas de expressão e seus perfis.

Tabela 1-1: Comparação das características de sistemas de expressão de proteínas heterólogas.

	Bactéria	Células Inseto	Células Mamíferos	Células Plantas	Levedura	Microalgas
Molecular						
Glicosilação	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
Tamanho do gene	Desconhecido	Limitado	Limitado	Ilimitado	Desconhecido	Ilimitado
Rendimento de produto recombinante	Médio	Médio-alto	Médio-alto	Alto	Alto	Geralmente baixo
Operacional						
Sensibilidade a cisalhamento	Médio	Alto	Alto	N/A	Médio	Baixo
Tempo de produção	Baixo	Longo	Longo	Longo	Médio	Longo
Custo de cultivo	Médio	Alto	Alto	Baixo	Médio	Baixo
Custo de escalonamento	Alto	Alto	Alto	Baixo	Alto	Baixo

^a Padrão de glicosilação rico em manose.

^b Temperatura ambiente

Fonte: Adaptado de Potvin e Zhang (18).

1.2.3. MICROALGAS

Microalgas são organismos eucarióticos, unicelulares capazes de realizar fotossíntese. Embora as cianobactérias sejam organismos procarióticos fotossintetizantes, são comumente adicionadas a essa classificação em aplicações biotecnológicas. As algas verdes, uma classificação informal que abrange as chlorophyta e charophyta, são organismos de linhagens antigas, surgindo há aproximadamente 1,5 - 2,0 bilhões de anos atrás (36). As estimativas de biodiversidade das microalgas alcançam valores entre 40.000 a 70.000 de espécies de microalgas na natureza, podendo ser encontradas em diferentes ecossistemas do globo (37). A alta biodiversidade das microalgas é valiosa para o desenvolvimento de bioprocessos e, representam um banco de alta diversidade de possíveis genes para o desenvolvimento de cepas recombinantes. Essa enorme disponibilidade de diversidade é fundamental no desenvolvimento de qualquer linhagem de organismo e demonstra o potencial biotecnológico das microalgas. De fato, centros de agrotecnologia, como a EMBRAPA, disponibilizam todos os anos novas cultivares de plantas com características de interesse a agroprodução, impactando a produtividade anual (38). Um exemplo de ganho a partir do banco de germoplasma foi a descoberta e uso de novos genes em cultivares de arroz de produção, a partir de uma linhagem não-comercial. A identificação de um conjunto de genes nessa linhagem de arroz sem aplicação comercial, levou ao incremento na quantidade de grãos por planta de 13-36% em uma linhagem produtora (39). Um aumento de produtividade dessa magnitude pode representar ganhos de 100 milhões de toneladas de grãos/ano nessa cultura (40). Contudo, apesar dessa biodiversidade, microalgas não tiveram esse potencial extensivamente explorado e futuros trabalhos podem trazer novas perspectivas em relação a essa diversidade.

O uso de microalgas para fins biotecnológicos ocorre há mais de 2000 anos, em que chineses utilizavam *Nostoc sp.*, *Arthrospira sp.* e *Aphanizomenon sp.* como suplemento alimentar em períodos de fome. A mesma estratégia alimentar foi posteriormente utilizada pela civilização Asteca nos séculos 14 – 16 (18). Contudo, o uso de bioprocessos com microalgas para fins comerciais começou apenas no início da década de 60 com a empresa japonesa Nihon Chlorella (41) e, desde então, esse mercado continua em expansão. Apesar desse crescimento contínuo, o mercado de microalgas ainda é pequeno. Em 1999, o mercado de microalgas foi estimado em 1000 toneladas de peso seco, com 500% de aumento de produção nos 5 anos seguintes, atingindo um valor de mercado de 1 bilhão de euros. Em 2011, o mercado global de microalgas aumentou para 2,4 bilhões de euros, com uma produção de 9000 toneladas de peso seco. Porém, quando comparado com algumas commodities, como o trigo, a produção de

microalgas representa apenas 0,001% em peso (42). Além disso, apesar da sua possível aplicação em outros nichos, mais de 75% do volume de produção dos produtos baseados em microalgas são voltados para o mercado de alimentos saudáveis, como os suplementos alimentares (43).

Além das aplicações para a indústria de alimentos, na última década, as microalgas vêm sendo desenvolvidas como um sistema de expressão de proteínas recombinantes (29,44–46), apesar de técnicas de recombinação terem sido iniciadas anteriormente. As microalgas têm muitas características que são desejáveis para um sistema comercial de expressão de proteína recombinante, como descrito na seção "Sistemas de expressão de proteínas heterólogas". Ainda, o desenvolvimento dos sistemas com microalgas foi impulsionado pelo crescente número de metodologias de transformação para o cloroplasto e núcleo, além da vantagem do curto tempo necessário entre a geração de transformantes iniciais e a avaliação da expressão proteica (29,47–49). Outras características que tornam o sistema de microalga atrativo é a capacidade de secretar proteínas e a disponibilidade de uma grande variedade de elementos de DNA, caracterizados para manipulação do cloroplasto e núcleo (29,50). Adicionalmente, a maioria das algas verdes são geralmente classificadas como seguras (*Generally regarded as safe - GRAS*), tornando o cultivo, purificação e processamento dos produtos expressos menos onerosos para as aplicações biotecnológicas (51).

Entre as espécies estudadas para experimentos de recombinação está a *Chlamydomonas reinhardtii*, uma microalga verde de água doce, que possui um conjunto de ferramentas de biologia molecular bem desenvolvidas. Por esse motivo, a *C. reinhardtii* vem sendo utilizada como a plataforma de produção de proteínas heterólogas em microalgas (47,52,53). Apesar de até o momento, apenas a expressão em cloroplastos ter gerado produtividades economicamente viável (47), diversas abordagens aumentaram o nível de expressão proteica a partir do núcleo, como a otimização de códons de construções e o desenvolvimento de vetores de expressão adequados (54,55). Outra estratégia utilizada para aumentar o nível de expressão proteica foi a fusão direta do gene de resistência a bleomicina à proteína de interesse (xyn 1, Xilanase), usando um peptídeo de auto-clivagem (2A de FMDV) para ligar a expressão do transgene ao do marcador de seleção (sh-ble) em *C. reinhardtii* (29). A separação do marcador de seleção do transgene é promovida pelo peptídeo FMDV 2A que codifica uma sequência curta de 20 aminoácidos que medeia uma reação de auto-clivagem (56). Com esta estratégia de fusão, níveis elevados de xilanase foram detectados, assim como a completa separação das proteínas fundidas foram observadas. Ainda no mesmo estudo, uma outra construção em que foi adicionado um peptídeo sinal endógeno da proteína aril-sulfatase 1 (ars1) entre o 2A e xyn 1

permitiu recuperar a enzima xilanase no sobrenadante (29). Ademais, outra estratégia empregou o uso de introns endógenos de RuBisCo para aumentar os níveis de expressão de proteínas heterólogas em até 450% (53). O uso dessas técnicas de expressão de proteínas em conjunto têm o potencial de aumentar a expressão de proteínas a partir do núcleo e, se acoplado com estratégias de produção, tem o potencial para atingir taxas de expressão economicamente viáveis. Apesar dos desenvolvimentos observados nos últimos anos, ainda nenhum produto chegou ao mercado. Contudo, empresas como a Triton Algae Innovations® tem em seu portfólio produtos nutracêuticos recombinantes em fase de testes (57).

1.2.4. PEPTÍDEO SINHAL

Peptídeos sinais são sequências de aminoácidos na porção N-terminal de proteínas que direcionam o processo de tradução para o lúmen do sistema secretor (58). Os peptídeos sinais estão presentes em proteínas direcionadas ao retículo endoplasmático, complexo de Golgi, membrana citoplasmática e em proteínas direcionadas para o meio extracelular. O correto direcionamento da síntese proteica é importante para a estrutura, modificações pós-traducionais e atividade de proteínas eucarióticas secretadas (27). A proteína nascente no ribossomo tem o peptídeo sinal reconhecido por uma partícula de reconhecimento de sinal (SRP) e forma um complexo de SRP-ribossomo-cadeia nascente (SRP-RNC), que é acoplado a membrana do retículo endoplasmático e conduz o término da síntese para o lúmen do retículo endoplasmático (59).

Como esse processo de reconhecimento de sinal envolve a interação entre estruturas ribo-proteicas, diferentes peptídeos sinais terão diferentes afinidades pelas partículas de reconhecimento do peptídeo sinal e por conseguinte diferentes eficiências de secreção (27). De fato, diferentes peptídeos sinais apresentaram eficiências de secreção diferentes em outros sistemas de expressão (60). Portanto, é importante explorar a diversidade desse sinal com o intuito de alcançar maiores níveis de secreção em sistemas de expressão. A habilidade de secretar proteínas permite estratégias de produção em que a proteína alvo seja separada das células viáveis durante o cultivo, permitindo que elevadas concentrações de células sejam mantidas em cultivo por períodos prolongados de tempo. Em última instância, as células são os agentes produtores e a produção está diretamente relacionada com a densidade de células viáveis presentes no bioprocessamento. Assim, em sistemas em que o produto é secretado, estratégias de ciclo de células tem o potencial de aumentar o rendimento do bioprocessamento (61), tendo um efeito mais dramático em sistemas com prolongadas etapas de crescimento celular.

Bioprocessos como, batelada alimentada, processos semi-contínuos e contínuos com perfusão tem o potencial de aproveitar ao máximo esses bioreatores microscópicos aumentando a vida útil média das células do processo (62).

2. CAPÍTULO – SECREÇÃO DE PROTEÍNAS FLUORESCENTES

2.1. INTRODUÇÃO

Proteínas fluorescentes (PFs) são moléculas proteicas que emitem luz ao serem excitadas por determinadas ondas eletromagnéticas. Essas moléculas foram primeiro descobertas na água-viva *Aequorea victoria*, onde uma proteína verde fluorescente, GFP, foi identificada (63). Porém, apenas nos anos 90 que aplicações biotecnológicas começaram a ser implementadas, como a expressão da GFP em *Escherichia coli* e *Caenorhabditis elegans* (64). Essas proteínas verdes são a primeira de uma família de proteínas que foram ou descobertas ou desenvolvidas com propriedades de fluorescência.

Atualmente, mais de 90 tipos de proteínas estão disponíveis para diversas aplicações biotecnológicas (65). O espectro útil, inicialmente restrito a região do verde, foi expandido, contemplando desde proteínas com fluorescência na região do UV, como a Sirius (66) até proteínas com fluorescência na região do infravermelho próximo, como a iRFP720 (67). Contudo, proteínas fluorescentes não apenas possuem comprimentos de excitação e emissão específicos, como também propriedades que permitem o estudo de diversos mecanismos celulares, baseados por exemplo em tempo de maturação, complementariedade, sensibilidade a pH. Por exemplo, essas proteínas possibilitam estabelecer a localização da síntese proteica (66), definir níveis de expressão (64), obter informações temporais de eventos celulares (68), estimar o pH de organelas (69), e determinar a proximidade entre diferentes moléculas dentro das células (70). Vale ressaltar que essas proteínas possuem um enorme potencial de aplicações que podem ser desenvolvidos conforme são estudadas.

O sucesso da aplicação dessas proteínas em ciências da vida está relacionada com a sua ampla capacidade de atingir fluorescência após tradução sem a necessidade de adicionar cofatores ou chaperonas (71). Na prática, o único limitante para o uso dessas proteínas é a capacidade de manipulação genética do organismo alvo. Além disso, o desenvolvimento e barateamento de técnicas de síntese de DNA permitem que sequências de proteínas descobertas ou desenvolvidas em diferentes regiões do globo, alcancem laboratórios de pesquisa, independente de sua localização. No presente trabalho, além da GFP códon otimizada para expressão nuclear em *Chlamydomonas reinhardtii*, outras proteínas fluorescentes foram utilizadas como proteínas repórter. duas proteínas na região do azul, mTagBFP e Cerulean, duas verdes GFP e Emerald, e três vermelhas cOFP, tdTomato e mCherry.

mTagBFP é uma proteína fluorescente monomérica com espectro de excitação e emissão curto (Ex 402 nm e Em 457 nm), utilizado para estudos de transferência de energia por ressonância de Förster (FRET). Essa proteína é desenvolvida por mutagêneses a partir de uma proteína vermelha, a mTagRFP. (72). Cerulean é uma PF na região do ciano, derivada de ECFP. É um dímero fraco, com espectro de excitação e emissão em comprimentos maiores que mTagBFP (Ex 433 nm e Em 475 nm) (73).

A Emerald e GFP, proteínas verdes, são dímeros fracos. Ambas possuem o espectro de excitação e emissão próximos, porém com brilhos diferentes e propriedades de maturação diferente, tendo Emerald um menor tempo de maturação (74).

As 3 proteínas vermelhas usadas foram: cOFP, tdTomato e mCherry. cOFP é uma proteína fluorescente isolada de uma anêmona tubular, *Cerianthus sp.*. É uma proteína tetramérica com espectro de fluorescência na região do laranja (Ex 548 nm e Em 574 nm), com 81% de homologia com uma proteína verde de *Cerianthus membranaceu*. tdTomato é uma proteína vermelha desenvolvida por mutagêneses de DsRed, originalmente um dímero, que teve seu monômero fusionado em sequência utilizando uma cadeia peptídica entre os monômeros (Ex 554 nm e Em 581 nm) (75). É uma das proteínas vermelhas de maior brilho e fotoestabilidade já desenvolvidas. Por último, a mCherry, uma variante de DsRed, monomérica com tempo de maturação de aproximadamente 40 min e com espectro de excitação e emissão maior que tdTomato (Ex 587 nm e Em 610 nm).

Neste estudo, as PFs foram expressas para avaliar sua aplicação como repórter para processos de secreção e determinar qual possibilitaria a maior sensibilidade nesse tipo de experimento em microalgas. O objetivo deste estudo foi expressar PFs que abrangem o espectro visível na microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* e comparar seu desempenho como genes repórter como marcador de secreção

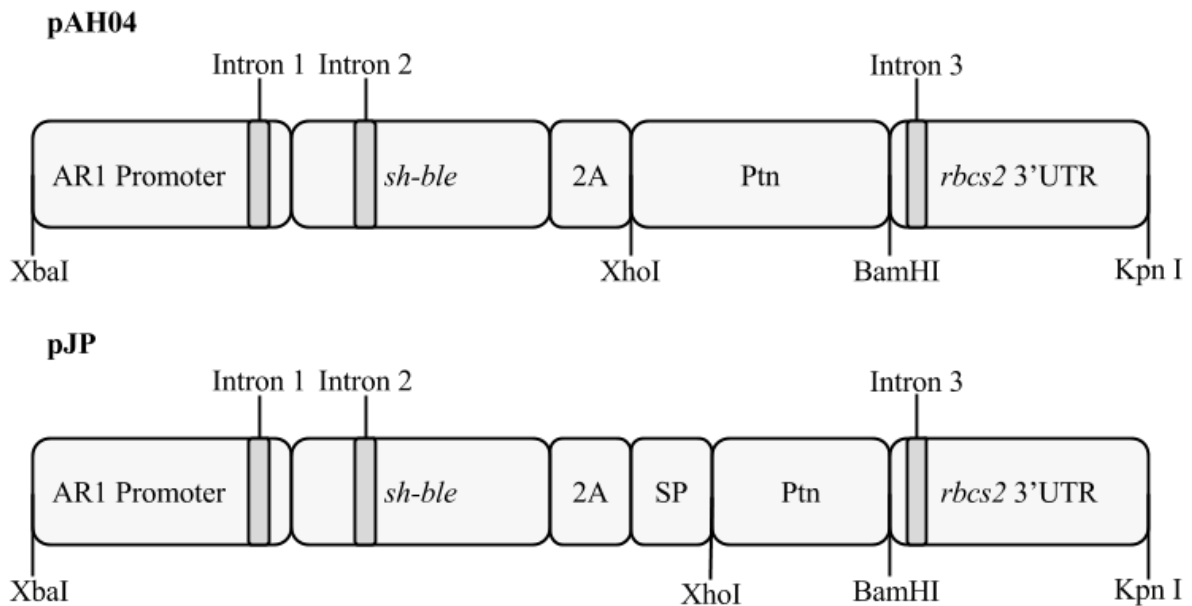
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS

Os plasmídeos foram construídos no pBluescript II (pBSII) e as modificações foram feitas nos vetores de expressão gerados por Beth Rasala e, posteriormente, modificada por Austin Hallgreen (Prefixo pAH04). As construções sem peptídeo sinal (pAH04) foram utilizadas como controle para os experimentos de secreção de proteínas. As sequências de peptídeos sinais foram inseridas como indicado no vetor com prefixo pJP no Esquema 2-1.

A estrutura do vetor de expressão (pAH04) é composta por um promotor nuclear P_{AR1}, gene de resistência a bleomicina (*sh-ble*), um peptídeo de autoclivagem 2A, e uma região terminadora proveniente da *rbc2*. Além disso, 3 introns provenientes da *rbc2* foram inseridos na ordem nativa na construção. O P_{AR1} é um promotor quimérico contendo partes do promotor *hsp70A/rbc2*, e o primeiro intron da *rbc2*, que foi inserido por reação de SLICE (76).

Esquema 2-1: Vetores de expressão para proteínas fluorescentes.



Nota: **Promoter**: Promotor quimérico contendo os promotores *hsp70A/rbc2* com o primeiro intron de *rbc2*. **Intron**: introns da *rbc2*, números indicam a ordem no gene original. **sh-ble**: marcador de resistência a bleomicina. **2A**: Peptídeo de autoclivagem do vírus FMDV (Food and Mouth Disease Virus). **Ptn**: Proteína de interesse a ser expressa. **rbc2 3'UTR**: Região não traduzida da subunidade pequena da RuBisCO 2. **SP**: peptídeo sinal.

Fonte: Autor

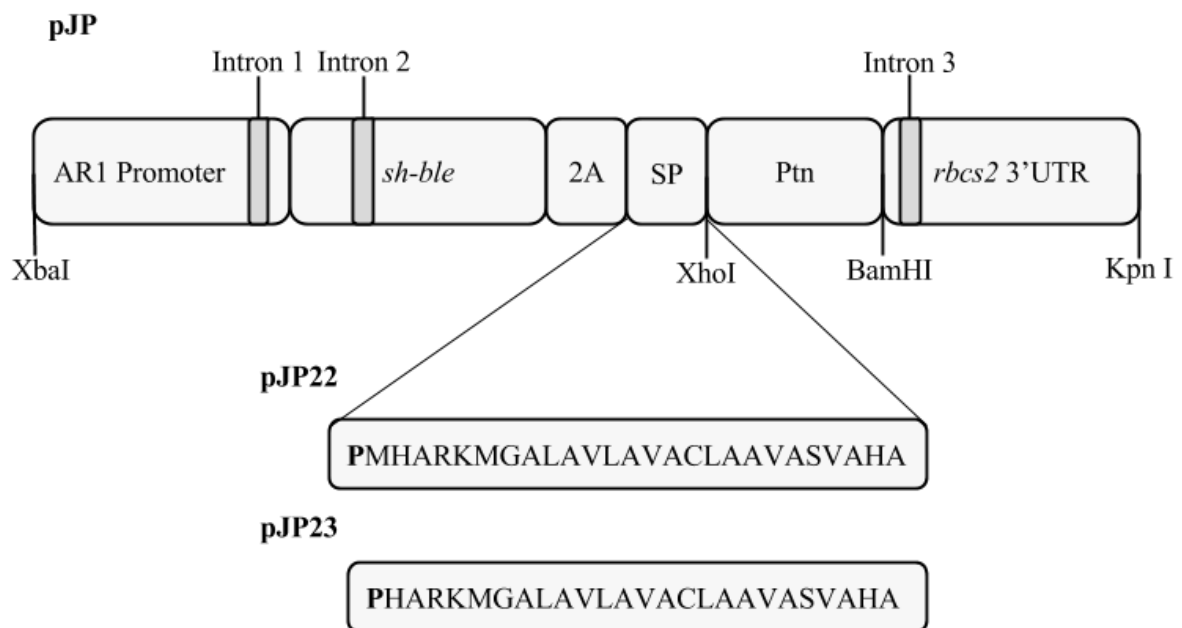
O promotor nuclear foi clonado no pBS II como fragmento contendo sítios de restrição XbaI/NdeI. A sequência 2A foi adicionada ao fim do *sh-ble* por PCR usando um primer reverso longo codificado para a sequência códon otimizada da sequência 2A. *sh-Ble-2A* foi clonado em seguida de P_{AR1} como um fragmento de NdeI/XhoI. A região *rbc2* 3'UTR foi inserida como um fragmento de XhoI/BamHI. O segundo e terceiro intron de *rbc2* foram inseridos na posição 171 da sequência da *sh-ble* e, o intron 3 na posição 19 da sequência *rbc2* 3'UTR presente no fim da construção, através de reações de SLICE.

As PFs a serem expressas foram adicionadas usando os sítios de restrição XhoI/BamHI, a menos que descrito de outra forma. As sequências dos peptídeos sinais foram inseridas usando reações de SLICE. Plasmídeos pAH04 cortados com XhoI foram incubados com amplicons codificando para os diferentes peptídeos sinais de acordo com o plasmídeo sendo construído.

Cada amplicon continha a sequência de interesse, um MCS (Multiple cloning site) com os sítios XhoI, NdeI e BamHI, um códon de parada e em regiões franqueadoras regiões com homologia de 15-25 pares de base com a porção 3' da sequência de *sh-ble* e 5' da *rbc2* 3'UTR. Os vetores com peptídeos sinais são nomeados com o prefixo pJP. As sequências de PFs estavam disponíveis no laboratório do prof. Stephen Mayfield, UCSD, e foram previamente descritas (77), e foram inseridos através de reações de ligação com T4 ligase e fragmentos e vetor cortados com XhoI e BamHI.

Dois plasmídeos base foram construídos para verificar se a presença de um aminoácido a mais na posição N-terminal do peptídeo sinal influenciaria a capacidade de secreção do peptídeo sinal. Essa hipótese foi testada com pJP22 e pJP23, ambos contendo o peptídeo sinal da ARS1, porém pJP23 foi construído sem a metionina na primeira posição. O Esquema 2-2 demonstra a sequência de aminoácidos na região do peptídeo sinal após traduzidos e clivados do peptídeo 2A.

Esquema 2-2: Diferentes versões do peptídeo sinal de ARS1 gerados pelos plasmídeos pJP22 e pJP23 após tradução e clivagem do peptídeo 2A.



Nota: **P** – prolina residual após autoclivagem do peptídeo 2A.

Fonte: Autor

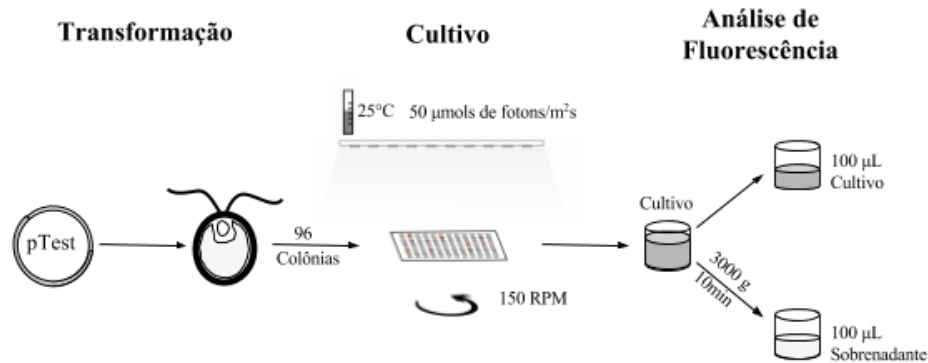
2.2.1. TRANSFORMAÇÕES DE *C. reinhardtii* E CONDIÇÕES DE CULTIVO

A cepa selvagem com parede CC1690 de *C. reinhardtii* foi cultivada em meio TAP (78), constituído em sua maior parte por tris-HCl, acetato, fosfato, a 25°C com agitação constante a 150 rpm em agitador rotativo sobre iluminação constante de $50 \pm 10 \mu\text{mol}$ de fótons/ m^2s até alcançarem uma concentração entre $3\text{-}6 \times 10^6$ células/mL em meio TAP. As células foram centrifugadas e ressuspensas em meio TAP suplementado com 40 mM de sacarose para uma concentração celular final de $3\text{-}6 \times 10^8$ células/mL. Em seguida, 250 μL de células ressuspensas foram incubadas com 300-1000 ng de plasmídeos digeridos com XbaI e KpnI por 5-10 min em gelo, dentro de cubetas de eletroporação de 4 mm. Um pulso exponencial de 2000V/cm foi aplicado utilizando um eletroporador GenePulser XCell™ (BioRad, Hercules, CA). A capacitância foi ajustada para 25 mF, sem restrição de resistência. As células foram recuperadas por 18 h em 10 mL de TAP-40mM sacarose e em seguida plaqueados em duas placas de TAP ágar, suplementados com zeocina nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2.2.2. EXPERIMENTOS EM MICROPLACA COM ANÁLISE EM LEITOR DE MICROPLACAS

Para avaliar as construções, colônias provenientes das placas de seleção foram avaliadas seguindo o fluxo representado no Esquema 2-3. As colônias foram coletadas e cultivadas em meio TAP até o final da fase log, em placas Deep-well (Corning Axygen®, N °: PDW500CS, Thermo Fisher Scientific Inc.). Meio TAP foi adicionado em cada poço em um volume de 400 μL , com agitação constante a 100-150 RPM em agitador rotativo sob iluminação constante ($50 \pm 10 \mu\text{mol}$ s de fótons/ m^2s) durante 5 dias. Em seguida, 100 μL de células foram transferidas para poços de uma placa preta de fundo transparente de 96 poços (Corning Costar, Tewksbury, MA, EUA) e a fluorescência foi lida utilizando um leitor de placas Infinite® M200 PRO (Tecan, Männedorf, Suíça). O sobrenadante foi obtido centrifugando a 3000 g durante 10 min a placa Deep-well e 100 μL de cada poço foi lido no mesmo leitor.

Esquema 2-3: Fluxo do experimento de avaliação de fluorescência.



Nota: 96 Colônias resistentes a zeocina foram cultivadas em microplacas sobre iluminação contínua por 7 dias. Fluorescência do cultivo e do sobrenadante foram medidos usando o Infinite® M200 PRO em placas de 96 poços. **pTest**: Plasmídeo a ser testado.

Fonte: Autor

As leituras de fluorescência foram realizadas com o comprimento de onda de excitação / emissão indicados na Tabela 2-1. As medidas de fluorescência foram adquiridas com ganhos fixo para cada proteína fluorescente. O meio TAP foi utilizado como um branco. Os sinais de fluorescência foram normalizados por fluorescência de clorofila (excitação 440/9 nm, emissão 680/20 nm, ganho 100). Os sinais de autofluorescência da cepa selvagem CC1690 normalizados foram utilizados para análise em todos os tipos de amostras.

Tabela 2-1: Sumário das condições de leitura de fluorescência de cada proteína fluorescente.

Proteína Fluorescente	Ganho	Excitação (nm)	Emissão (nm)
mTagBFP	150	399/9	450/20
mCerulean	150	450/9	486/20
Emerald	150	482/9	515/20
CrGFP	120	488/9	522/20
cOFP	120	548/9	583/20
tdTomato	150	554/9	590/20
mCherry	200	575/9	608/20

Fonte: Autor

Para cálculos de relação sinal ruído, foi utilizado a seguinte fórmula.

Equação 2-1

$$S/N = \frac{\% spPF}{\% nspPF}$$

Em que, % spPF é a porcentagem de fluorescência no sobrenadante comparada com o valor do cultivo em amostras com plasmídeos contendo peptídeo sinal e, % nspPF é a porcentagem de fluorescência no sobrenadante comparada com o valor do cultivo em amostras com plasmídeos sem peptídeo sinal.

As colônias foram consideradas positivas quando seu valor de fluorescência foi superior ao valor médio de fluorescência da célula selvagem (CC1690), adicionado três desvios padrão nas mesmas condições experimentais.

Para avaliar a capacidade de secreção de PF, a colônia com maior sinal de fluorescência para cada PF foi cultivada em 50 mL de TAP, com 150 RPM de agitação orbital por 5 dias sob iluminação constante ($50 \pm 10 \mu\text{mols}$ de fótons/m²s), e comparadas com a célula selvagem CC1690. Todos os cultivos foram ao final de 5 dias avaliados quanto a fluorescência total e no sobrenadante.

2.2.3. MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA

Os clones representativos de cada construção foram crescidos em meio TAP até o fim da fase log num agitador rotativo. As células vivas foram plaqueadas em tampões TAP / agarose a 1% antes da aquisição da imagem. As imagens foram capturadas num microscópio confocal DeltaVision (Applied Precision Inc., Issaquah, WA, EUA) compreendendo um microscópio invertido Olympus IX71 (Center Valley, PA, EUA) equipado com uma objetiva Olympus UPlanSApo 100 9 / 1,40 e um CoolSNAP HQ2 / ICX285 (Photometrics, Tucson, AZ, EUA).

Foram utilizados os seguintes filtros: mTagBFP, excitação 360/40 nm, emissão 457/50 nm; mCerulean, excitação 436/10 nm, emissão 470/30 nm; CrGFP e Emerald, excitação 470/40 nm, emissão 515/30 nm; cOFP, tdTomato e mCherry, excitação 558/28 nm, emissão 617/73 nm. Os seguintes filtros foram utilizados para a autofluorescência de pigmentos fotossintéticos na imagem para cada cepa transgênica indicada: excitação 470/40 nm, emissão 617/73 nm para células que expressam mTagBFP, GFP, Emerald, cOFP e mCherry; Excitação 500/23 nm, emissão 535/30 nm para células expressando mCerulean; Excitação 470/40 nm, emissão 515/30 nm para células expressando tdTomato.

A aquisição de imagens e a deconvolução foram realizadas usando Resolve3D SoftWoRx-Acquire (versão 5.5.1, Applied Precision, Issaquah, WA, EUA) e o ajuste de brilho e combinação dos canais de cores, utilizando o ImageJ, as imagens foram salvas como arquivos jpeg.

2.2.4. SOFTWARES

As imagens de microscopia foram analisados utilizando ImageJ, criado por Wayne Rasband do NIH (National Institute of Health) (79).

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. SELEÇÃO DE PROTEÍNA FLUORESCENTE

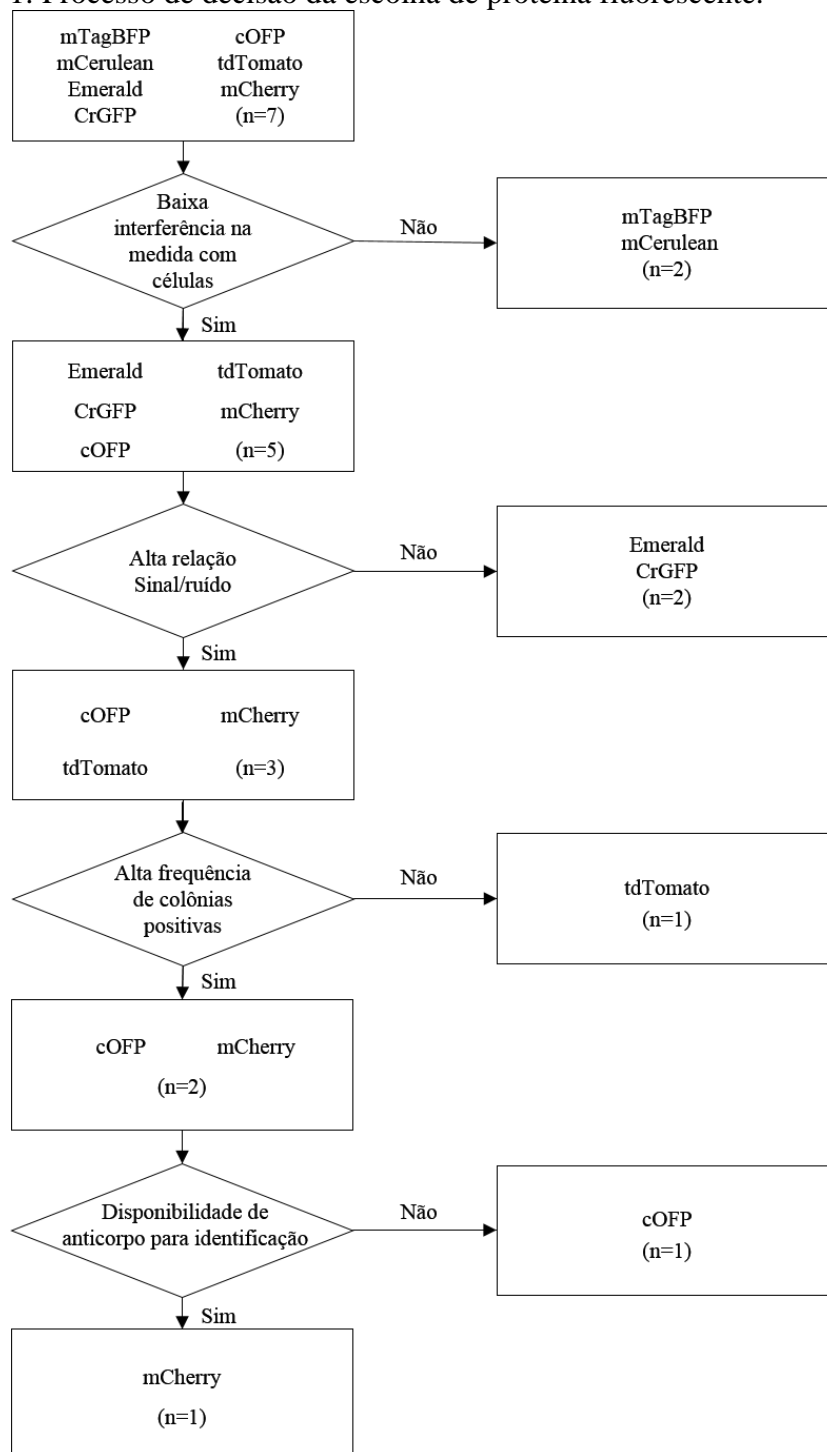
As proteínas fluorescentes (PFs) foram escolhidas como proteínas repórter por oferecer além de um custo baixo para quantificações, a capacidade de serem observadas por microscopia de fluorescência em compartimentos celulares. Genes repórter enzimáticos como luciferase foram considerados para a avaliação da capacidade de secreção. Porém, as PFs foram escolhidas pela facilidade de sua detecção e ausência de etapas preparatórias para sua quantificação, que reduziriam o volume de experimentos possíveis.

Inicialmente, havia uma preocupação de que as PFs poderiam estar inativas quando secretadas devido a possíveis modificações ocorrendo no retículo endoplasmático e complexo de golgi, uma vez que a maioria das proteínas fluorescentes foram inicialmente testadas e desenvolvidas no citoplasma bacteriano (80). A via secretória possui diferentes características, quando comparada com o citoplasma bacteriano, o que torna importante a avaliação das proteínas fluorescentes nesse contexto. Por exemplo, eGFP em células endócrinas forma oligômeros quando direcionadas para a via secretória de proteínas, devido a formação de pontes dissulfeto (81). As vesículas secretoras possuem condições mais oxidantes, quando comparadas com o citoplasma bacteriano, o que explica a formação desses oligômeros e altera o padrão de secreção dessas proteínas. Além disso, a presença de sítios consenso para glicosilação nessas proteínas pode conduzir a glicosilação em posições importantes na proteína recém-sintetizada. A presença de um carboidrato de ~1.3 nm é o suficiente para interferir com o enovelamento correto da PF. Assim como resíduos na porção externa, uma vez que açúcares de ~4.6nm podem impedir por interação estérica a ligação de pares para a conformação quaternária (80). Portanto, para avaliar a atividade das PFs, e evitar falsos negativos, sete proteínas fluorescentes foram avaliadas em paralelo quanto à sua capacidade de secreção em *C. reinhardtii*, CrGFP, mCherry, cOFP, mTagBFP, mCerulean, tdTomato e Emerald. O peptídeo sinal utilizado para este teste inicial foi o proveniente da Arilsulfatase (ARS1), inicialmente disponível no laboratório e previamente testado para a secreção de xilanase (29).

Além deste teste, foi avaliado se a presença de um aminoácido na porção N-terminal do peptídeo de secreção alteraria a sua capacidade de secreção. Esta avaliação foi necessária, pois um resíduo de prolina é mantido na porção N-terminal do peptídeo sinal devido ao uso do peptídeo sinal 2A de autoclivagem no vetor de expressão. Portanto, para avaliar a influência na secreção de um aminoácido residual na porção N-terminal do peptídeo sinal, dois tipos de peptídeos foram construídos para a secreção (Esquema 2-2). Uma construção mantendo uma

metionina na porção N-terminal do peptídeo (pJP22) e outra com a sua remoção, resultando numa substituição da metionina por prolina na versão processada da molécula (pJP23). O Fluxograma 2-1 apresenta o processo de escolha da proteína fluorescente para os experimentos de secreção descritos abaixo.

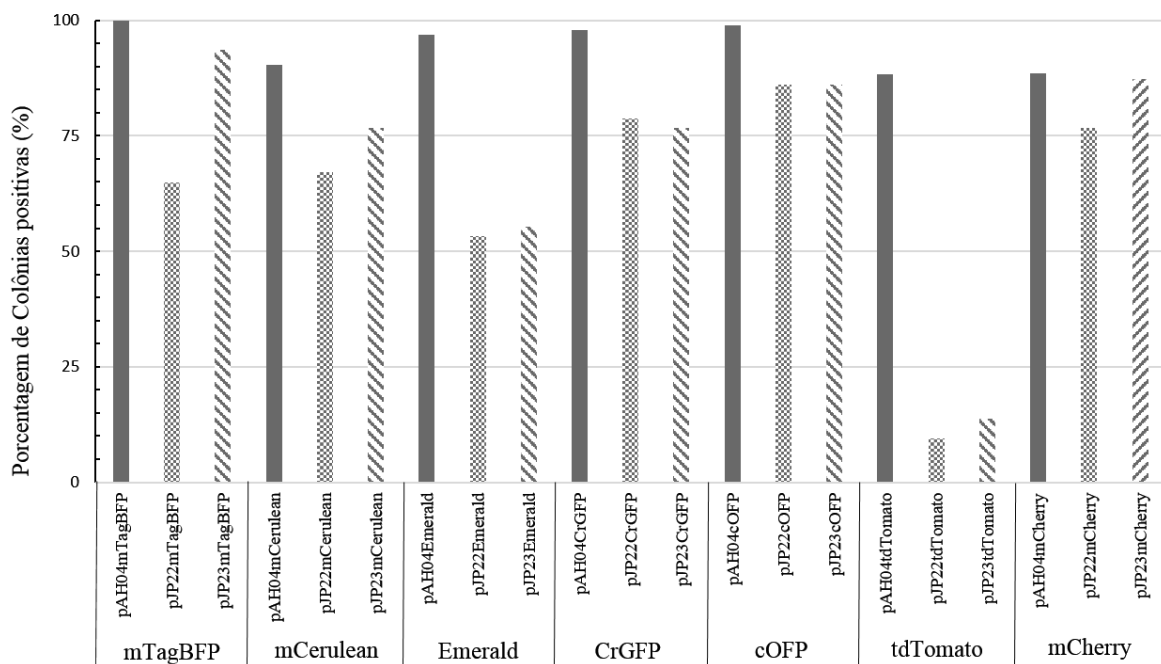
Fluxograma 2-1: Processo de decisão da escolha de proteína fluorescente.



Fonte: Autor

As construções sem peptídeo sinal, foram utilizadas como controle negativo para a secreção de proteínas fluorescentes, para observar efeitos que poderiam conduzir proteínas intracelulares ao meio de cultivo, como lise celular. Notavelmente, as proteínas fluorescentes incorporadas à construção sem peptídeo sinal apresentaram uma frequência maior de colônias positivas (>90%) quando comparados com as versões com peptídeo sinal (10-90%), como apresentado no Gráfico 2-1.

Gráfico 2-1: Porcentagem de colônias positivas com cada uma das três versões dos plasmídeos.



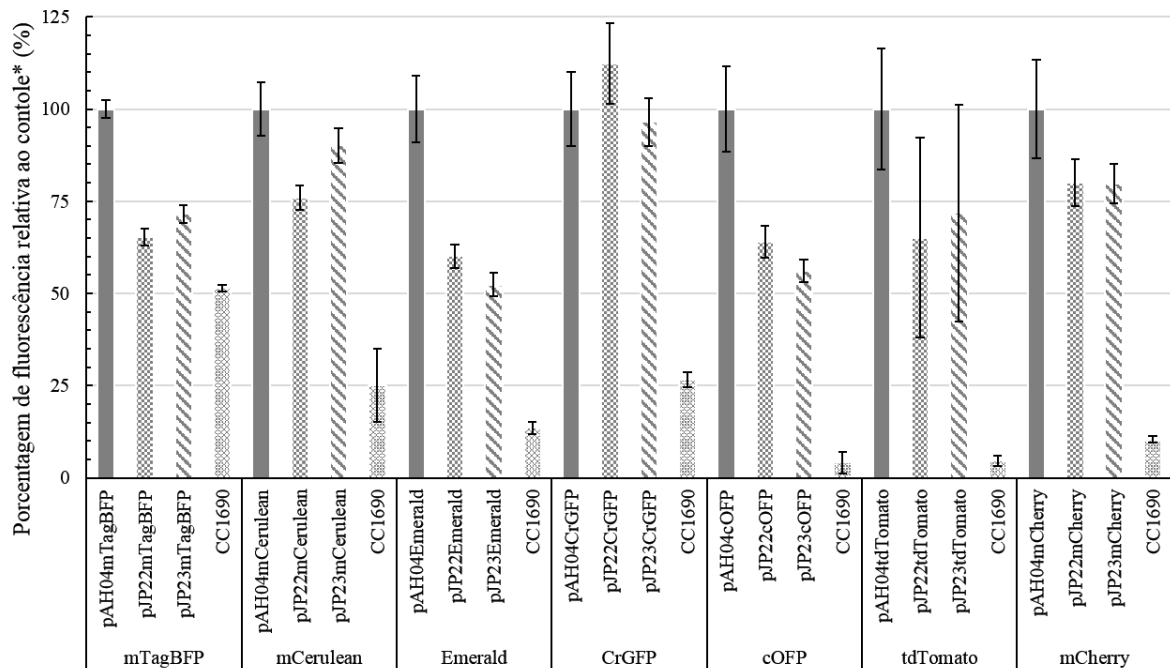
Nota: Colônias foram consideradas positivas se o valor de fluorescência do cultivo superou o valor médio de fluorescência da célula selvagem por três desvios padrões no experimento de avaliação de fluorescência. **pAH04** – plasmídeo sem peptídeo sinal. **pJP22** – plasmídeo com peptídeo sinal sem remoção de metionina. **pJP23** – plasmídeo com peptídeo sinal com remoção de metionina.

Fonte: Autor

Além da maior frequência de colônias positivas, as versões sem peptídeo sinal deram origem a cepas com expressão média de proteína fluorescente superior as construções com peptídeo sinal e bem distintas da célula selvagem (Gráfico 2-2). A única diferença entre as proteínas produzidas são os peptídeos sinais que possuem 27 ou menos aminoácidos e é interessante notar a influência negativa deles sobre os parâmetros relacionados ao nível de expressão. Uma possível explicação é a formação de proteínas com enovelamento incorreto, o que aumentaria o estresse celular no momento da seleção, reduzindo o *fitting* das células transformadas. As condições na vesícula de secreção são diferentes do citoplasma, o que poderia acarretar enovelamento incorreto em uma fração das PF sintetizadas (80).

Independentemente dessa observação, às construções com peptídeo sinal positivas apresentaram níveis de expressão equiparáveis as construções sem peptídeo sinal, usualmente na mesma ordem de magnitude. Os níveis observados permitem o estudo e desenvolvimento de sistemas baseados em secreção de proteínas, utilizando proteínas fluorescentes como repórter. A disponibilidade de sistemas simples e baratos, como as PFs, para a análise e desenvolvimento de bioprocessos, permite a padronização e avaliação desses processos com maior eficiência. Portanto, bioprocessos baseados em secreção da proteína alvo para o sobrenadante, se beneficiaram do uso dessas proteínas.

Gráfico 2-2: Fluorescência média relativa ao controle positivo para cada proteína fluorescente.



*Controle positivo: Plasmídeos sem peptídeo sinal para cada proteína fluorescente.

Nota: Média dos valores de fluorescência das colônias positivas para cada construção relativas ao valor médio de fluorescência do plasmídeo sem peptídeo sinal para cada proteína fluorescente. **pAH04** – plasmídeo sem peptídeo sinal. **pJP22** – plasmídeo com peptídeo sinal sem remoção de metionina. **pJP23** – plasmídeo com peptídeo sinal com remoção de metionina. mTagBFP, mCerulean, Emerald, CrGFP, cOFP, tdTomato, mCherry são proteínas fluorescentes testadas com cada versão do plasmídeo. Barra de erros representam intervalo de confiança de 95%

Fonte: Autor

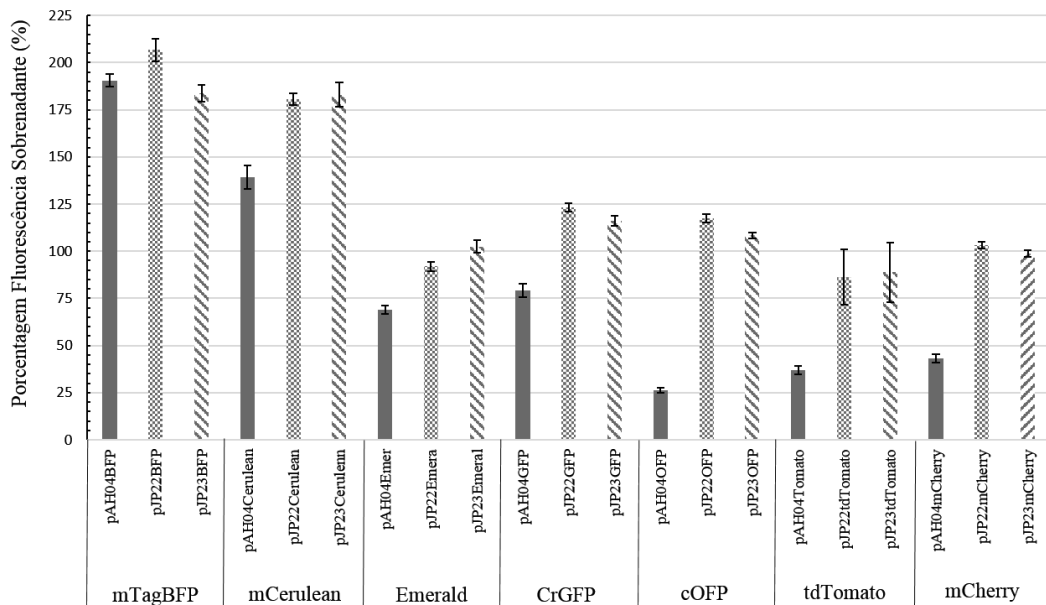
Sob a perspectiva de bioprocessos, o uso de células secretoras é interessante por simplificar as etapas de captura e purificação que podem chegar a 80% do custo total, no caso de biofármacos (82). Proteínas no sobrenadante estão em um ambiente com menor complexidade, favorecendo processos a jusante de captura e purificação. Portanto, apesar de valores menores de produção de proteínas serem alcançados na etapa de cultivo em cepas secretoras, a decisão entre bioprocessos deve acompanhar uma análise integrada de processos a jusante e a montante. A produção de proteínas intracelularmente pode ser vantajosa em

processos em que baixos ou nenhum grau de pureza são necessários para o produto final, refletindo em menor custo de processos de purificação (44).

As medidas de proteínas na região do azul apresentaram a maior autofluorescência entre as construções testadas, com as menores autofluorescências para as proteínas vermelhas, como observado em outros estudos (77). Contudo, mesmo para as construções com PFs azuis que apresentaram a maior autofluorescência, é possível discernir entre o controle negativo (células selvagens CC1690) das células transformadas.

O Gráfico 2-3 apresenta a análise de sinal de fluorescências no sobrenadante das construções testadas em termos de porcentagem do total medido no cultivo (células junto ao sobrenadante).

Gráfico 2-3: Porcentagem de fluorescência no sobrenadante comparado com o total do cultivo.



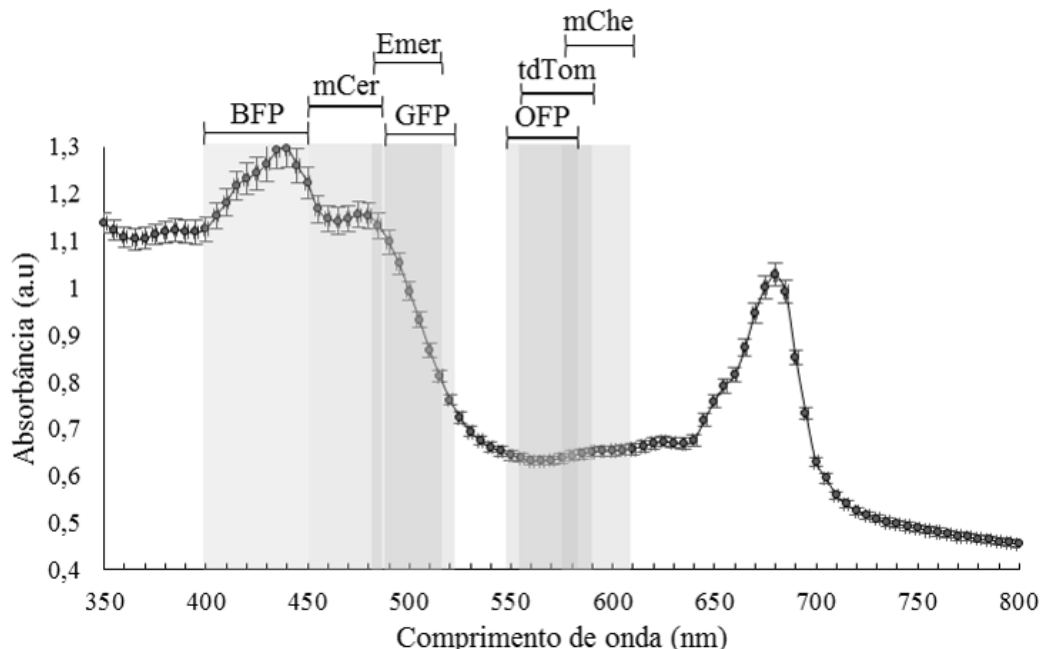
Nota: **pAH04** – plasmídeo sem peptídeo sinal. **pJP22** – plasmídeo com peptídeo sinal sem remoção de metionina. **pJP23** – plasmídeo com peptídeo sinal com remoção de metionina. mTagBFP, mCerulean, Emerald, CrGFP, cOFP, tdTomato, mCherry são proteínas fluorescentes testadas com cada versão do plasmídeo. Barra de erros representam intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Autor

Em relação a escolha da melhor PF para estudos de secreção em *C. reinhardtii*, algumas análises foram feitas como descrito a seguir. As proteínas fluorescentes com comprimentos de excitação e emissão na região do azul tiveram elevada interferência em suas medidas, provavelmente devido a pigmentos presentes nas células. Os valores de fluorescência no sobrenadante foram superiores a medida do cultivo (células junto com o sobrenadante), indicando uma subquantificação no sobrenadante. O Gráfico 3-4 apresenta um espectro de

absorbância de um cultivo de *C. reinhardtii* com as faixas de comprimento de onda utilizados nos experimentos de cada proteína fluorescente. Como pode ser observado nesse gráfico, mTagBFP e mCerulean estão na região de maior absorbância no espectro de *C. reinhardtii*. As proteínas verdes Emerald e CrGFP, estão na região de transição e têm os seus comprimentos de onda de emissão em uma região de menor absorbância, resultando em menor interferência como observado por seus valores de porcentagem de fluorescência no sobrenadante no Gráfico 2-4. Uma forma simples de avaliar essa hipótese seria utilizar o sobrenadante dessas culturas e misturar com concentrações conhecidas de célula selvagem. Uma redução proporcional no valor de fluorescência confirmaria essa hipótese, assim como o uso de soluções com clorofila a e b frente a esses sobrenadantes. Outra possibilidade seria a expressão de proteínas fluorescentes com espectros na região de 650-700 nm, como a NirFP (*Near-infrared fluorescent protein*). Porém, essas análises não foram realizadas por não serem foco do presente trabalho, uma vez que os resultados do screening já indicavam que as proteínas vermelhas apresentariam os melhores resultados.

Gráfico 2-4: Espectro de absorbância de *Chlamydomonas reinhardtii*, cepa selvagem CC1690 com faixas representando a região entre o comprimento de excitação e emissão de cada proteína fluorescente.



Nota: **BFP** – proteína fluorescente mTagBFP. **mCer** – proteína fluorescente mCerulean. **Emer** – proteína fluorescente Emerald. **GFP** – proteína fluorescente CrGFP. **OFP** – proteína fluorescente cOFP. **tdTom** – proteína fluorescente tdTomato. **mChe** – proteína fluorescente mCherry. Barras de erro representam intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Autor

Outro parâmetro avaliado para escolha da proteína fluorescente foi a relação sinal/ruído entre fluorescência no sobrenadante nas versões de plasmídeo com peptídeo sinal e as versões

sem peptídeo sinal. Nessa análise, as proteínas verdes apresentaram uma menor relação (~1,5) do que as proteínas vermelhas (>2,2) e foram desconsideradas como proteínas repórter para os experimentos de secreção. Contudo, essas proteínas são possíveis marcadores para esse tipo de experimento por possuírem relações maiores do que 1. Valores elevados na relação sinal/ruído, indicam um maior espaço amostral de sinal relevante para as análises, uma vez que o ruído (autofluorescência), terá valores baixos quando comparados as condições experimentais testadas.

O próximo critério de escolha foi a frequência de colônias positivas apresentados no Gráfico 3-1. Apesar de tdTomato possuir alta relação sinal/ruído (~2,3), as versões de plasmídeo com peptídeo sinal apresentaram baixa frequência de colônias positivas. Assim, essa característica reduziria o poder de comparação entre peptídeos sinais, ou aumentariam o número de etapas para alcançar um número de colônias positivas para os experimentos de secreção.

A baixa frequência de colônias positivas com as construções com peptídeo sinal com tdTomato pode estar ligada a processos de glicosilação pois, esta PF é uma derivação da Ds-red, originada por trocas de alguns aminoácidos e a união de duas sequências codificadoras por um conector peptídico (75). Uma análise *in silico* da sequência de tdTomato apresentou quatro regiões de possível O-glicosilação exatamente no conector peptídico, nas posições 232, 233, 235 e 238 utilizando NetOGlyc 4.0 Server (83). Esse conector deve permitir a dimerização das subunidades, ou há inibição da fluorescência. Contudo, seguindo essa linha de raciocínio, cepas positivas não poderiam sofrer glicosilação para o sucesso da fluorescência, ou a glicosilação teria que ocorrer em uma frequência menor. A hipótese de knockouts de genes envolvidos com o processo de glicosilação foi considerada. No entanto, o processo de transformação nuclear aplicado no presente trabalho envolve a inserção do vetor de expressão em regiões não direcionadas do genoma nuclear e, a presença de 24 cepas secretoras de tdTomato (24/188, 12,8%) positivas não corrobora para essa hipótese. O genoma nuclear de *C. reinhardtii* possui 121 Mb (121 milhões de pares de base), com uma densidade de 149 genes/Mbp (84), a chance de inserção com *knockout* de genes relacionados a glicosilação é algumas ordens de magnitude inferior a frequência de positivos encontrados para essa PF. Além disso, O-glicosilações são encontradas normalmente em células de mamífero e a sua formação em células de *C. reinhardtii* não é esperada, apesar de pouca disponibilidade de informação de processos de glicosilação nessa célula. Porém, apesar de inesperadas, não seriam únicas para células de não-mamíferos, uma vez que foi demonstrado presença dessas ligações glicosídicas em proteínas de plantas (85). Apesar de intrigante a elucidação desse resultado não foi explorada até o momento. No entanto, destaca-se que uma vez confirmada essa hipótese, tdTomato pode ser utilizada como

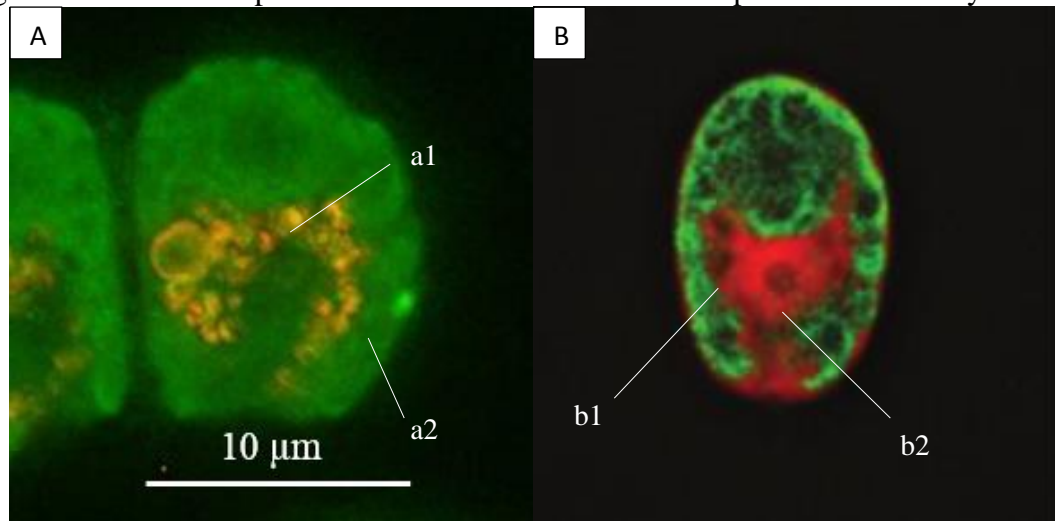
sonda para estudos de glicosilação em *C. reinhardtii*. Alguns experimentos podem contribuir para elucidar esses resultados, como *dot blot* do sobrenadante de colônias transformadas com os vetores contendo tdTomato. Esse experimento poderia identificar colônias que secretam tdTomato em sua forma inativa e que não foram identificadas no *screening* utilizando fluorescência como identificador. Outra possibilidade é o uso de inibidores de O-glicosilação, como BADGP, no momento da transformação ou durante experimentos de expressão dessas PFs (86).

Apenas cOFP e mCherry preencheram todos os critérios descritos anteriormente: não apresentaram interferência nas medidas de fluorescência, tiveram alta relação sinal/ruído (~4.3 e ~2.35, respectivamente) e frequência de colônias positivas (86% e 82%, respectivamente). A escolha da mCherry foi definida pela disponibilidade de anticorpos para experimentos de *western blot*, que permitiriam a identificação dessas proteínas no sobrenadante. A identificação por *western blot* possibilita complementar o estudo de secreção dessa PF, por uma técnica com princípio de detecção diferente, complementando a informação obtida para essa PF.

2.3.2. MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA

Colônias de pJP22mCherry foram cultivadas em meio TAP até o fim da fase log e submetidas a análise de microscopia de fluorescência para observar o padrão de compartimentalização (Fotografia 2-1). O padrão observado é compatível com o esperado para a via secretória de proteínas pois, a fluorescência da mCherry encontra-se compartimentalizada em vesículas supostamente relacionadas com a via de secreção.

Fotografia 2-1: Microscopia de fluorescência *C. reinhardtii* expressando mCherry.

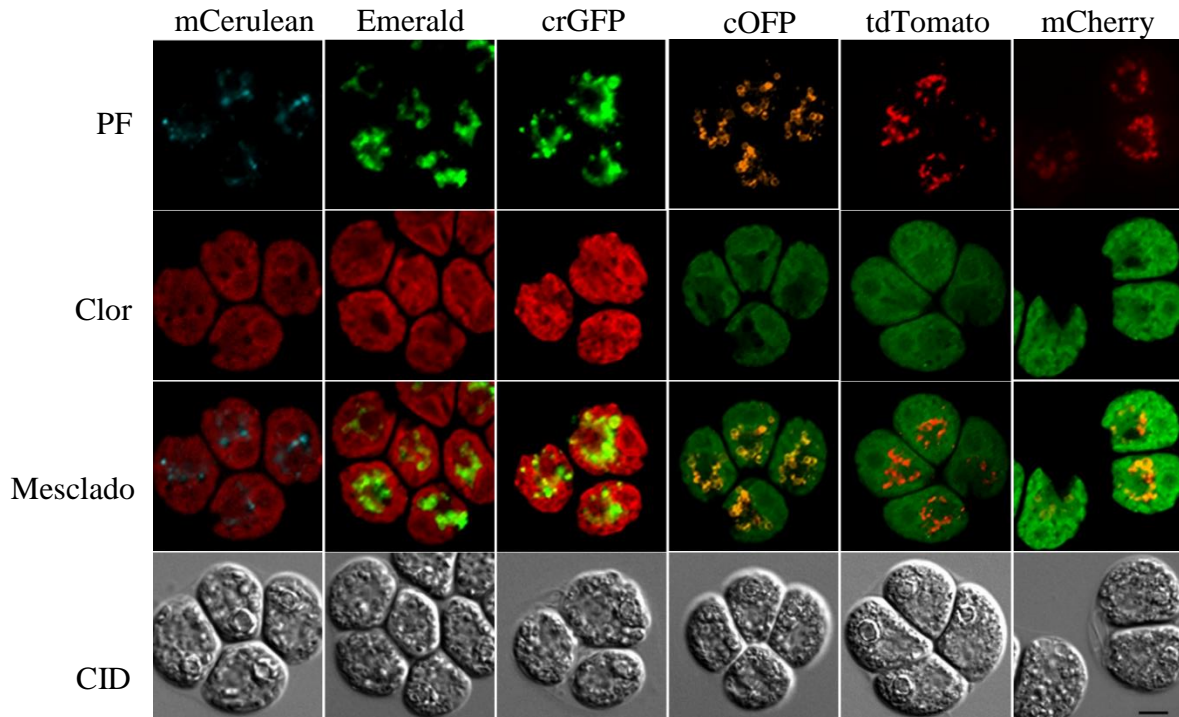


Nota: **A** – Imagem gerada pela sobreposição da fluorescência de clorofila (verde) e fluorescência de mCherry em vermelho da célula transformada com plasmídeo contendo peptídeo sinal (pJP22mCherry). O padrão de fluorescência de clorofila corresponde com o do cloroplasto. **a1** – Eyespot *C. reinhardtii*. **a2** – Vesículas de secreção. **B** – Imagem gerada pela sobreposição de fluorescência de clorofila (verde) e fluorescência de mCherry (vermelho) de células transformadas com a construção sem peptídeo de sinal. **b1** – Espaço sem fluorescência ocupado teoricamente por organelas e vesículas. **b2** – Espaço sem fluorescência onde está localizado o núcleo. Fonte: (A) Autor e (B) modificado de Rasala et al. (77).

A Fotografia 2-1 permite a comparação entre a distribuição da fluorescência intracelularmente para as cepas com construções contendo peptídeo sinal (Fotografia 2-1A) e sem o peptídeo sinal (Fotografia 2-1B). A ausência de compartimentalização na Fotografia 2-1B é evidente o que permite a conclusão de compartimentalização para as construções com peptídeo sinal. Além disso, nesta imagem observam-se estruturas brilhantes como o cloroplasto (Fotografia 3-1A) e o *eyespot* (Fotografia 2-1A-a2). Na Fotografia 3-1B, destaca-se a posição onde está o núcleo (circunferência escura no centro do citoplasma), seguido de um halo brilhante com pontos escuros (Fotografia 2-1B-b2). Esses pontos escuros, são as vesículas de secreção sem fluorescência nessa imagem devido a ausência de PF nesse compartimento (Fotografia 2-1B - b1).

Para avaliar o padrão de compartimentalização promovido pelo peptídeo sinal (ARS1) com as outras PFs, cepas com construções pJP22 foram submetidas a mesma análise de microscopia de fluorescência (Fotografia 2-2).

Fotografia 2-2: Microscopia de fluorescência em células vivas de cepas expressando proteínas fluorescentes.



Nota: As células foram plaqueadas em pequenas camadas de agarose com meio de cultivo e submetidas a microscopia de fluorescência confocal. As imagens foram realizadas com os filtros ótimos para cada PF. Imagens da autofluorescência do cloroplasto para a célula selvagem foram adquiridas, porém só foram observáveis com aumento no tempo de exposição da fotografia. Não apresentaram vacúolos brilhantes. **PF** – proteína fluorescente. **Clor** – fluorescência de clorofila. **Mesclado** – Superposição da imagem de PF com a de clorofila. **CID** -contraste de interferência diferencial. Barra de escala = 5µm.

Fonte: Autor

No experimento conduzido com as cepas de pJP22 foi possível observar o mesmo padrão de compartimentalização para todas as PFs, exceto para a mTagBFP. No momento do experimento não foi possível identificar células com mTagBFP compartimentalizada, acredita-se que a presença de autofluorescência mais intensa para essa região do espectro comprometeu a aquisição das imagens. De fato, nos dados de leitor de placa de fluorescência, a autofluorescência das células, nessa região, foi a maior observada para as PFs testadas (Gráfico 2-2), o que corrobora com a conclusão da não elegibilidade da mTagBFP para experimentos de secreção em *C. reinhardtii*.

2.4. CONCLUSÃO

As PFs testadas puderam ser secretadas em uma cepa com parede íntegra de *C. reinhardtii* (CC1690), independentemente da sua estrutura terciária e quaternária. Ressalta-se que as PFs monoméricas, diméricas, pseudomonoméricas e tetraméricas foram secretadas em

suas formas ativas, de acordo com os dados de fluorescência. Porém, as PFs azuis apresentam interferência nas medidas devido a presença de pigmentos celulares com propriedades de absorção e fluorescência nessa região do espectro. As proteínas verdes apresentaram menos interferência, mas possuíam baixa relação sinal ruído quando comparado com as proteínas vermelhas entre as construções com e sem peptídeo sinal.

tdTomato apesar de ser secretável em sua forma ativa e possuir auto valores de brilho de fluorescência, gerou uma menor quantidade de colônias positivas nas construções com peptídeo sinal. Essa observação experimental, deve ser estudada mais a fundo, pois uma das possibilidades é a ocorrência de O-glicosilação no peptídeo de ligação das duas porções monoméricas que inibiria a fluorescência dessa molécula quando presente. Essa característica, apesar de detrimental para estudos de secreção, torna tdTomato uma ótima ferramenta para estudos de glicosilação em microalgas, campo ainda carente nesse sistema de expressão de proteínas.

cOFP apresentou um dos melhores resultados de secreção, para todos os parâmetros avaliados e é uma excelente ferramenta para esse tipo de estudo. O desenvolvimento de um anticorpo para permitir experimentos de *western blot* ou a adição de tags permitirá o uso dessa PF para estudos de secreção. Por fim, mCherry apresentou um dos melhores resultados de secreção e possui reatividade com anticorpo anti-RFP o que permitiu avaliações de secreção por *western blot* no próximo Capítulo. Experimentos cruzados (técnicas diferentes para mesma finalidade) permitem a confirmação de hipóteses e resultados, aumentando a robustez dos dados encontrados.

Portanto, recomenda-se o uso de PFs, fotoativas na região do laranja e vermelho, com a ressalva de PFs na região próxima ao infravermelho, que poderão apresentar interferências em suas medidas, para *Chlamydomonas reinhardtii*. Além disso, recomenda-se o uso de PFs em estratégias experimentais que permitam o uso de técnicas complementares de confirmação como *western blot*.

3. CAPÍTULO – AVALIAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PEPTÍDEOS SINAIS

3.1. INTRODUÇÃO

Peptídeos sinais são sequências ubíquas encontradas em proteínas e que sinalizam para a translocação do processo de tradução para o lúmen do retículo endoplasmático em eucariotos e a translocação através da membrana citoplasmática em procariotos. Presentes na porção N-terminal de proteínas, os peptídeos sinais são degenerados e altamente variáveis em sua composição e tamanho (15-50 aminoácidos) mas, geralmente são compostos de uma α -hélice hidrofóbica em seu núcleo (6-15 aminoácidos) (87,88).

Chlamydomonas reinhardtii, como muitos outros organismos secreta, diversas proteínas para o seu meio extracelular (89), e os peptídeos sinais dessas proteínas foram explorados para conduzir a secreção de proteínas heterólogas em células recombinantes, como o peptídeo sinal de ARS1 (Arilsulfatase 1) e CAH1 (Carbonic Anydrase 1) (29,90). Porém, a secreção de proteínas heterólogas também pode ser promovida por peptídeos sinais ortólogos a *C. reinhardtii* de reinos diferentes, como o peptídeo sinal da enzima luciferase de *Gaussia princeps* (90). Apesar do sucesso na secreção de proteínas heterólogas utilizando peptídeos sinais, existe ainda na literatura alguns peptídeos sinais provenientes de espécies correlacionadas que não foram avaliados em sua capacidade de conduzir a secreção de proteínas heterólogas. Por exemplo, os peptídeos sinais de quatro proteínas de ligação ao gelo (IBP 1-4) de *Chlamydomonas* sp. isolada no Ártico, apesar de promoverem a secreção de sua proteínas nativas, não foram avaliados como peptídeos sinais para a secreção de proteínas heterólogas em *C. reinhardtii* (91). Por outro lado, peptídeos sinais de proteínas não secretadas também possuem potencial para a secreção de proteínas, como a BiP (proteína de ligação), proteína relacionada com o atividade de enovelamento e montagem de outras proteínas no retículo endoplasmático (RE) (92). A não secreção dessa proteína está relacionada à presença de outro sinal na porção C-terminal (KDEL), que sinaliza para a permanência da proteína no retículo endoplasmático. No entanto, na ausência do sinal de permanência no retículo endoplasmático (KDEL), proteínas conjugadas ao peptídeo sinal de BiP são secretadas. (93).

Apesar da possível diversidade de proteínas secretadas em *C. reinhardtii*, necessárias para cumprir atividades metabólicas estruturais e de sobrevivência (e.g. constituir a parede celular e captura de carbono), pouco se sabe sobre elas e os seus peptídeos sinais. Embora exista estudo da diversidade de proteínas secretadas em *C. reinhardtii* por abordagem de proteômica

(89), a comparação da eficiência de secreção de proteínas heterólogas por peptídeo sinais ainda não foi reportada.

Sistemas eficientes de secreção podem contribuir para contornar algumas desvantagens de sistemas baseados na expressão intracelular de proteínas em microalgas. Em geral, estas desvantagens estão associadas ao processo de lise celular para recuperar a proteínas de interesse, pois comprometem as etapas de purificação subsequentes devido ao alto conteúdo de compostos fenólicos e pigmentos liberados (94). Portanto, sistemas eficientes de secreção são desejáveis, permitindo a secreção do produto de interesse para uma matriz de baixa complexidade como o meio de cultivo de microalgas.

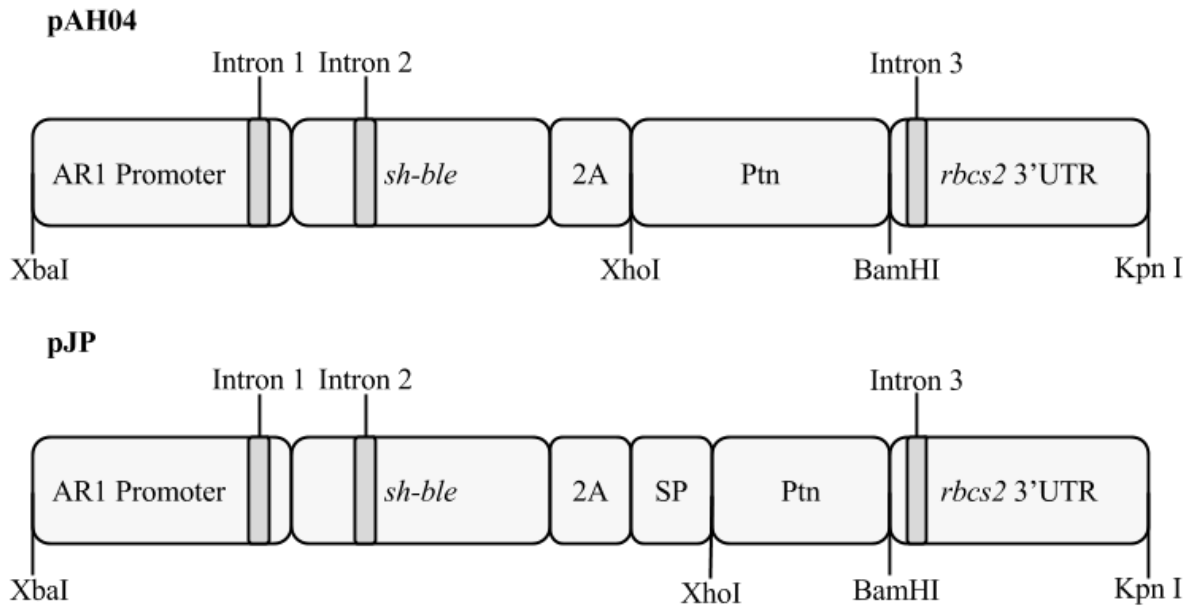
Dado a importância desses peptídeos sinais para sistemas de expressão, e a infância de estudos direcionados a identificar peptídeos sinais em *C. reinhardtii*, alternativas como algoritmos preditores se tornam atraentes. Portanto, utilizando um bando de dados de proteínas de *C. reinhardtii* nesses algoritmos preditores é possível identificar possíveis peptídeos sinais. Atualmente, vários preditores estão disponíveis, como por exemplo: SignalP, PrediSi, SPEPLip, Signal-CF, Signal-3L e Signal-BLAST (95). No entanto, um estudo comparativo realizado em 2011 apresentou o SignalP 4.0 como melhor método preditor (95). No presente trabalho, SignalP 4.0 foi utilizado para identificar sequências de peptídeos sinais de *C. reinhardtii* presentes no banco de dados de proteínas dessa microalga. Os peptídeos sinais identificados por análise *in silico* foram testados e comparados quanto sua eficiência de secreção, em relação aos peptídeos sinais anteriormente descritos na literatura. Sabendo do potencial deste método para identificação de novos peptídeos sinais e da ausência de estudos comparando a eficiência dos mesmos em *C. reinhardtii*, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de secreção de seis peptídeos sinais identificados *in silico* e compará-los com quatro peptídeos sinais previamente descritos na literatura (ARS1, CAH1, BiP e IBP1).

3.1. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1. CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS

Os plasmídeos foram construídos no pBluescript II (pBSII) e as modificações foram feitas nos vetores de expressão gerados por Beth Rasala e, posteriormente, esses vetores foram modificados por Austin Hallgreen (Prefixo pAH04). Essa construção foi utilizada como controle para os experimentos de secreção de proteínas. As sequências de peptídeos sinais foram inseridas como indicado no vetor com prefixo pJP no Esquema 3-1.

Esquema 3-1: Vetores de expressão com e sem peptídeo sinal.



Nota: **AR1 Promoter**: Promotor quimérico contendo os promotores *hsp70A/rbc2* com o primeiro intron de *rbc2*. **Intron**: introns da *rbc2*, números indicam a ordem no gene original. **sh-ble**: marcador de resistência a bleomicina. **2A**: Peptídeo de autoclivagem do vírus FMDV (Food and Mouth Disease Virus). **Ptn**: Proteína de interesse a ser expressa. **rbc2 3'UTR**: Região não traduzida da subunidade pequena da RuBisCO 2. **SP**: peptídeo sinal.
Fonte: Autor

Em resumo, o vetor de expressão (pAH04) possui um promotor nuclear P_{AR1} que é um promotor quimérico contendo partes do promotor *hsp70A/rbc2* e, possui também o primeiro intron da *rbc2* inserido por reação de SLICE (76). A sequência 2A foi adicionada ao fim do *sh-ble* por PCR, usando um primer reverso longo codificado para a sequência códon otimizada da sequência 2A. *sh-Ble-2A* foi clonado em seguida de P_{AR1} como um fragmento de NdeI/XhoI. A região *rbc2* 3'UTR foi inserida como um fragmento de XhoI/BamHI. O segundo e terceiro intron de *rbc2* foram inseridos na posição 171 da sequência da *sh-ble* (Intron 2) e o intron 3 foi inserido na posição 19 da sequência de *rbc2* 3'UTR, presente no fim da construção, por meio de reações de SLICE. As proteínas de interesse a serem expressas foram adicionadas usando os sítios de restrição XhoI/BamHI, a menos que descrito de outra forma. As sequências dos peptídeos sinais foram inseridas usando reações de SLICE na construção de pAH04. Plasmídeos pAH04 cortados com XhoI foram incubados com amplicons codificando para os diferentes peptídeos sinais de acordo com o plasmídeo sendo construído. Cada amplicon continha a sequência de interesse, um *Multiple cloning site* (MCS) com os sítios XhoI, NdeI e BamHI, um códon de parada e nas regiões flangeadoras, homologia de 15-25 pares de base com a porção 3' da sequência de *sh-ble* e 5' da *rbc2* 3'UTR. Os vetores com peptídeos sinais são nomeados com o prefixo pJP. As sequências de proteínas fluorescentes estavam disponíveis

no laboratório, e estão descritos em outro lugar (77) e, foram inseridas por meio de reações de ligação com T4 ligase e fragmentos de vetores cortados com XhoI e BamHI.

Peptídeos sinais foram escolhidos a partir de busca na literatura.

Além destes peptídeos sinais foram selecionados outros a partir das sequências de proteínas disponíveis no banco de dados da JGI (DOE Joint Genome Institute, Walnut Creek, CA). Então, estas sequências de proteínas foram submetidas ao programa SignalP 4.0 para verificar a presença de peptídeos sinais. O programa SignalP 4.0 está disponível *online* pelo centro de análises de sequências biológicas da Universidade Técnica da Dinamarca (DTU – Dinamarck Technic University). Este programa utiliza um método baseado em redes neurais para encontrar possíveis peptídeos sinais em um conjunto de sequências de proteínas (95). Após análise pelo programa, mais de 8000 sequências hipotéticas foram identificadas. Para seleção das sequências, foi construída uma árvore filogenética por meio do programa Unipro UGENE (96) e, selecionadas seis sequências de diferentes regiões da árvore filogenética. Esta seleção foi realizada no intuito de avaliar a capacidade de gerar peptídeos sinais verdadeiros em *C. reinhardtii* e a variabilidade da eficiência desses peptídeos sinais em promoverem secreção.

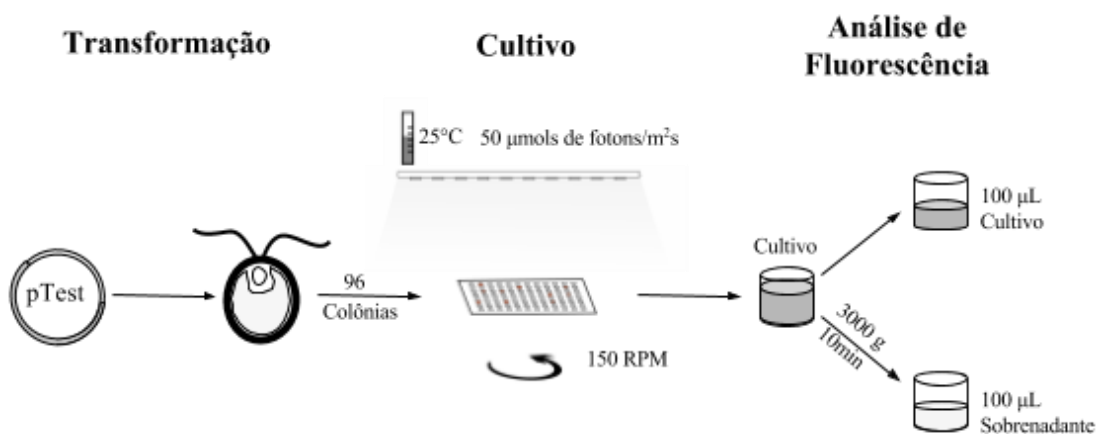
3.1.1. TRANSFORMAÇÕES DE *Chlamydomonas reinhardtii* E CONDIÇÕES DE CULTIVO

A cepa selvagem com parede CC1690 de *C. reinhardtii* foi cultivada em meio TAP (78) a 25°C com agitação constante a 150 RPM em agitador rotativo sobre iluminação constante de $50 \pm 10 \mu\text{mol}$ de fótons/ m^2s até alcançarem uma concentração entre $3\text{-}6 \times 10^6$ células/mL em meio TAP. As células foram centrifugadas e ressuspensas em meio TAP suplementado com 40 mM de sacarose para uma concentração celular final de $3\text{-}6 \times 10^8$ células/mL. Em seguida, 250 μL de células ressuspensas foram incubadas com 300-1000 ng de plasmídeos digeridos com XbaI e KpnI por 5-10 min em gelo, dentro de cubetas de eletroporação de 4 mm. Um pulso exponencial de 2000V/cm foi aplicado utilizando um eletroporador GenePulser XCellTM (BioRad, Hercules, CA). A capacitância foi ajustada para 25 mF, sem restrição de resistência. As células foram recuperadas por 18 h em 10 mL de TAP-40mM sacarose e em seguida plaqueados em duas placas de TAP ágar, suplementados com zeocina nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.1.2. EXPERIMENTOS EM MICROPLACA COM ANÁLISE EM LEITOR DE MICROPLACAS

Para avaliar as construções, colônias provenientes das placas de seleção foram analisadas seguindo o fluxo representado no Esquema 3-2. As colônias foram coletadas e cultivadas em meio TAP até o final da fase log, em placas *Deep-well* (Corning Axygen®, N °: PDW500CS, Thermo Fisher Scientific Inc.). Meio TAP foi adicionado em cada poço em um volume de 400 μL , com agitação constante a 100-150 RPM em agitador rotativo sob iluminação constante ($50 \pm 10 \mu\text{mol}$ s de fótons/ m^2s) durante 5 dias. Em seguida, 100 μL de células foram transferidas para poços de uma placa preta de 96 poços (Corning Costar, Tewksbury, MA, EUA) e a fluorescência foi lida utilizando um leitor de placas Infinite® M200 PRO (Tecan, Männedorf, Suíça). O sobrenadante foi obtido centrifugando a 3000 g durante 10 min a placa *Deep-well* e, a fluorescência de 100 μL de cada poço foi analisado como descrito acima.

Esquema 3-2: Fluxo do experimento de avaliação de fluorescência. Colônias resistentes a zeocina foram cultivadas em microplacas sobre iluminação contínua.



Nota: Fluorescência do cultivo e do sobrenadante foram medidos usando o Infinite® M200 PRO em placas de 96 poços. **pTest:** Plasmídeo a ser testado.

Fonte: Autor

As leituras de fluorescência com a intensidade de onda de excitação / emissão estão indicadas na Tabela 2-1 e, foram adquiridas por meio de ajustamento de ganho fixo para cada proteína fluorescente. O meio TAP foi utilizado como branco. Os sinais de fluorescência foram normalizados pela fluorescência da clorofila (excitação 440/9 nm, emissão 680/20 nm, ganho 100). Os sinais de autofluorescência da cepa selvagem CC1690 normalizados foram utilizados como controle negativo, frente a todas as medidas de fluorescência para as construções.

3.1.3. WESTERN BLOT

As amostras de proteínas totais solúveis (PTS) e sobrenadante foram desnaturadas pela adição de tampão SDS-PAGE (Laemmli) com β -mercaptoetanol seguido de incubação a 95 °C durante 5 min. As proteínas foram separadas em géis SDS-PAGE a 12% a 120-150 volts e transferidas para membrana de nitrocelulose a 200 mA durante 1,0 h. Após bloqueio com 5% de leite, as membranas das amostras foram marcadas com um anticorpo monoclonal de rato anti-RFP, lavadas com TBS-T, uma solução salina tamponada com tris contendo Tween 20 (TBS-T), nas concentrações de 20 mM Tris, pH 7,5 NaCl 150 mM e Tween 20 a 0,1%. A membrana foi lavada 3 vezes durante 10 min e incubadas com anti-rato conjugado com fosfatase alcalina. Revelação foi realizada com solução tampão (100 mM de Tris-HCl, pH 9,5; 100 mM de NaCl; 5 mM de MgCl₂) contendo 80 μ l de solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP 20 mg/mL em dimetilformamida a 100%.) e 60 μ l de solução de Nitro azul tetrazólio (NBT 50 mg/mL em dimetilformamida a 70%.) por 10 ml e misturado antes do uso para cada coloração.

3.1.4. COLORAÇÃO POR COMASSIE BLUE

Os géis de SDS-PAGE foram lavados 3 vezes com água destilada para remover SDS. Em seguida foi realizada coloração com solução de Coomassie coloidal conforme descrito por Kang et al. (2002) [41]. O padrão de peso molecular utilizado foi o Color Prestained Protein Standard, Broad Range (New England Biolabs, Ipswich, MA), em 3 μ L por faixa, a menos que indicado o contrário. Amostras do sobrenadante foram concentradas antes de injetadas no gel de separação. As amostras foram concentradas utilizando filtros Amicon centrifugal filter Ultra-4, com um corte de 10 kDa. Um volume de 4 mL de sobrenadante, previamente centrifugado e filtrado com filtro 0,22 μ m foi submetido a filtração nos filtros amicon, através de centrifugação a 4000 x g, por 20 min. A centrifugação foi repetida até um volume aproximado de 130 μ L fosse alcançado para todas as amostras.

3.1.5. PROTEÍNA SOLÚVEL TOTAL

A quantificação de proteínas solúveis totais foi realizada pelo método de Lowry, utilizando o kit DCTM Protein Assay, Bio-rad (Hercules, CA), seguindo as instruções do fabricante. Uma curva de calibração foi realizada utilizando BSA (*Bovine Serum albumin*) no meio de cultivo TAP e os dados de absorbância após a reação utilizados para inferir

concentração de proteínas solúveis na amostra. As medidas foram realizadas em leitor de placas Infinite® M200 PRO (Tecan, Männedorf, Suíça) em placas Corning® 96 Well Clear Flat Bottom.

3.1.6. ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram feitas no programa Statistica 10. Foi considerado estatisticamente significativo valor de p menores ou iguais a 0,05.

3.1.7. SOFTWARES

Os seguintes softwares foram utilizados no desenvolvimento desse trabalho:

- ImageJ criado por Wayne Rasband do NIH (National Institute of Health) (79), usado nas análises de imagens de microscopia;
- SignalP 4.0 server criado por Thomas Nordahl Petersen, Søren Brunak, Gunnar von Heijne & Henrik Nielsen, usado para a predição de peptídeos sinais (95);
- NetPhos Server criado por Blom, N., Gammeltoft, S., and Brunak, S., usado para a predição de fosforilação em serina, treonina e tirosin (97);
- NetOGlyc criado por Steentoft C et al, usado para a predição de O-glicosilações (83);

3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1. SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS SINAIS

Apesar de ser um organismo fotossintetizante modelo, o número de peptídeos sinais descritos e testados em *C. reinhardtii* está longe do total existente no seu genoma. A busca por peptídeos sinais utilizando SignalP 4.0, identificou mais de 8000 possíveis peptídeos sinais. Assim, o estudo de peptídeos sinais em *C. reinhardtii* é uma excelente oportunidade para o desenvolvimento de novos e mais eficientes peptídeos sinais para a secreção de proteínas com elevado interesse biotecnológico. Em busca na literatura, foram encontradas oito possíveis sequências de peptídeos sinais: BiP1, BiP2, ARS1, CAH1, CAH2, IBP1, IBP2, IBP3 e IBP4. BiP são proteínas membro da família das chaperonas HSP70 que residem dentro do lúmen do RE (98). Um representante de cada categoria de peptídeos sinal foi escolhido, resultando na escolha de ARS1, BiP, CAH1 e IBP1 (29,90–92). ARS1 é uma sulfatase secretada em condições de privação de sulfato (99). CAH1 é a Anidrase carbônica, enzima secretada em condições de baixa concentração de CO₂ (100). IBP são proteínas que se ligam a cristais de

gelo, secretadas para proteger a parede e membrana celular e foram identificadas em uma *Chlamydomonas sp.* psicrófila (91). Um representante de cada peptídeo sinal descrito na literatura foi escolhido para ser estudado (BiP1, ARS1, CAH1 e IBP1).

Além desses quatro peptídeos sinais escolhidos, seis novos peptídeos sinais foram selecionados entre 8000 novos possíveis peptídeos sinais obtidos por análise *in silico*. As informações disponíveis sobre as proteínas selecionadas são resultantes de anotação automática do banco de dados. Essa anotação é feita por comparação com outras proteínas descritas no NCBI. A Tabela 3-1 apresenta a lista de proteínas avaliadas em experimentos de secreção com as informações encontradas.

Tabela 3-1: Lista de peptídeos sinais usados em experimentos de secreção.

Código/ Plasmídeo	Sequência	Informação disponível
SP1/pJP26	MAQWKA AVLLLALACASY	Binding protein (BiP1)
SP2/pJP22	MHARKMGALAVLAVACLA AVASVAHA	Arilsulfatase (ARS1)
SP3/pJP28	MARTGALLLVALALAGCAQA	Anidrase Carbônica (CAH1)
SP4/pJP29	MPSSMKLFAALLIACMAQT SMA	Proteína que se liga ao gelo (IBP1)
SP5/pJP30	MRRAIALGVGLALLGLLLPGSLA	NCBI XP_001692042.1 <i>Proteína do tipo glicosidohidrolase</i>
SP6/pJP31	MPSTPVA AALRALLCASLLGSLHIARA	NCBI XP_001698879.1 Sulfotransferase [29% Desulfosporosinus orientis]
SP7/pJP32	MTLRLAQLALATLGVLLLVLAPMPALS	Proteína hipotética
SP8/pJP33	MARRLLLALALAAVLGLAHA	NCBI XP_001692811.1 Prolil 4-hidroxilase Predita, homólogo a subunidade alfa [<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>]
SP9/pJP34	MMSSLISSRVAALLPALQHASG	Proteína hipotética
SP10/pJP35	MRGHAA YTSATLLALLLVTLWTHSSA	NCBI XP_001697085.1 Quinase ativada por mitogênio [<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>]

*SP – peptídeo sinal

**pJP – plasmídeo com peptídeos sinais

Fonte: SP1/pJP26 por Nguyen et al. (124); SP2/pJP22 por Rasala et al. (28); SP3/pJP28 por Van e Spalding (132); SP4/pJP29 por Raymond et al. (123); SP5-SP10/pJP30-pJP35 autor.

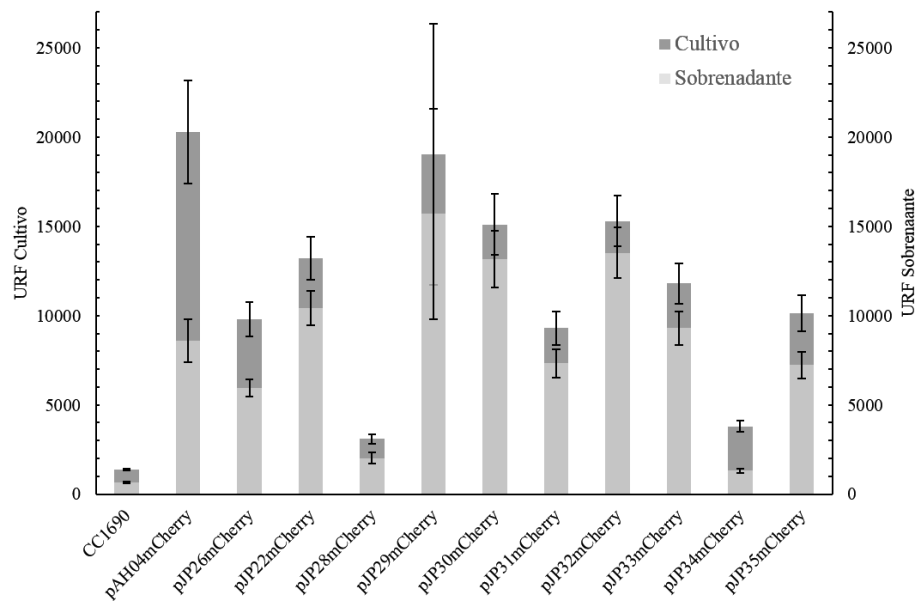
3.2.2. COMPARAÇÃO DE PEPTÍDEOS SINAIS

Após a definição da mCherry como a melhor proteína fluorescente (Capítulo 4) para os experimentos de secreção, os plasmídeos com os respectivos peptídeos sinais foram construídos. As transformações foram conduzidas com a mesma quantidade (500 ng) e relação de vetor por célula. Contudo, as construções com o peptídeo sinal CAH1 e IBP1 geraram 30 vezes menos colônias (aproximadamente 100 colônias por placa contra 3000 colônias por placa) quando comparadas as outras construções. Todas as construções possuíam o mesmo marcador de resistência sh-ble ligado à sequência da proteína expressa. Assim, sabendo que existe uma relação estequiométrica entre a resistência à zeocina e o nível de expressão (101), um número reduzido de colônias sugere um produto de proteína degradado a partir da construção ou

interferência da proteína traduzida na atividade da molécula de antibiótico. No entanto, como a única variação entre as construções foi o peptídeo sinal, este número reduzido de colônias deve estar associado ao peptídeo sinal. A fusão de domínios peptídicos podem influenciar a atividade de moléculas peptídicas, como observado para algumas proteínas fusionadas a proteínas fluorescentes (102). Portanto, o contexto em que cada componente de uma proteína fusionada se encontra é relevante e pode influenciar sua atividade, o que pode estar acontecendo para a construção com esses peptídeos sinais especificamente.

A análise dos resultados de secreção por fluorescência das construções avaliadas apontou dois peptídeos sinais como os melhores secretores, SP5/pJP30 e SP7/pJP32, ambos gerados pelo software SignalP 4.0 e, portanto, não descritos anteriormente na literatura. O peptídeo sinal da IBP1 também apresentou valores elevados de secreção para as colônias positivas, porém com alta taxa de colônias negativas (~91%). Os resultados estão resumidos no Gráfico 3-1.

Gráfico 3-1: Média de fluorescência de mCherry para cada construção no cultivo e no sobrenadante.



Nota: A barra mais escura representa o valor de fluorescência total médio observado para as colônias positivas. A barra mais clara representa o valor médio do sinal do sobrenadante das colônias positivas. CC1690 são as células selvagens não transformadas; pAH04mCherry são células com plasmídeo sem peptídeo sinal; demais plasmídeos possuem peptídeos sinais. pJP26/SP1 (BiPI), pJP22/SP2 (ARS1), pJP28/SP3 (CAH1), pJP29/SP4 (IBPI), pJP30/SP5 (Teórico), pJP31/SP6 (Teórico), pJP32/SP7 (Teórico), pJP33/SP8 (Teórico), pJP34/SP9 (Teórico) e pJP35/SP10 (Teórico). As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Autor

Entre os peptídeos sinais preditos pelo SignalP 4.0, apenas o SP9/pJP34 não apresentou capacidade de secreção. Portanto, de acordo com os resultados obtidos com a mCherry, a

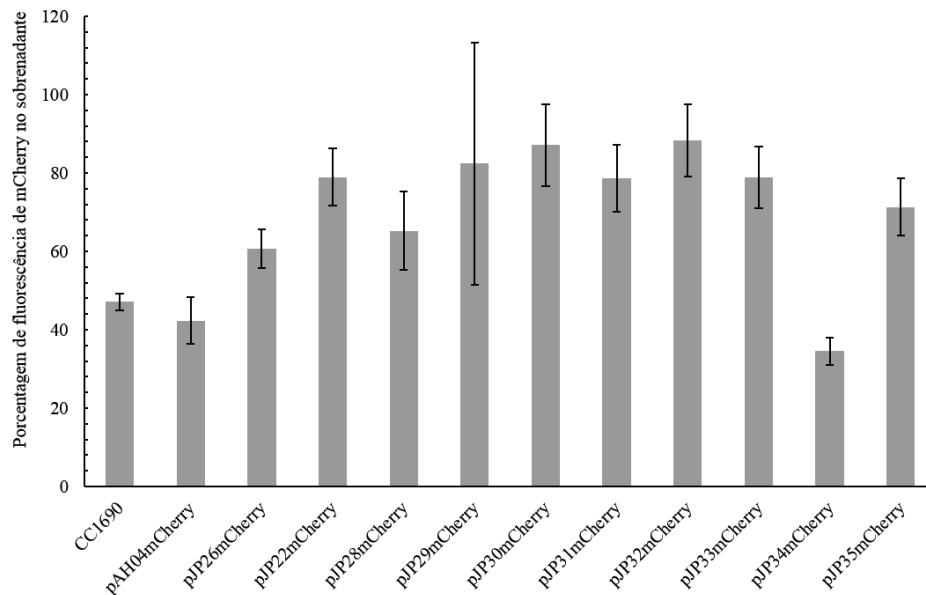
predição de peptídeos sinais pelo software SignalP4.0 apresentou uma taxa aproximada de 85% de sucesso. Esse valor está condizente com estudos de acurácia desses algoritmos, onde valores superiores a 80% foram encontrados (103).

A construção com pAH04 mCherry apresentou aproximadamente 40% do sinal de fluorescência no sobrenadante, porém as construções com peptídeo sinal apresentaram valores superiores a 60%, exceto para a construção pJP34mCherry como apresentado no Gráfico 3-2. A construção pAH04mCherry sem peptídeo sinal apresentou valores absolutos de fluorescência no sobrenadante, superior ao resultado de cinco peptídeos sinais, o que pode estar relacionado ao desenho do experimento. As placas de 96 foram cultivadas a 150 RPM, sobre iluminação constante, como descrito no Esquema 3-2. Para ser possível criar vortex nos poços de placa de 96 é preciso agitações em velocidades elevadas (~800RPM) e com diâmetro de órbita reduzidos (1-2mm) (24). O vórtex no cultivo é importante, pois permite ampla troca de nutrientes entre célula e meio, influenciando no crescimento celular. A troca reduzida de nutrientes pode favorecer processos líticos que levariam a liberação da mCherry para o sobrenadante. Esse efeito não ocorreu apenas nas células com pH04mCherry e, portanto, uma porção do sinal observado no sobrenadante das construções com peptídeo sinal pode estar associado a esse efeito. Porém, é possível determinar que houve o processo de secreção ao observar os valores relativos de fluorescência, em que construções com peptídeo sinal apresentaram uma média maior de proteína fluorescente secretada (Gráfico 3-2). A comparação do valor total de fluorescência obtido no cultivo, comparado com os encontrados no sobrenadante das construções permite concluir que as construções com peptídeos sinais apresentaram secreção.

Para verificar a capacidade de secreção de cada construção com mCherry, a colônia com maior sinal de fluorescência de mCherry de cada construção foi escolhida e cultivada em 50 mL de TAP. O sobrenadante e o material lisado dos cultivos de cada construção foram analisados quanto a fluorescência de mCherry e por *western blot*. Os resultados estão sumarizados nas Figura 3-1 e Figura 3.2.

A Figura 3-1 apresenta os resultados obtidos para o lisado celular das célula selvagem utilizada para recombinação e para os cultivos das células transformadas com as construções sendo avaliadas. Como esperado, o lisado da célula selvagem (CC1690) não apresentou bandas em análise de *western blot*. Além disso, os elevados valores de fluorescência para o lisado da cepa com pAH04mCherry correspondeu a bandas mais escuras no *western blot*. Esses resultados demonstraram boa complementariedade entre as duas técnicas, o que pode indicar baixa frequência de mCherry inativa.

Gráfico 3-2: Porcentagem média de fluorescência de mCherry no sobrenadante das colônias positivas para diferentes construções com e sem peptídeo sinal.

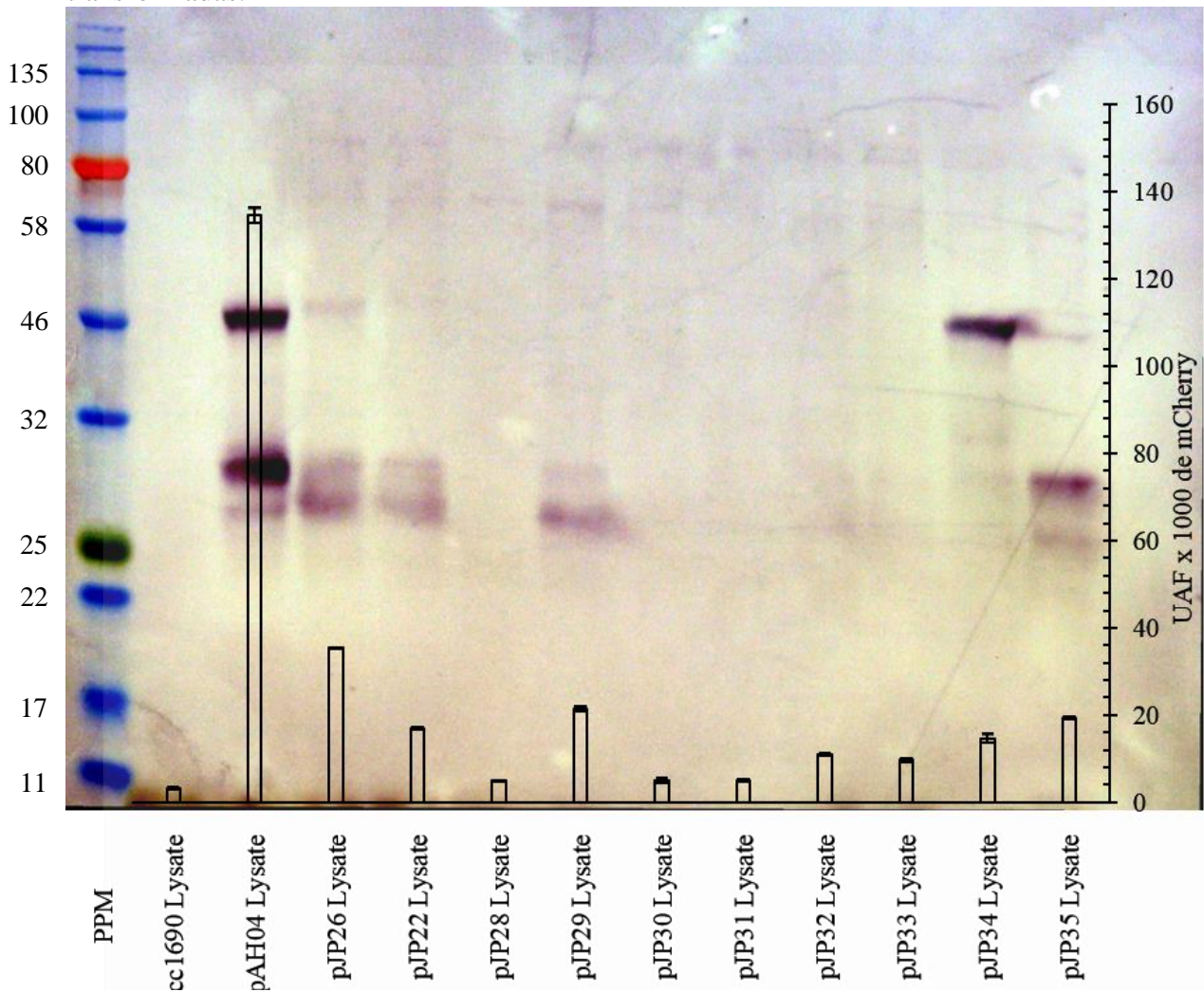


Nota: CC1690 são as células selvagens não transformadas; pAH04mCherry são as células com plasmídeo sem peptídeo sinal; demais plasmídeos possuem peptídeos sinais. pJP26/SP1 (BiPI), pJP22/SP2 (ARS1), pJP28/SP3 (CAH1), pJP29/SP4 (IBPI), pJP30/SP5 (Teórico), pJP31/SP6 (Teórico), pJP32/SP7 (Teórico), pJP33/SP8 (Teórico), pJP34/SP9 (Teórico) e pJP35/SP10 (Teórico). As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Autor

A mCherry possui um tamanho de 28,8 KDa, de acordo com as bandas reveladas no *western blot*, contudo, duas bandas são observáveis nessa região indicando a presença de duas formas da mCherry. A análise da imagem do *western blot*, utilizando o software ImageJ, indicou uma distância de aproximadamente 2,3 KDa entre as duas bandas. Possíveis modificações pós-traducionais foram avaliadas e, encontrou-se que um processo de fosforilação da mCherry poderia explicar a diferença entre as duas bandas (104) pois, 26 possíveis pontos de fosforilação foram preditos por Netphos-3.1. Cada grupo fosfato possui 94,9114 g/mol de massa e, a soma do peso desses resíduos implicaria em uma adição no peso da mCherry de 2,46 KDa. Não há outra evidência experimental para essa hipótese porém, o tratamento de material lisado com fosfatase, poderia evidenciar o processo de fosforilação da mCherry por deslocamento da banda no gel (105).

Figura 3-1: Análise de fluorescência e *western blot* do lisado celular da célula selvagem e transformadas.



Notas: Todas as faixas foram carregadas com a mesma quantidade de proteínas solúveis totais (PST = 60 µg). As posições das faixas de cada amostra estão alinhadas com a legenda do gráfico sobreposto a imagem da membrana. pJP26/SP1 (BiPI), pJP22/SP2 (ARS1), pJP28/SP3 (CAH1), pJP29/SP4 (IBPI), pJP30/SP5 (Teórico), pJP31/SP6 (Teórico), pJP32/SP7 (Teórico), pJP33/SP8 (Teórico), pJP34/SP9 (Teórico) e pJP35/SP10 (Teórico). **PPM** – Padrão de peso molecular em KDa. **UAF** – Unidades arbitrárias de fluorescência. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Autor

Além das bandas na região próxima a 28,8 KDa, a Figura 3-1 mostra uma banda um pouco superior a 46 KDa no lisado de pAHmCherry e SP9/pJP34mCherry. Provavelmente, essa banda é resultado de moléculas da mCherry fusionadas a sh-Ble e o peptídeo 2A pois, a somatória da massa dessas estruturas (sh-ble-2A-mCherry) implicaria em uma massa total de 44,3 KDa. É importante notar que há um mesmo deslocamento da massa aparente que foi observado entre a possível proteína em estado nativo e a possível forma fosforilada. Ainda, observa-se no lisado, construções com bandas próximas a 90 KDa. Essas bandas provavelmente são dímeros de mCherry ainda fusionadas com os peptídeos de autoclivagem e sh-ble. Sh-Ble

é uma molécula dimérica (106) que poderia propiciar essa dimerização. Contudo, condições normais de denaturação de SDS-PAGE deveriam levar a desoligomerização das proteínas presentes na amostra, seja pelo poder redutor de DTT ou β -mercaptoetanol, seja pela etapa de aquecimento antes do carregamento da amostra no gel, ou pelo próprio SDS. No entanto, resistência a desoligomerização é encontrada em outras proteínas (107) e, para algumas, o aumento na concentração de SDS leva monômeros formarem dímeros em SDS-PAGE (108). Portanto, o dímero da proteína fusionada sh-ble-2A-mCherry poderia ser mantido e ser revelado na membrana do *western blot*.

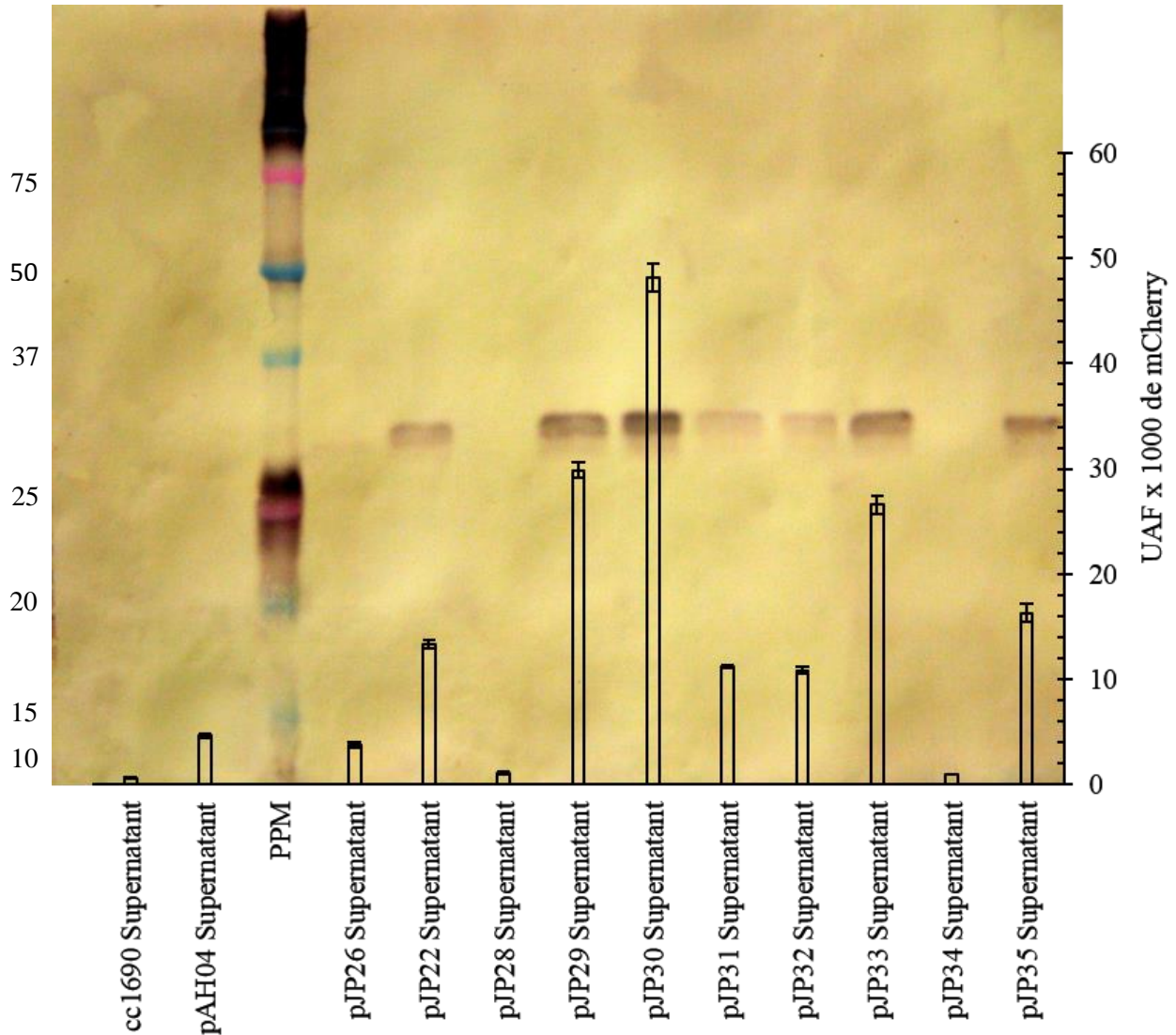
As amostras de sobrenadante também foram avaliadas por meio de leituras de fluorescência e *western blot*. Os resultados estão descritos na Figura 3.2. As amostras com um valor de fluorescência de mCherry superior a 2000 UAF, foram detectadas em amostras de sobrenadante por *western blot*. Os resultados de *western blot* do sobrenadante confirmam a presença de mCherry no sobrenadante e em conjunto com leituras de fluorescência confirmam a funcionalidade dos peptídeos de secreção. É possível correlacionar bandas mais fortes com um sinal de fluorescência mais intenso indicando que a maioria das proteínas secretadas são ativas.

Nenhuma banda foi detectada para os peptídeos sinais da CAH1 e SP9 no sobrenadante por *western blot*. No caso da CAH1, aparentemente a quantidade secretada está abaixo do limite de detecção da técnica de *western blot*, dado os valores de fluorescência medidos para essa construção. Porém, a fluorescência detectada no sobrenadante é superior e estatisticamente diferente ao controle selvagem, respectivamente médias de 1288 e 707 ($p=0,008$). No caso da SP9/pJP34, a ausência de banda no sobrenadante para SP9 foi compreendida analisando o resultado de *western blot* do lisado celular. Uma banda forte (~ 45 kDa), acima do tamanho normal de mCherry (~ 28 kDa), foi detectada indicando a não clivagem do peptídeo 2A. A inibição da clivagem, impediu o reconhecimento do peptídeo sinal pela partícula receptora de peptídeo sinal e, portanto, a transferência do produto de tradução para o RE e posterior secreção.

A concentração das amostras se demonstrou importante para observar a banda referente a mCherry em géis de SDS-PAGE, corados com comassie. Tanto os géis corados por Coomassie do lisado, quanto os do sobrenadante podem ser observados nas Fotografia 3-1 e Fotografia 3-2. Os géis de SDS-PAGE carregados com o material lisado e com o sobrenadante concentrado 30 vezes foram realizados e corados com Coomassie coloidal. Essa técnica de coloração permitiu a visualização das proteínas presentes na amostra e ter uma referência da complexidade do material proteico do lisado e do sobrenadante, dado a diversidade de proteínas nessas amostras. O carregamento direto de amostras do sobrenadante não resultaram na

detecção de mCherry no mesmo, porém as amostras concentradas 30 vezes antes da corrida de separação permitiram a identificação da banda referente a mCherry

Figura 3-2: Análise de fluorescência e *western blot* do sobrenadante celular da cepa selvagem e transformantes.



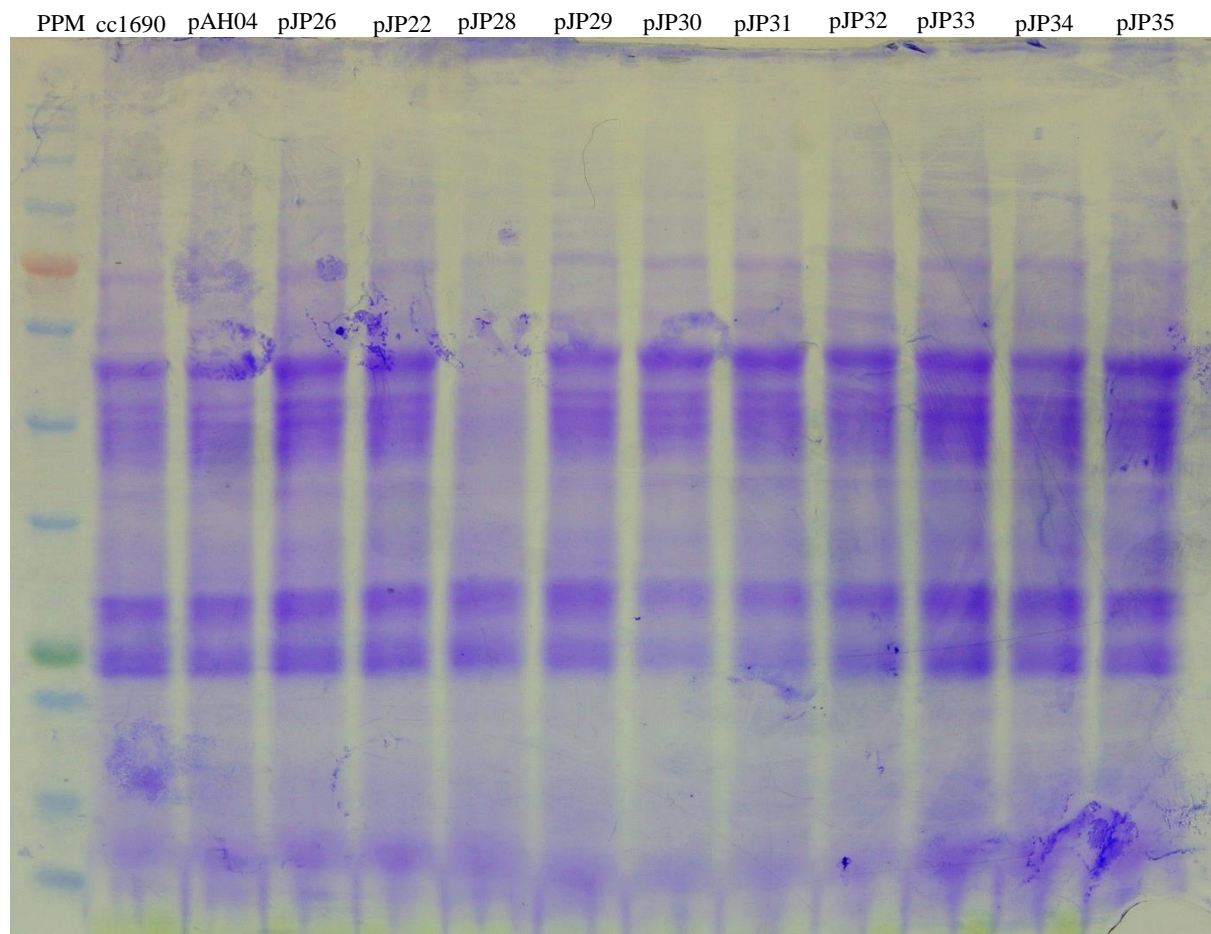
Nota: Todas as faixas foram carregadas com o mesmo volume de sobrenadante (30 μ L). As posições das faixas de cada amostra estão alinhadas com a legenda do gráfico sobreposto a imagem da membrana. pJP26/SP1 (BiPI), pJP22/SP2 (ARS1), pJP28/SP3 (CAH1), pJP29/SP4 (IBPI), pJP30/SP5 (Teórico), pJP31/SP6 (Teórico), pJP32/SP7 (Teórico), pJP33/SP8 (Teórico), pJP34/SP9 (Teórico) e pJP35/SP10 (Teórico). PPM – padrão de peso molecular, Precision Plus Protein™ Dual Color Standards. UAF – Unidades arbitrárias de fluorescência. C+ - Lisado celular de pAH04mCherry. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Autor

Técnicas de coloração como Comassie blue permitem observar a complexidade das proteínas dentro de *C. reinhardtii* e evidenciam a importância das estratégias de secreção para a produção de proteínas heterólogas com elevados graus de pureza. De forma genérica, quanto mais simples for a matriz em que se encontra a proteína, menor o custo de purificação nos

processos a jusante. No caso de microalgas, além das proteínas intracelulares, há outros contaminantes comuns que são os pigmentos fotossintéticos. Proteínas expressas em plantas apresentam o mesmo problema, em que esses pigmentos podem reduzir a eficiência dos processos a jusante (109,110). O gel de amostras do lisado apresenta uma variedade de proteínas que sobrepõem a banda relacionada a mCherry. De fato, nem para a amostra com maior concentração de mCherry (pHA04mCherry) é possível discernir a banda relacionada a essa proteína fluorescente.

Fotografia 3-1: SDS-PAGE de amostras de lisado com o mesmo conteúdo proteico por poço de cepas expressando mCherry em diferentes construções



Nota: **CC1690** - células selvagem não transformadas. **pAH04** - Construção sem peptídeo sinal. **pJP26** - construção com SP1 (BiPI). **pJP22** - construção com SP2 (ARS1). **pJP28** - construção com SP3 (CAH1). **pJP29** - construção com SP4 (IBP1). **pJP30** - construção com SP5 (teórico). **pJP31** - construir com SP6 (teórico). **pJP32** - construção com SP7 (teórico). **pJP33** - construção com SP8 (teórico). **pJP34** - construção com SP9 (teórico). **pJP35** - construção com SP10 (teórico). **PPM** - Padrão de peso molecular.

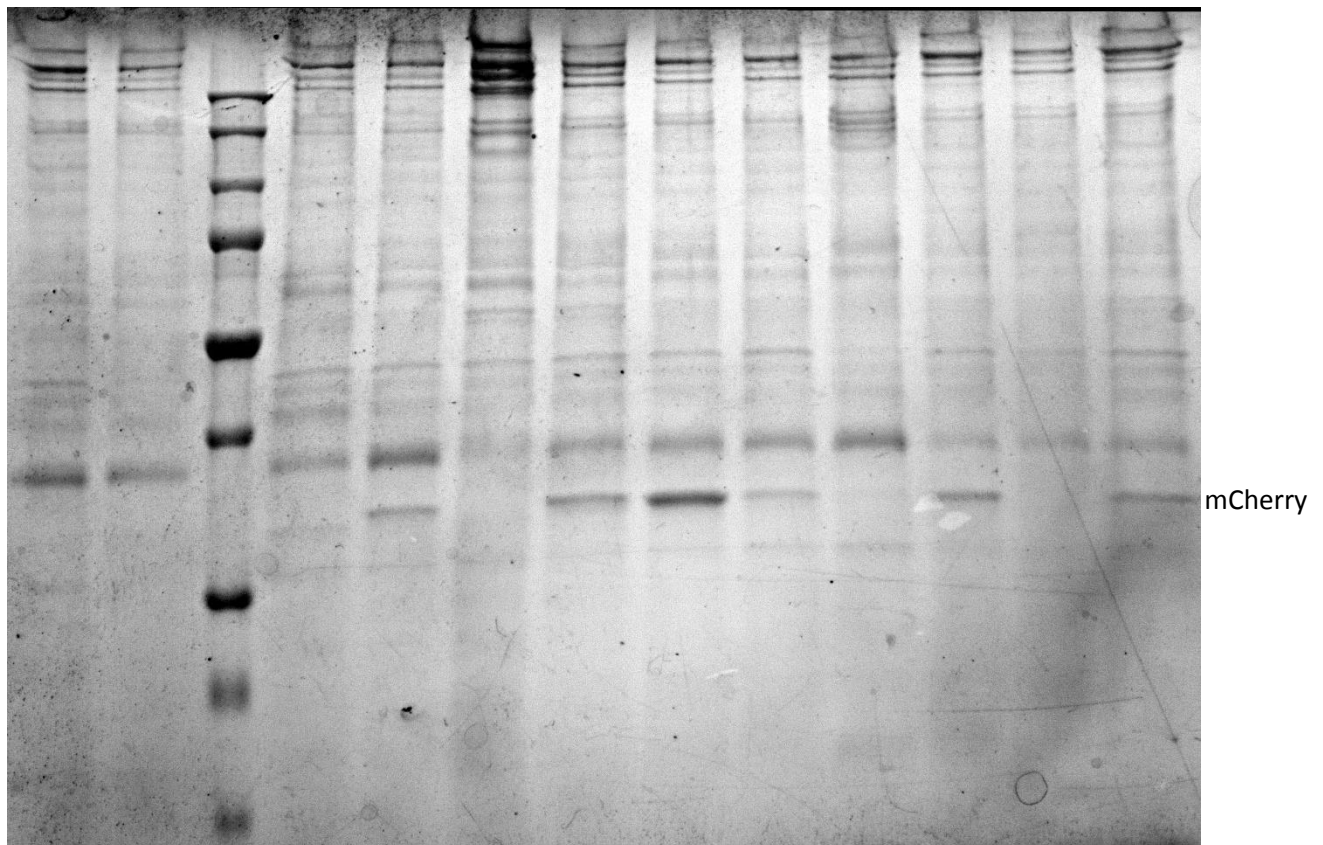
Fonte: Autor

O gel de Comassie blue de amostras do sobrenadante (Fotografia 3-2) foi realizado com amostras do sobrenadante, concentradas com uma membrana com corte de 10 kDa. Através dessa estratégia foi possível observar a banda referente a mCherry em algumas das amostras,

mas a informação mais valiosa é a variedade de proteínas observadas junto a proteína de interesse. Essa baixa complexidade, quando comparada com as amostras do lisado, indicam que processos a jusante para amostras do sobrenadante serão simplificados. Outra informação interessante a ser notada é a relativa ausência de proteínas de alto peso molecular no lisado celular (Fotografia 3-1) e a relativa abundância no sobrenadante (Fotografia 3-2). A parede de *C. reinhardtii* é composta por glicoproteínas de alto peso molecular >100 kDa, ricas em hidroxiprolinas (111). Provavelmente, as proteínas de alto peso molecular presentes no gel do sobrenadante, referem-se a essas glicoproteínas, explicando essa diferença entre os géis e indica a capacidade de secreção e proteínas de alto peso molecular para o sobrenadante por *C. reinhardtii*.

Fotografia 3-2: SDS-PAGE de amostras de sobrenadante concentradas 30X de cepas expressando mCherry em diferentes construções

cc1690 pAH04 PPM pJP26 pJP22 pJP28 pJP29 pJP30 pJP31 pJP32 pJP33 pJP34 pJP35



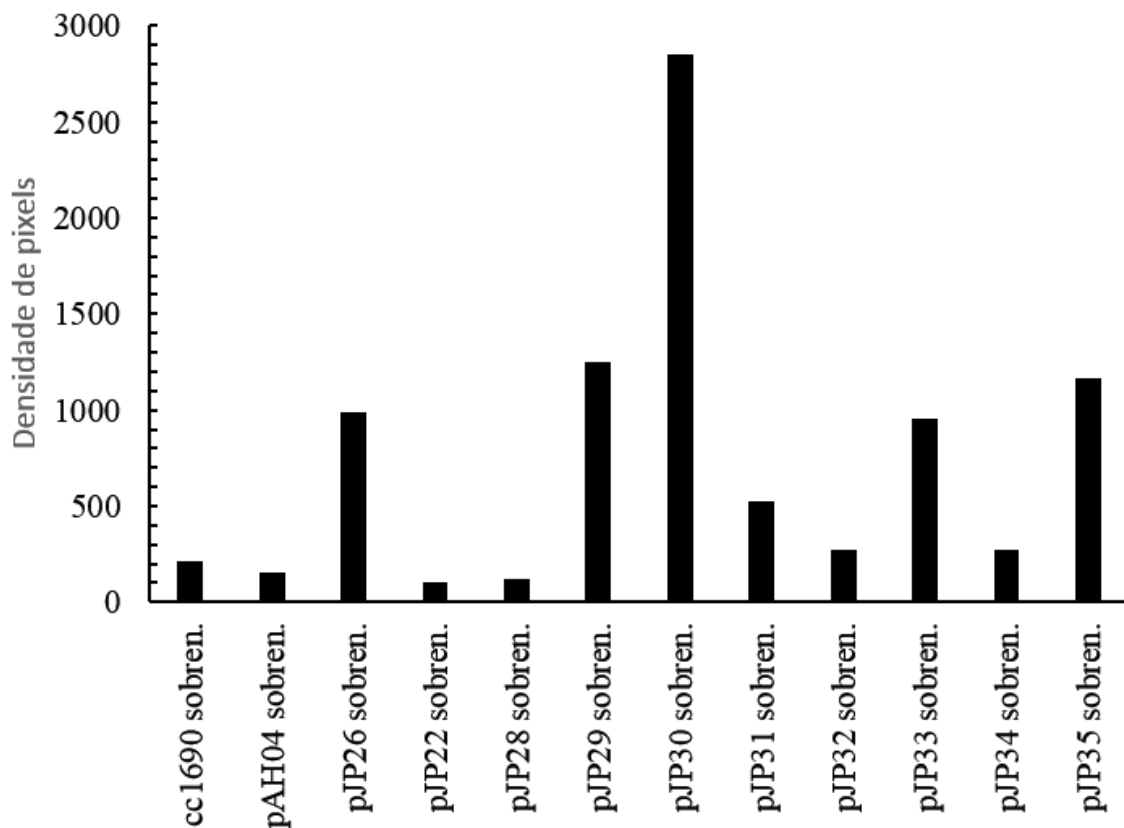
Nota: **CC1690** - células selvagem não transformadas. **pAH04** - Construção sem peptídeo sinal. **pJP26** - construção com SP1 (BiPI). **pJP22** - construção com SP2 (ARS1). **pJP28** - construção com SP3 (CAH1). **pJP29** - construção com SP4 (IBP1). **pJP30** - construção com SP5 (teórico). **pJP31** - construir com SP6 (teórico). **pJP32** - construção com SP7 (teórico). **pJP33** - construção com SP8 (teórico). **pJP34** - construção com SP9 (teórico). **pJP35** - construção com SP10 (teórico). **PPM** - Padrão de peso molecular All Blue Prestained Protein, BioRad® (Hercules, CA). Foto editada em Picasa3, utilizando função Preto e Branco e autocontraste.

Fonte: Autor

O peptídeo sinal é uma tecnologia importante para sistemas de expressão, tanto por razões de processo (facilitar os passos de purificação do produto desejado) como para conduzir

a síntese de proteínas ao RE e complexo de golgi em que ocorre modificação pós-traducionais importantes, como a glicosilação (27). Os resultados de fluorescência, *western blot* e SDS-PAGE com coloração por comassie blue, permitem confirmar a capacidade de secreção dos peptídeos sinais avaliados, exceto para o peptídeo SP9. Porém, no intuito de validar se a banda indicada no SDS-PAGE é a mCherry, uma análise de densitometria foi realizada Gráfico 3-3.

Gráfico 3-3: Análise de densitometria de mCherry feita a partir de SDS-PAGE em amostras do sobrenadante concentradas 30X.



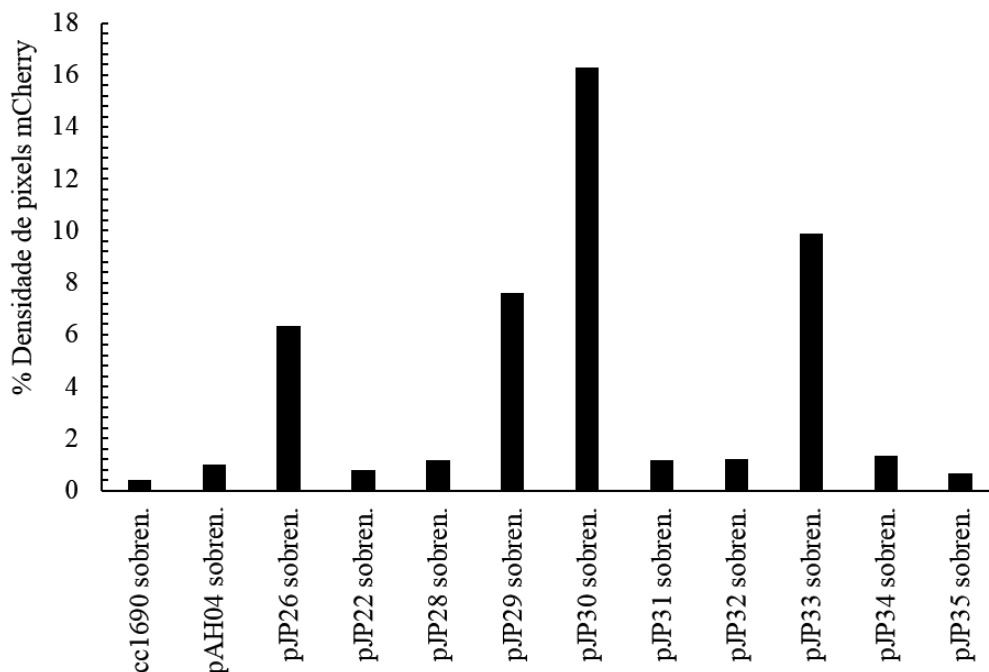
Nota: Análise realizada utilizando ImageJ. **CC1690** – cepa selvagem parental. **pAH04** – Construção sem peptídeo sinal. **pJP26** - construção com SP1 (BiPI). **pJP22** - construção com SP2 (ARS1). **pJP28** - construção com SP3 (CAH1). **pJP29** - construção com SP4 (IBP1). **pJP30** - construção com SP5 (teórico). **pJP31** - construir com SP6 (teórico). **pJP32** - construção com SP7 (teórico). **pJP33** - construção com SP8 (teórico). **pJP34** - construção com SP9 (teórico). **pJP35** - construção com SP10 (teórico).

Fonte: Autor

Na análise de densitometria foi possível observar o mesmo padrão de intensidade observado para as medidas de fluorescência (Gráfico 3-3). Além disso, a banda indicada está no tamanho esperado para mCherry. Em uma análise subsequente de densitometria, a intensidade da banda de mCherry foi comparada com a somatória da intensidade das bandas presente na faixa de corrida do gel de uma mesma amostra (Gráfico 3-4), permitindo estimar sua concentração. Para essa análise foi utilizado os dados de concentração de proteínas totais

solúveis presentes na amostra, e assumido que a maior parte das proteínas foi visível no gel de SDS-PAGE. A partir dessa análise foi possível estimar a concentração de 13,5 mg/L da mCherry no sobrenadante para a cepa com a construção pJP30mCherry. Esta concentração de mCherry pode estar superestimada, pois parte das proteínas presentes na amostra podem não ter sido corados ou visíveis na fotografia. No entanto, esta estimativa deve estar na mesma ordem de magnitude do valor real, uma vez que a técnica de comassie coloidal apresenta um limite de detecção de 1 ng por banda (112) e o valor total de proteína adicionado foi de 2700 ng e portanto a maior parte das proteínas presentes na amostra estariam visíveis por essa análise.

Gráfico 3-4: Porcentagem de densidade de pixels da banda de mCherry comparada com o total presente na amostra.



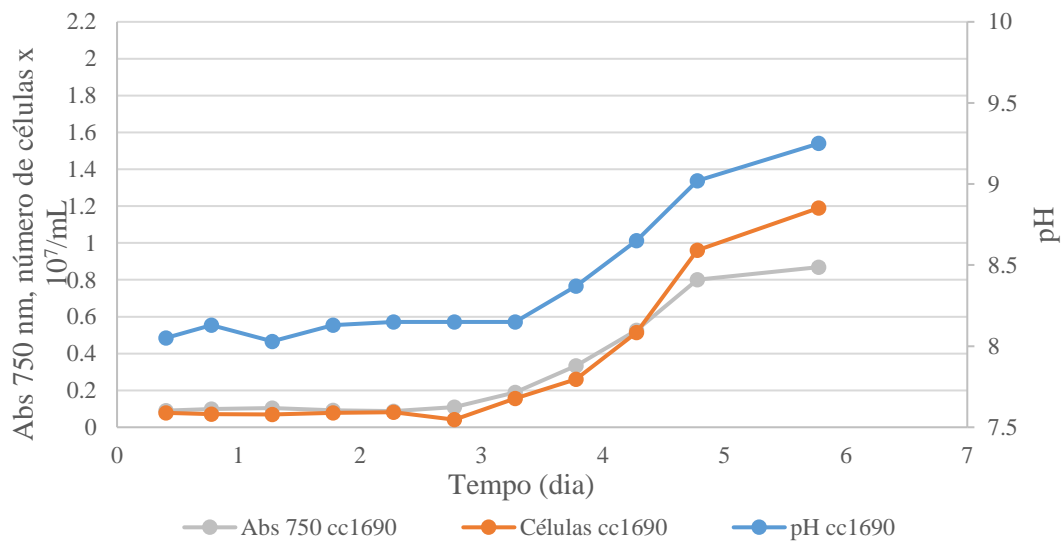
Nota: Análise realizada utilizando ImageJ. **CC1690** – cepa selvagem parental. **pAH04** – Construção sem peptídeo sinal. **pJP26** - construção com SP1 (BiPI). **pJP22** - construção com SP2 (ARS1). **pJP28** - construção com SP3 (CAH1). **pJP29** - construção com SP4 (IBP1). **pJP30** - construção com SP5 (teórico). **pJP31** - construir com SP6 (teórico). **pJP32** - construção com SP7 (teórico). **pJP33** - construção com SP8 (teórico). **pJP34** - construção com SP9 (teórico). **pJP35** - construção com SP10 (teórico).

Fonte: Autor

Para avaliar a capacidade de secreção de mCherry em cultivos em fotobiorreatores, foi conduzido o cultivo utilizando a cepa selvagem e uma cepa contendo a construção pJP22mCherry. Foram avaliados a variação de pH, densidade celular por absorbância, contagem de células com câmara de Neubauer e fluorescência de mCherry no sobrenadante. Os resultados estão sumarizados nos Gráficos 3-5, Gráfico 3-6 e Gráfico 3-7. Nesses experimentos a cepa recombinante apresentou uma fase lag bem inferior à cepa selvagem, e uma velocidade

específica de crescimento máxima superior (1.27 d^{-1} e 1.11 d^{-1} , respectivamente). Uma hipótese para uma menor fase lag para a cepa recombinante é a presença de moléculas de mCherry nessas cepas. É hipotetizado que proteínas fluorescentes surgiram na evolução como agentes de fotoproteção em corais (113) então a expressão de mCherry conferiria a célula uma proteção adicional contra luz. Inicialmente, a densidade de microalgas no cultivo é baixa, e pode ocorrer fotoinibição do crescimento microbiano, o que acarretaria em uma fase lag maior. Os Gráficos 3-5 e Gráfico 3-6 apresentam os dados do cultivo em FBR v4.

Gráfico 3-5: Curva de crescimento de cepa parental selvagem CC1690 em FBR v4, em meio TAP.

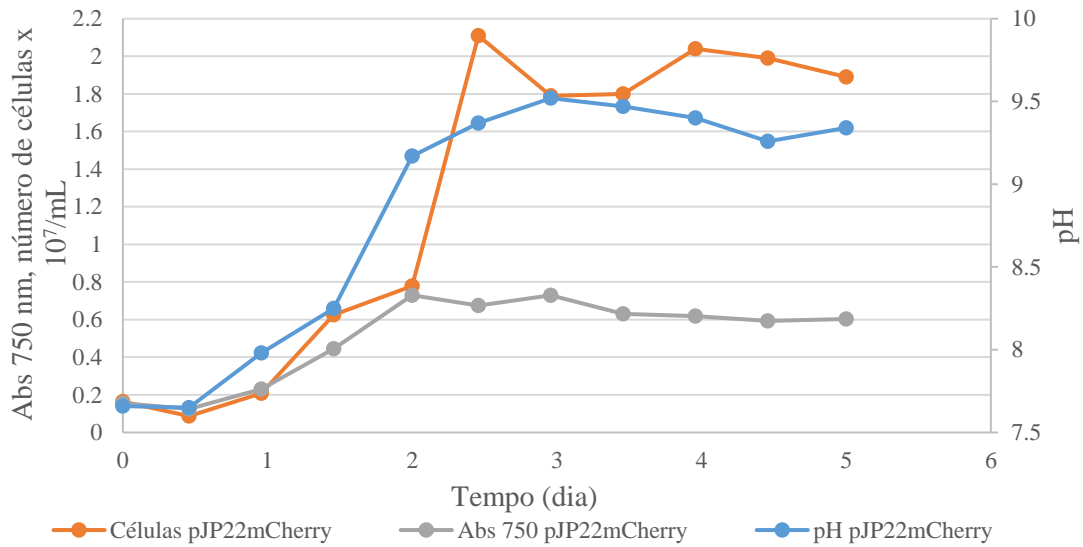


Nota: Abs – Absorbância em 750 nm. Número de células por mL apresentados com potência de 10^7 células por mL.

Fonte: Autor

A produtividade máxima de mCherry no reator chegou a 19445 UAF/mL.dia (UAF – Unidade arbitrária de fluorescência). A partir da estimativa de concentração por SDS-PAGE e valores de fluorescência obtida anteriormente, é possível correlacionar valores de fluorescência com a quantidade de proteína em massa. Realizando essa estimativa, obtemos uma produtividade máxima de aproximadamente 10 mg/L.d para essa cepa no reator fotobiorreator v4.

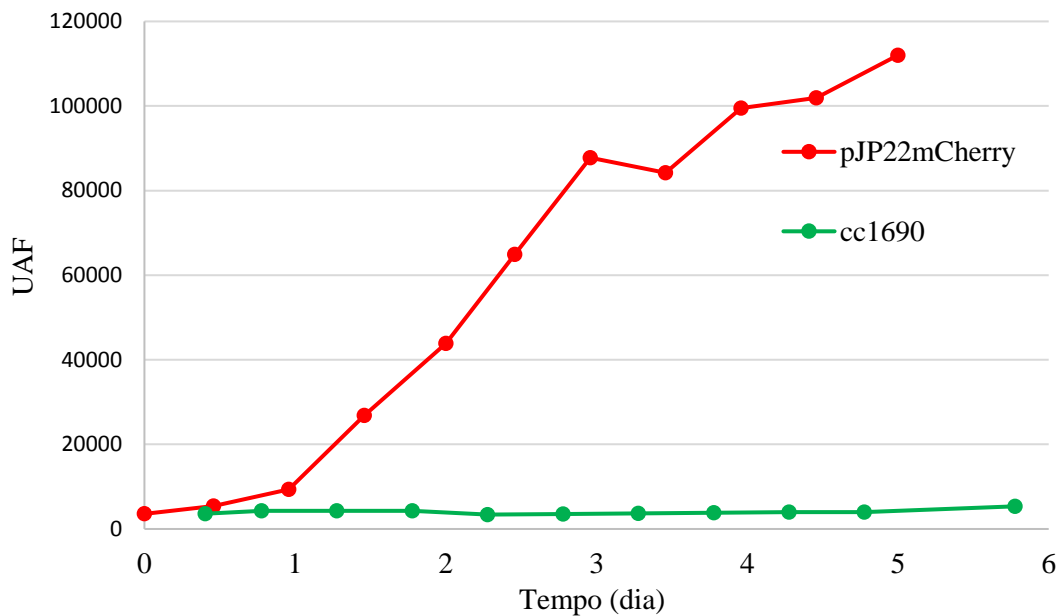
Gráfico 3-6: Curva de crescimento de cepa com construção pJP22mCherry em FBR v4, em meio TAP.



Nota: Abs – Absorbância em 750 nm. Número de células por mL apresentados com potência de 10⁷ células por mL.

Fonte: Autor

Gráfico 3-7: Produção de mCherry em FBR v4 medido por fluorescência de mCherry no sobrenadante do cultivo.



Nota: **UAF** – Unidade arbitrária de fluorescência. **CC1690** – cepa parental selvagem. **pJP22 mCherry** – cepa recombinante com construção pJP22mCherry.

Fonte: Autor

Uma consequência do crescimento celular da *C. reinhardtii* é a alteração do pH do meio. A variação do pH acompanha o aumento da densidade do cultivo, atingindo valores cada vez mais básicos com o crescimento celular. A basificação do meio se dá pelo consumo do acetato

presente no meio TAP, assim como do ácido carbônico dissolvido no meio. É interessante notar que o início da fase estacionária para os cultivos se deu em um valor de pH limite (~9,4). A correção do pH pode ser realizada utilizando algumas fontes de carbono assimiladas pela microalga, como ácido acético e CO₂ o que permite cultivos alimentados controlados pelo pH.

Apesar da relativa alta produtividade (10mg/L.d), esse cultivo foi realizado em regime de batelada e é possível notar uma correlação entre a aceleração da produção de mCherry com o aumento da concentração celular, até o início da fase estacionária. Isso se deve ao promotor utilizado nessa construção que é constitutivo, promovendo a expressão a todo o momento de mCherry e o fato de que nas etapas iniciais há um aumento no número de células viáveis no cultivo, que decresce na fase estacionária. Portanto, altos valores de produtividade volumétrica podem ser alcançados, ao se utilizar técnicas de prolongamento da viabilidade celular, como processos em batelada alimentada, semi-contínuos e contínuos com reciclo de células.

Utilizando os valores obtidos experimentalmente é possível estimar os custos de produção para cada um dos experimentos. Empregando a estimativa de 13,5 mg/L de mCherry do cultivo em shaker, é possível calcular a produtividade dessa cepa no experimento, alcançando 1,9 mg/L.d. Utilizando estimativas do custo de cultivo com iluminação artificial com LED em fotobiorreatores em escala industrial (114,115) e o valor estimado de concentração de mCherry alcançamos o custo de 6,5 US\$/Kg de proteína no sobrenadante. Quando utilizamos os dados obtidos em fotobiorreator, o valor estimado do custo de produção para mCherry no sistema proposto reduz para 2,5 US\$/Kg. Esse resultado é interessante, pois demonstra que, apesar de informativas, os resultados obtidos em agitador orbital podem ser drasticamente inferiores a resultados obtidos em condições mais controladas de cultivo. Contudo, o custo por Kg do produto aumenta rapidamente ao considerarmos o custo das etapas de recuperação e purificação que devem ser seguidos até alcançar o produto final.

No entanto, esses valores são importantes, pois permitem estimar quais proteínas tem um potencial econômico de ser explorado nesse sistema de expressão com microalgas por secreção. Por exemplo, o quilo de um material proteico utilizado em alto volume como a seda, alcança valores entre 5-50 US\$/Kg do fio de seda (116). Apesar do valor alcançado na estimativa com microalgas ser próximo em preço, o fio de seda já é um produto manufaturado e os custos relacionados a esse processamento já estão embutidos no valor de venda, assim como o lucro. Porém, os valores utilizados para essa comparação são de cultivos sem nenhuma etapa de otimização e incrementos na produtividade podem ser alcançados e refletir em uma significativa redução do custo final do produto produzido com microalgas.

Outras proteínas utilizadas em alta quantidade são enzimas utilizadas em aplicações industriais. Essas enzimas estão acopladas a processos conduzidos em escalas de produção da ordem de milhões de toneladas, movimentando um mercado de U\$ 4,4 bilhões no mundo (6). Por exemplo, proteases utilizadas na indústria de alimentos são comercializadas a valores entre 3-30 U\$/Kg, enquanto que a catalase, uma enzima aplicada na indústria do leite e ovo, é comercializada a valores entre 1.500-10.000 U\$/Kg (6). A partir dos valores obtidos no presente estudo, é possível iniciar a avaliação de qual enzima industrial seria interessante ser produzida em um sistema aplicando microalgas. Contudo, essa análise apenas oferece suporte para a tomada de decisão, uma vez que umas miríades de fatores podem afetar a produção de proteínas heterólogas em quaisquer sistema e os resultados obtidos com mCherry não são diretamente relacionados a outras proteínas, mas servem como um guia.

3.1. CONCLUSÃO

O uso de microalgas para aplicações biotecnológicas apresenta vantagens relacionada ao seu baixo custo de produção, o que torna o sistema de expressão de proteínas em microalgas atraente para a produção de diferentes proteínas. O desenvolvimento de ferramentas que explorem as principais vantagens desse sistema é necessário, e no presente trabalho peptídeos sinais foram desenvolvidos para aumentar a atratividade desse sistema. Foram avaliados 10 peptídeos sinais, sendo 6 não descritos anteriormente na literatura. O peptídeo SP5 apresentou o melhor desempenho entre os peptídeos sinais avaliados, apresentando a capacidade de secreção de 13,5 mg/L de mCherry em cultivo de 7 dias em agitador orbital. Para complementar ainda mais a avaliação da capacidade de expressão desse sistema, cultivos em FBR v4 foram realizados. Os resultados obtidos nesse experimento, trouxeram novas informações sobre a capacidade desse sistema, empregando a tecnologia de secreção de proteínas. Até o presente momento, o maior valor alcançado de secreção de proteínas em microalgas era de aproximadamente 10mg/L em 10 dias de cultivo. Esse valor foi alcançado em apenas um dia no máximo de produtividade do sistema. Esses resultados permitem o avanço na avaliação de microalgas como um sistema de expressão de proteínas heterólogas, assim como permitem identificar os bioprocessos em que o emprego do sistema de expressão com secreção por microalgas é mais atrativo, através das estimativas de custo.

4. CAPÍTULO – EXPRESSÃO DE HIALURONIDASE EM *Chlamydomonas reinhardtii*

4.1. INTRODUÇÃO

Fármacos biológicos como a insulina, as eritropoietinas (EPOs), o ativador de plasminogênio tecidual (tPA), bem como muitos anticorpos anti-câncer, são a maior classe de novos produtos em desenvolvimento pelas empresas biofarmacêuticas (7). Estima-se que até 2020 o crescimento global desse mercado será de 9,4%, passando de US\$ 162 bilhões do valor total desse mercado em 2014 para US\$ 278 bilhões em 2020 (117).

A importância econômica dos produtos farmacêuticos biológicos é indiscutível no mercado farmacêutico, mas o custo do seu desenvolvimento é alto o que acarreta em alto risco financeiro para as empresas. De fato, esse alto custo de desenvolvimento acarreta em produtos de preço elevado, impactando sistemas de saúde. No Brasil, a principal despesa com medicamentos no Sistema Único de Saúde foi com dois produtos farmacêuticos biológicos (infiximabe, custo total de R\$ 145 milhões e R\$ 239 milhões para adalimumabe) em 2010 (118).

A aprovação da insulina recombinante pela *Food and Drug Administration* (FDA) foi o início de uma série de terapias baseadas em proteínas que chegaram ao mercado. Atualmente, os principais sistemas de expressão são baseados em bactérias (*E. coli*), ou cultura de células de mamíferos (células de ovário de hamster chinês, CHO) (7,119,120). No entanto, entre 2010 e 2014, houve uma tendência de aumento de produtos baseados sistemas de expressão baseados em mamíferos em relação aos outros sistemas de expressão. Esta tendência está de acordo com o aumento contínuo da proporção de moléculas que abrigam modificações pós-traducionais, particularmente a glicosilação (7).

Melhorias contínuas nos sistemas de expressão permitem que novos medicamentos à base de proteínas cheguem ao mercado. De fato, alguns deles começam a ter aprovação pela FDA, como os sistemas de baculovírus-inseto-célula e *Pichia pastoris* (7). Ademais, destaca-se que, em 2014 foi aprovado pelo FDA o Elelyso® (taliglucerase alfa), primeiro produto biofarmacêutico produzido em um sistema baseado em plantas (7). Esse biofármaco é uma glucocerebrosidase recombinante usada como terapia de substituição para tratar a doença de Gaucher, um raro transtorno de armazenamento lisossomal (7).

Sabendo do potencial das microalgas como sistema expressão para proteína recombinantes, neste projeto foi avaliado o sistema de expressão baseado em *C. reinhardtii*

para produção do biofármaco hialuronidase (HYAL). As HYAL (EC 3.2.1.35) são enzimas que hidrolisam ácido hialurônico na matriz extracelular e algumas isoformas provenientes de humanos ou de outros animais foram produzidas e purificadas em sistemas heterólogos de expressão (121).

Inicialmente foi escolhida a isoformas HYAL1 para expressão em microalgas, uma vez que esta isoformas foi expressa com sucesso transitório em um sistema de expressão baseado em plantas (121). Além da HYAL1, também foi selecionada a isoforma PH20 (SPAM1) por ser a isoforma atualmente comercializada e produzida para fins terapêuticos em sistemas baseado em células de mamífero (células de ovário de hamster chinês – CHO). O interesse terapêutico pelas HYAL reside na sua capacidade para reduzir a viscosidade de polímeros de ácido hialurônico na matriz extracelular, aumentando assim a permeabilidade do tecido (122). O aumento da permeabilidade permite que a HYAL seja utilizada conjugada com fármacos, aumentando a dispersão e velocidade de distribuição de fármacos de interesse aplicados em tecidos ricos em ácido hialurônico, como o tecido subcutâneo (123).

A HYAL recombinante tem sido expressa em diferentes sistemas como bactérias, leveduras, células de insetos, plantas terrestres e células de rim humano (121,124–126). Em 2005, a FDA aprovou Hylenex®, a primeira HYAL humana recombinante modificada (PH-20) produzida em células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) (121). Outra isoforma é a HYAL de mamífero (HYAL1), uma enzima β -1,4-endoglicosaminidase, que cliva a ligação b-1,4-glicosídica entre a N-acetil- Glucosamina e glucuronato na cadeia do ácido hialurônico na matriz extracelular (121).

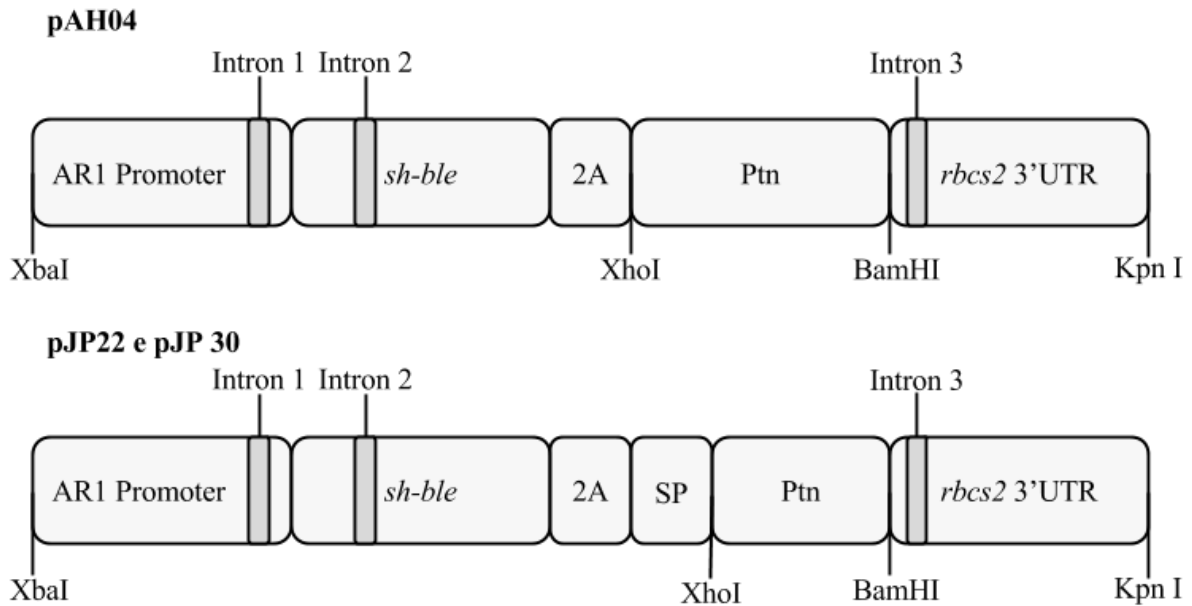
O objetivo deste estudo é avaliar o sistema de expressão baseado em microalgas, utilizando *C. reinhardtii* como o organismo modelo para a produção de HYAL. Para isso, duas isoformas foram escolhidas: HYAL1 e PH-20.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS

Os plasmídeos foram construídos no plasmídeo pBluescript II (pBSII). Os vetores pJP22 e pJP30 foram construídos a partir de modificações feitas no vetor de expressão pAH04. O vetor pAH04 foi doado pelos pesquisadores Beth Rasala e Austin Hallgreen. Para a construção dos vetores pJP22 e pJP30 foi utilizado o peptídeo sinal da ARS1 e o peptídeo SP5, desenvolvidos no Capítulo 3. O Esquema 4-1 apresenta as construções dos vetores pAH04, pJP22 e pJP30.

Esquema 4-1: Esquema dos vetores de expressão para hialuronidase, pAH04, pJP22 e pJP30.



Nota: **AR1 Promoter**: Promotor quimérico contendo os promotores *hsp70A/rbc2* com o primeiro intron de *rbc2*. **Intron**: introns da *rbc2*, números indicam a ordem no gene original. **sh-ble**: marcador de resistência a bleomicina. **2A**: Peptídeo de autoclivagem do vírus FMDV (Food and Mouth Disease Virus). **Ptn**: Proteína de interesse a ser expressa. **rbc2 3'UTR**: Região não traduzida da subunidade pequena da RuBisCO 2. **SP**: peptídeo sinal da ARS1 e SP5. Plasmídeos com o respectivo peptídeo sinal como descrito na Tabela 3-1.

Fonte: Autor

A estrutura do vetor de expressão pAH04 é composta por um promotor nuclear P_{AR1} , gene de resistência a bleomicina (*sh-ble*), um peptídeo de autoclivagem 2A, e uma região terminadora proveniente da *rbc2*. Além disso, 3 introns provenientes da *rbc2* foram inseridos na ordem nativa na construção. O P_{AR1} é um promotor quimérico contendo partes do promotor *hsp70A/rbc2*, e o primeiro intron da *rbc2*, que foi inserido por reação de SLICE (76).

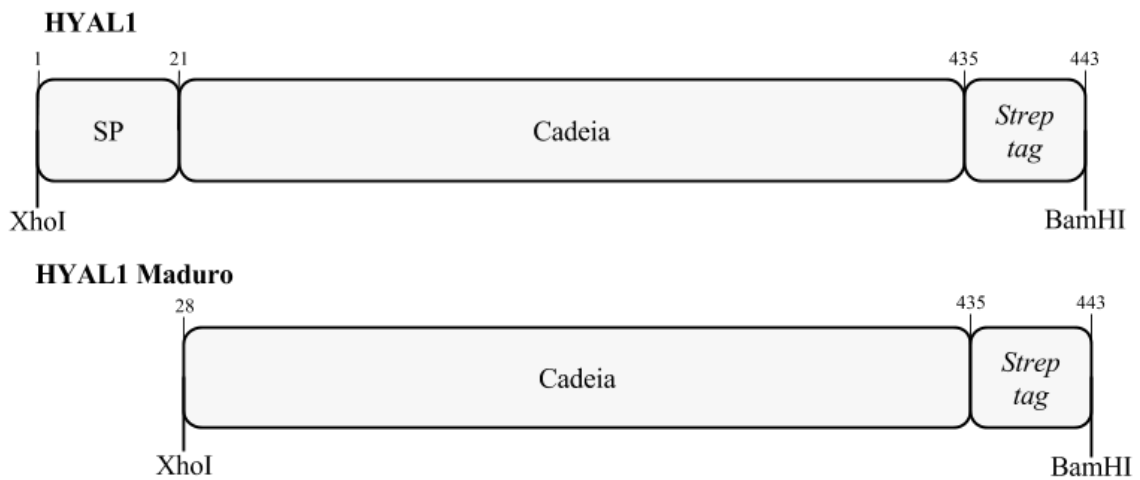
O promotor nuclear foi clonado no pBS II como fragmento contendo sítios de restrição XbaI/NdeI. A sequência 2A foi adicionada ao fim do *sh-ble* por PCR usando um primer reverso longo codificado para a sequência códon otimizada da sequência 2A. *sh-Ble-2A* foi clonado em seguida de P_{AR1} como um fragmento de NdeI/XhoI. A região *rbc2* 3'UTR foi inserida como um fragmento de XhoI/BamHI. O segundo e terceiro intron de *rbc2* foram inseridos na posição 171 da sequência da *sh-ble* e, o intron 3 na posição 19 da sequência *rbc2* 3'UTR presente no fim da construção, através de reações de SLICE.

As sequências de DNA para as isoformas HYAL1 e PH20 codificadoras de HYALs de *Homo sapiens*, foram códon otimizadas para expressão nuclear em *C. reinhardtii* e sintetizadas por GeneArt® - Life Technologies e protegidas para sequências XhoI e BamHI. As construções foram preparadas com a sequência de Strep-Tag II na porção C-terminal para possibilitar a purificação detecção da proteína. As construções contendo peptídeos sinais, SP2 (ARS1) e SP5,

foram preparadas para todas as isoformas de HYAL como apresentado nos Esquema 4-2 e Esquema 4-3.

As construções derivadas compreendendo a forma madura das proteínas e fragmentos foram geradas por reações de PCR com seqüências estendidas com sítios de restrição XhoI e BamHI. As construções amplificadas por PCR foram verificadas por sequenciamento após as etapas de clonagem.

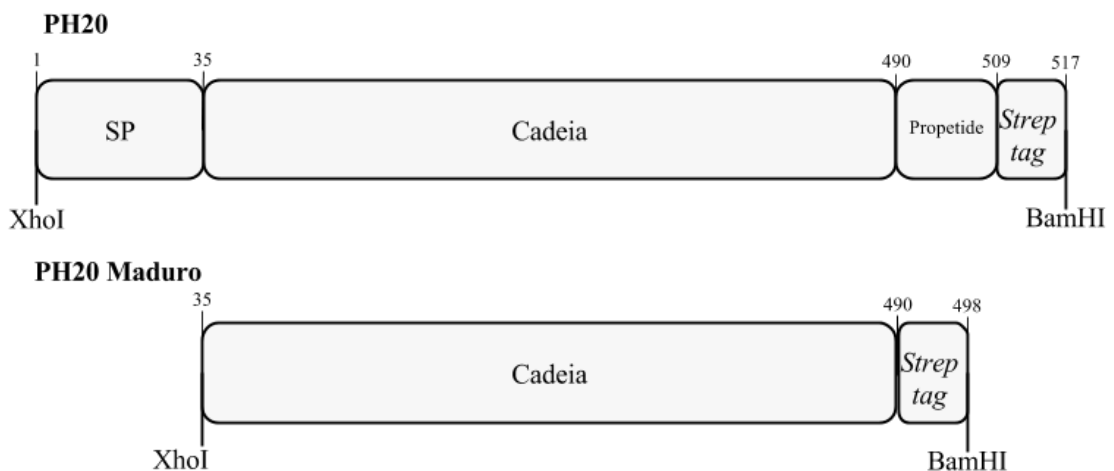
Esquema 4-2: Cadeias de aminoácidos de HYAL1.



Nota: **HYAL1**: codifica para toda a seqüência codificadora de Hialuronidase HYAL1. **HYAL1 Maduro**: codifica a forma madura de HYAL1 após remoção do peptídeo sinal nativo. Ambas as seqüências abrigam Strep-tag II na região C-terminal das construções.

Fonte: Autor

Esquema 4-3: Cadeias de aminoácidos de PH20.



Nota: **PH20**: codifica para toda a seqüência codificadora de hialuronidase PH20. **PH20 Maduro**: codifica a forma madura de PH20 após remoção do peptídeo sinal nativo e um seqüência na porção final C-terminal. Todas as seqüências abrigam Strep-tag II na região C-terminal das construções.

Fonte: Autor

As construções de HYAL estão sumarizadas na Tabela 4-1.

Tabela 4-1: Lista de construções com hialuronidase.

Nome	Forma de Hialuronidase	Peptídeo Sinal
pAH04HYAL1	HYAL1	Sem peptídeo sinal
pAH04HYAL1 Maduro	HYAL1 maduro	Sem peptídeo sinal
pJP22HYAL1 Maduro	HYAL1 maduro	Peptídeo sinal de ARS1
pJP30HYAL1 Maduro	HYAL1 maduro	Peptídeo sinal SP5 predito
pAH04PH20	PH20	Sem peptídeo sinal
pAH04PH20 Maduro	PH20 maduro	Sem peptídeo sinal
pJP22PH20 Maduro	PH20 maduro	Peptídeo sinal de ARS1
pJP30PH20 Maduro	PH20 maduro	Peptídeo sinal SP5 predito

Fonte: Autor

4.2.2. TRANSFORMAÇÕES DE *C. reinhardtii* E CONDIÇÕES DE CULTIVO

A cepa selvagem com parede CC1690 de *C. reinhardtii* foi cultivada em meio TAP (78) a 25°C com agitação constante a 150 RPM em agitador rotativo sobre iluminação constante de $50 \pm 10 \mu\text{mol}$ de fótons/m²s até alcançarem uma concentração entre $3-6 \times 10^6$ células/mL em meio TAP. As células foram centrifugadas e ressuspensas em meio TAP suplementado com 40 mM de sacarose para uma concentração celular final de $3-6 \times 10^8$ células/mL. Em seguida, 250 μL de células ressuspensas foram incubadas com 300-1000 ng de plasmídeos digeridos com XbaI e KpnI por 5-10 min em gelo, dentro de cubetas de eletroporação de 4 mm. Um pulso exponencial de 2000V/cm foi aplicado utilizando um eletroporador GenePulser XCell™ (BioRad, Hercules, CA). A capacitância foi ajustada para 25 mF, sem restrição de resistência. As células foram recuperadas por 18 h em 10 mL de TAP-40mM sacarose e em seguida plaqueados em duas placas de TAP ágar, suplementados com zeocina nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$.

4.2.1. WESTERN BLOT

As amostras de proteínas totais solúveis (PTS) e sobrenadante foram desnaturadas pela adição de tampão SDS-PAGE (Laemmli) com β -mercaptoetanol seguido de incubação a 95 °C durante 5 min. As proteínas foram separadas em géis SDS-PAGE a 12% a 120-150 volts e transferidas para membrana de nitrocelulose a 200 mA durante 1,0 h. Após bloqueio com 5% de leite, as membranas das amostras foram marcadas com um anticorpo monoclonal de rato anti-Strep-tagII, lavadas com TBS-T, uma solução salina tamponada com Tris com Tween 20, nas concentrações de 20 mM Tris, pH 7,5 NaCl 150 mM e Tween 20 a 0,1%. A membrana foi

lavada 3 vezes durante 10 min e incubadas com anti-rato conjugado com fosfatase alcalina. Revelação foi realizada com solução tampão (100 mM de Tris-HCl, pH 9,5; 100 mM de NaCl; 5 mM de MgCl₂) contendo 80 µl de solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP 20 mg/mL em dimetilformamida a 100%.) e 60 µl de solução de Nitro azul tetrazólio (NBT 50 mg/mL em dimetilformamida a 70%.) por 10 ml e misturado antes do uso para cada coloração.

4.2.2. ENSAIO DE ATIVIDADE DE HIALURONIDASE

O ensaio turbidimétrico de atividade de HYAL descrito por Di Ferrante (1956) foi modificado para realizar estudos de atividade turbidimétrica em placas de 96 poços. As soluções de incubação continham os seguintes compostos: Para amostras de sobrenadante de HYAL1: adicionou-se 10 µL de amostra sobrenadante a 90 µL de tampão de incubação (tampão de acetato 150 mM, pH 3,8, com 100 µg / mL de ácido hialurônico). Para a amostra de lisado de HYAL1 adicionou-se 50 µL de amostra de lisado a 50 µL de tampão de incubação (tampão de acetato 150 mM, pH 3,8, com 100 µg / mL de ácido hialurônico). Após incubação a 37 ° C durante 24 h, a reação enzimática foi parada pela adição de 200 µL de solução alcalina de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) [2,5% (m / v) de CTAB em NaOH 0,5M] e as placas foram prontamente lidas. A turbidez foi quantificada pela medição da DO a 400 nm num leitor de microplacas (Tecan, Männedorf, Suíça). Os lisados foram preparados em cada tampão de incubação específico por sonicação. A fluorescência correspondente a clorofila (Ex/Em = 440/680nm) foi avaliada para normalizar a eficiência de lise e concentração celular para os valores de quantificação relativos. A atividade foi avaliada em relação a variação da turbidez do momento inicial até o momento final do ensaio biológico. Todas as amostras, foram preparadas com replicatas, que foram utilizadas assim que preparadas para definir a absorvância inicial da amostra. A equação utilizada para calcular a atividade de HYAL está descrita abaixo:

Equação 4-1
$$PVA (\%) = \frac{Abs_{Ini} - Abs_{final}}{Abs_{Ini}} \times 100$$

Em que, Abs_{ini} é a absorvância da replicata do ensaio, realizada no momento inicial do teste biológico para definir a absorvância inicial. Abs_{final} é a absorvância do ensaio após o período de incubação. Essas absorvâncias foram avaliadas quanto sua variação em relação ao total inicial.

4.2.3. SCREENING DE CEPAS PRODUTORAS DE HIALURONIDASE

Os transformantes foram gerados e testados de uma forma semelhante às proteínas fluorescentes. Em geral, 96 colônias foram coletadas e inoculadas em poços de placas de 96 com poços fundos e testadas adicionalmente para a atividade de HYAL. Porém, ao contrário das proteínas fluorescentes, as cepas foram testadas frente a atividade de HYAL no lisado celular. As células crescidas em placas de 96, foram centrifugadas a 3000 x g por 15 min, à 4 °C, o sobrenadante foi recolhido e as células precipitadas foram posteriormente ressuspensas em tampão de incubação contendo Triton X – 100 0,1% (m/v). Em seguida, as células foram sonicadas em sonicador Branson® Sonifier 450, com ciclo de trabalho de 50%, potência de 4 e durante 20 s em banho de gelo. Após lise, o material foi centrifugado por 3000 x g por 15 min, à 4 °C para separação do material particulado e resto celulares formados. O sobrenadante foi recolhido e assim como amostras do sobrenadante, foram submetidos ao ensaio de atividade de HYAL.

4.2.4. AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE LISE

O volume de 500 µL de células selvagens na concentração de $1,0 \times 10^7$ células por mL foram centrifugadas a 3000 x g por 15 min, à 4 °C e posteriormente ressuspensas em tampão contendo tensoativos em diferentes concentrações. Foram avaliados os tensoativos Tween – 20, Tween – 80, Triton X – 100, Triton X – 114 e Triton X – 445 nas concentrações de 0,1%, 0,3%, 0,5% e 1,0% em tampão 50 mM de fosfato de potássio, pH 7,0. As células foram sonicadas em sonicador Branson® Sonifier 450, com ciclo de trabalho de 50%, potência de 4 e durante 20 s em banho de gelo. Após lise, o material foi centrifugado por 3000 x g por 15 min, à 4 °C para remoção do material particulado e resto celulares formados.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. PRIMEIRO SCREENING

As construções de HYAL descritas na Tabela 4-1 foram avaliadas quanto a capacidade de expressar HYAL. Os resultados do *screening* estão resumidos na Tabela 4-2.

Tabela 4-2: Número de colônias positivas no *screening* por cepas produtoras de hialuronidase.

Construções	Sobrenadante		Lisado	
	Atividade Absoluta	Atividade Relativa	Atividade Absoluta	Atividade Relativa
pAH04HYAL1	4	10	0	0
pAH04HYAL1 Mad	0	0	3	1
pJP22HYAL1 Mad	0	0	6	1
pJP30HYAL1 Mad	96	96	2	1
pAH04PH20	1*	0	5*	0
pAH04PH20 Mad	1	1*	4	0
pJP22PH20 Mad	4	3*	24	0
pJP30PH20 Mad	2*	0	22	0

Nota: **HYAL1** - indica isoforma 1 de hialuronidase; **Mad** - Indica cadeia sem peptídeo sinal da forma nativa e para PH20 também sem o propéptideo na região C-terminal; **pAH04** - Indica a construção sem peptídeo sinal de *C. reinhardtii*; **pJP22** - indica construção com peptídeo sinal ARS1. **PJP30** - indica construção com peptídeo sinal SP5. A atividade absoluta refere-se à comparação direta dos resultados da atividade. A atividade relativa refere-se à atividade absoluta normalizada com o teor de clorofila na amostra, medida por fluorescência. Critérios de resultado positivos = Valor inferior a 3 desvio padrão da média dos resultados obtidos com a cepa selvagem (CC1690). *Considerado positivo com dois desvios-padrão.

Fonte: Autor

O ensaio de densitometria de HYAL correlaciona a sua atividade com a degradação do substrato de HYAL, o hialuronato. A degradação do ácido hialurônico é observada pela redução da turbidez após incubação com uma enzima ativa em tampão apropriado (126). Portanto, quanto menor o valor de absorbância detectados após incubação com uma amostra, maior a atividade da HYAL. Nos experimentos com amostras do sobrenadante houve pouca interferência com a composição do meio nas medidas de absorbância. No entanto, as amostras de lisado apresentaram interferência elevada, devido a alta densidade de pigmentos intracelulares. Alguns desses pigmentos absorvem no comprimento de onda utilizado para a análise, o que aumentou a complexidade do ensaio, para obter os valores de atividade de HYAL, uma vez que variações na composição e estrutura dos pigmentos influenciariam esses valores. Os lisados da cepa selvagem foram utilizados como controle para diminuir este efeito, mas a variação no crescimento entre cepas influenciou os níveis de interferência em uma amostra. A solução foi realizar medidas de branco com a própria amostra. Dois ensaios foram preparados para cada amostra, um foi imediatamente analisado (t0) e o outro incubado na condição experimental por 24h (t24). Esta estratégia permitiu observar a atividade da HYAL mesmo nesta amostra complexa. Essa variação também foi realizada com a cepa selvagem como um controle e comparado com os resultados das construções no *screening*.

Analisando o resultado do *screening*, algumas observações podem ser feitas. Aparentemente, o peptídeo sinal de HYAL1 é reconhecido pelas células e conduzem a secreção de HYAL, uma vez que algumas colônias positivas foram observadas no sobrenadante da construção pAH04HYAL1. Além disso, na construção pAH04HYAL1Mad onde não há

peptídeo sinal foram observadas algumas colônias positivas, apenas no lisado. A presença de colônias positivas nessa construção pode indicar que modificações pós-traducionais como glicosilação não são obrigatórias. Porém, pode ter um papel importante como indicado pelos resultados da construção pJP30 HYAL1 Mad, em que 100% das colônias testadas apresentaram atividade no sobrenadante. Um resultado semelhante foi encontrado em uma comparação entre células de inseto e *Escherichia coli* [55]. Células de insetos foram capazes de produzir HYAL1 com atividade específica superior (~ 80 vezes maior) a HYAL1 produzida em *E. coli*. Entre as diferenças desses sistemas está a capacidade de glicosilar proteínas, ausente em *E. coli* [55].

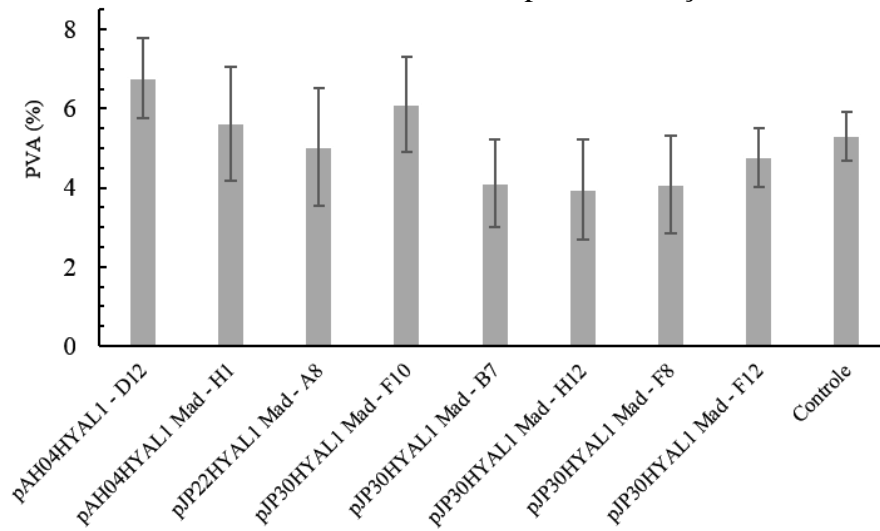
A análise de *screening* de isoformas de PH20 também proporcionaram informações interessantes. Em primeiro lugar, nenhuma colônia produtora foi detectada usando uma regra mais rigorosa (3 desvio padrão em relação a cepa selvagem) para amostras do sobrenadante de pAH04PH20. O método de *screening* foi planejado de formar a adicionar a menor interferência possível ao experimento. Seguindo esse objetivo, o lisado foi preparado por sonicação, mas utilizando tampão de incubação para ressuspender as células, sem adição de um surfactante como é comum neste tipo de experimento. Isto foi alterado nos experimentos seguintes, mas pode explicar a ausência de colônias positivas, pela baixa eficiência de lise. Além disso, é possível que o peptídeo sinal de PH20 não seja reconhecido pela célula e não promova secreção.

Algumas colônias positivas foram identificadas no lisado, utilizando um critério de seleção menos adstringente (2 desvio padrão em relação a cepa selvagem), para a construção pAH04PH20. Essa ausência de colônias positivas também pode ser explicada pela correta adição de âncora GPI (*Glycosylphosphatidylinositol*) pela célula, o que aprisionaria a enzima na membrana celular, explicando a ausência de atividade no sobrenadante (127). A construção pAH04PH20 mantém o domínio relacionado a âncora de GPI, que permitiria o aprisionamento da enzima na membrana citoplasmática como ocorre em *Homo sapiens*, assim como as construções pJP22PH20 Mad e pJP30PH20 Mad que teoricamente está relacionada ao processo de adição da âncora de GPI (127). De fato, a expressão da proteína completa em células CHO não gerou linhagens secretoras de HYAL em sua forma ativa, sendo necessário a deleção dos aminoácidos das posições 477 – 483 para a identificação de linhagens capazes de secretar HYAL em sua forma ativa em células CHO. A partir das proteínas fluorescentes e peptídeos sinais desenvolvidos nesse projeto, estudos futuros poderão verificar se a porção C-terminal de PH20 é reconhecido pelas células de *C. reinhardtii*.

4.3.1.1. Avaliação de Cepas candidatas

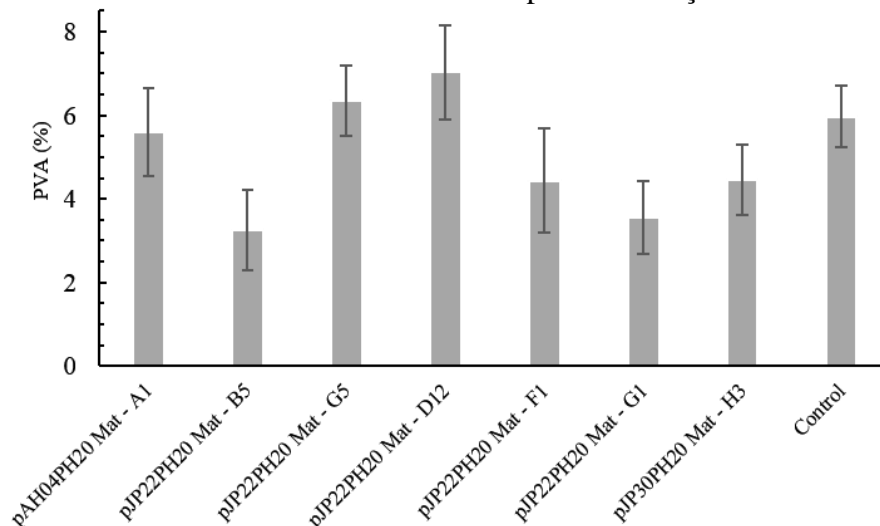
Após as análises dos resultados de *screening*, as colônias mais proeminentes foram cultivadas em 50 mL de meio TAP durante 5 dias para validar adicionalmente a produção de HYAL nestas colônias. Os resultados para o ensaio de atividade do sobrenadante dessas colônias estão apresentados nos Gráfico 4-1 e Gráfico 4-2.

Gráfico 4-1: Ensaio de bioatividade de sobrenadante para construções com HYAL1.



Nota: **pAH04** – construção sem peptídeo sinal. **pJP22** – construção com peptídeo sinal ARS1. **pJP30** – construção com peptídeo sinal SP5. **HYAL1** – Sequência codificadora HYAL1 inteira. **HYAL1 Mad** - Cadeia HYAL1. Sufixo - códigos para transformantes testados. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%.
Fonte: Autor

Gráfico 4-2: Ensaio de bioatividade no sobrenadante para construções com PH20.



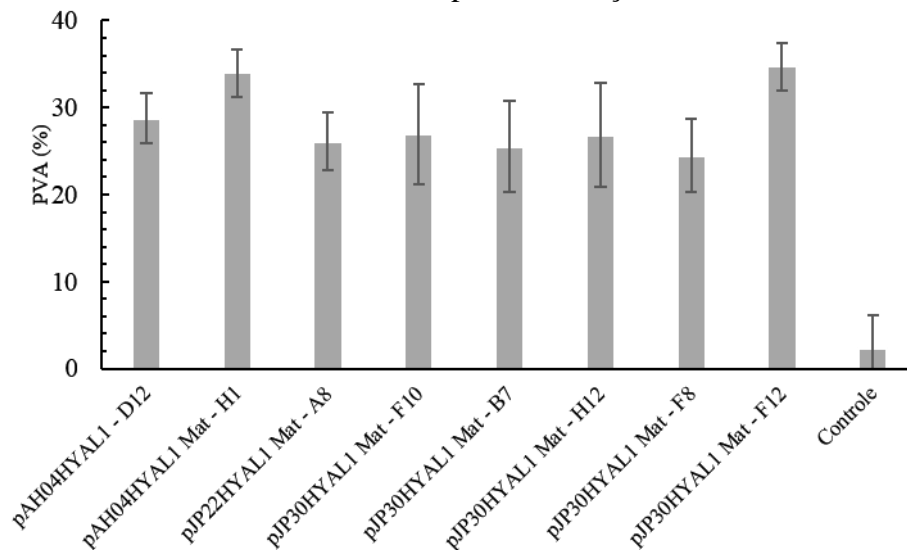
Nota: **pAH04** – construção sem peptídeo sinal. **pJP22** – construção com peptídeo sinal ARS1. **pJP30** – construção com peptídeo sinal SP5; **PH20 Mad** - Cadeia PH20. Sufixo - códigos para transformantes testados. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%.
Fonte: Autor

As amostras de sobrenadante não apresentaram sinal suficiente em alguns testes, o que pode indicar a baixa concentração de HYAL no sobrenadante. No entanto, a não detecção de

HYAL no bioensaio empregado, não confirma a capacidade de produção de HYAL por *C. reinhardtii*. O bioensaio de HYAL empregado não possui baixo nível de detecção como os ensaios para proteína fluorescente, além de ser possivelmente menos estável que as proteínas fluorescentes. O screening para a detecção de cepas produtoras de HYAL, utilizando o bioensaio proposto, necessita de alterações para reduzir o limite de detecção. Uma possível solução que poderá ser empregada para a detecção da atividade de HYAL é a concentração das amostras antes do teste de atividade. Esse tipo de experimento poderá confirmar se a HYAL está sendo secretada. Uma vez confirmando a capacidade de secreção, abordagens a jusante no processo, podem ser tomadas para aumentar a recuperação da enzima ativa do meio de cultura, como extração fermentativa (128) e remoção em tempo real da proteína secretada com sistema de fluxo tangencial (129).

O teste de lisado apresentou melhor desempenho nessa primeira iteração, com alta atividade observada para as amostras de HYAL1, como observado na Gráfico 4-3.

Gráfico 4-3: Ensaio de bioatividade do lisado para construções com HYAL1.



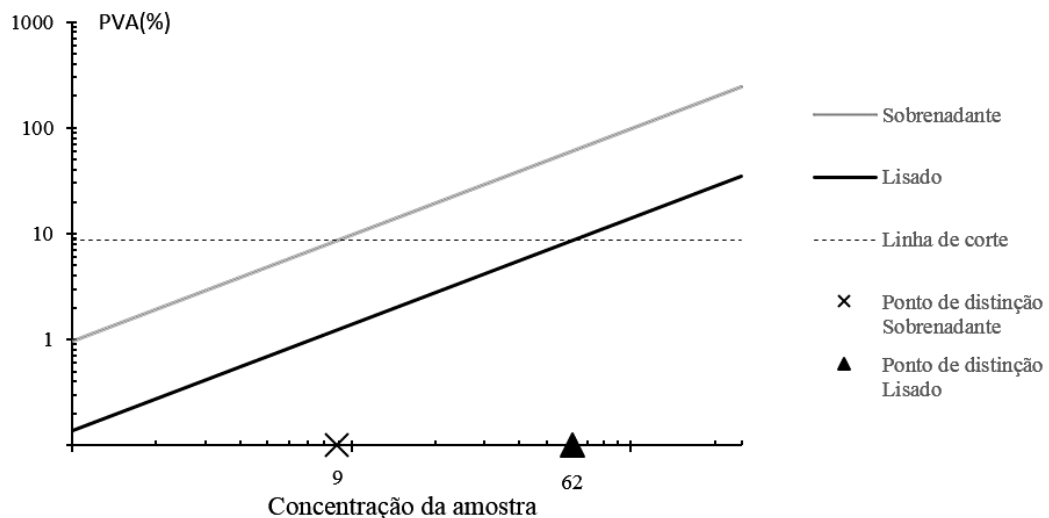
Nota: **pAH04** – construção sem peptídeo sinal. **pJP22** - construção com peptídeo sinal ARS1. **pJP30** - construção com peptídeo sinal SP5. **HYAL1** – Sequência codificadora HYAL1 inteira. **HYAL1 Mad** - Cadeia HYAL1. Sufixo - códigos para transformantes testados. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Autor

A detecção de atividade no lisado celular de algumas linhagens recombinantes é um indício da competência de *C. reinhardtii* em produzir HYAL, contudo não indica sua capacidade de secreção. As amostras de lisado celular estavam aproximadamente 250 vezes mais concentradas no ensaio de atividade enzimática do que as amostras de sobrenadantes. No ensaio de bioatividade, após sedimentação dos 50mL de cultivo, as células eram ressuspensas

em 1mL de tampão de bioensaio (fator de concentração de 50X). Além disso, as células foram lisadas no próprio tampão de ensaio e foram adicionados ao teste em volume 5 vezes superior que as amostras de sobrenadante. Por conseguinte, a comparação dos resultados do lisado e do sobrenadante devem ter em conta este fator de concentração para as amostras do lisado. Considerando essa diferença no preparo da amostra, é possível estimar que as condições experimentais não permitiriam detectar atividade de HYAL no sobrenadante. Essa estimativa foi realizada, utilizando a informação obtida nos estudos de peptídeos sinais (Capítulo 3). Os melhores resultados do peptídeo sinal (SP5) indicam que a concentração de fluorescência extracelular é de 6-7 vezes superior à intracelular. Tomando esses valores como referência e os resultados do controle negativo ($PVA = 2,28 \pm 3,9$) e a cepa com a maior atividade no lisado ($PVA = 34,7 \pm 2,7$) é possível estimar os valores de concentração da amostra necessários para observar atividade no sobrenadante. O Gráfico 4-4 apresenta as estimativas de atividade de HYAL levando em consideração os valores obtidos no lisado celular.

Gráfico 4-4: Estimativa da atividade de hialuronidase no sobrenadante em diferentes valores de concentração da amostra



Nota: **PVA(%)** – Porcentagem de variação de absorvância no ensaio enzimático. A linha preta (-) representa os valores de atividade de hialuronidase do lisado celular em diferentes valores de concentração da amostra, estimados a partir do valor obtido da amostra de lisado concentrada 250 X de pJP30HYAL1 Mat – F12. A linha cinza (-) representa os valores esperados de atividade de hialuronidase no sobrenadante, considerando a estimativa de 7 vezes mais proteínas no sobrenadante para a construção (pJP30/SP5). A linha de corte (--) foi definida utilizando os valores de PVA(%) do controle negativo (CC1690), somados três desvios padrões. O ponto de distinção para o sobrenadante (×), é o valor de concentração da amostra em que a estimativa se equipara ao valor da linha de corte. O ponto de distinção para lisado (▲), é o valor de concentração da amostra em que a estimativa se equipara ao valor da linha de corte.

Fonte: Autor

A partir do Gráfico 4-4 é possível estimar que as amostras do sobrenadante necessitariam ser concentradas algumas vezes, para terem a atividade de HYAL detectável pelo ensaio enzimático. A concentração da amostra de sobrenadante em aproximadamente 10 vezes

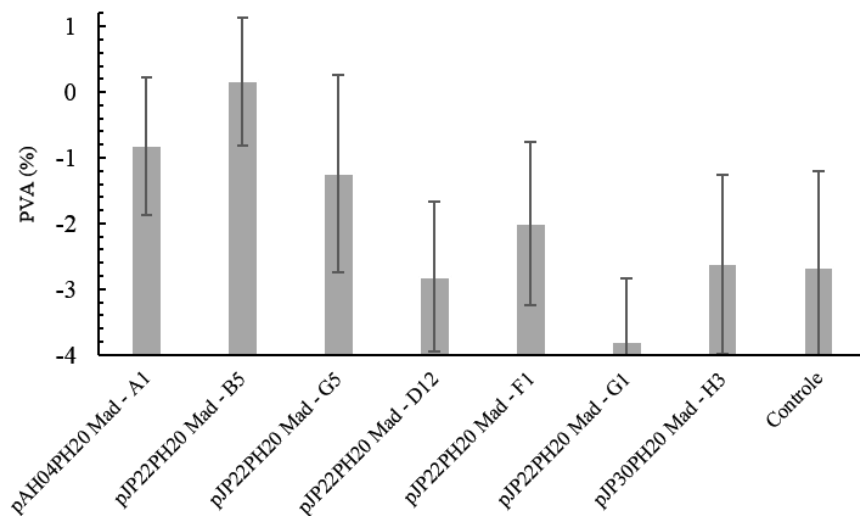
talvez permitisse observar a atividade de HYAL no sobrenadante, caso essa enzima estivesse sendo secretada. Essa estimativa possui limitações, como considerar que a atividade da HYAL se comportará de forma linear nas duas condições experimentais (lisado e sobrenadante), porém trás uma perspectiva sobre quais podem ser os pontos limitantes para detecção de atividade da HYAL no sobrenadante.

Os lisados de HYAL1 são os melhores resultados obtidos até agora para a produção de HYAL em microalgas, nesse estudo. Todas as cepas avaliadas apresentaram pelo menos 10 vezes mais atividade de HYAL quando comparadas com o controle selvagem. Em contrapartida, os lisados de PH20 não trouxeram muita informação. O principal fator que afetou esse resultado foi a composição do pigmento nas amostras testadas. A lise celular no tampão de PH20 extraiu mais pigmentos, como visualmente observado. Além disso, os resultados de absorção foram em média maiores do que os obtidos para HYAL1 (PH20 $Abs_{400nm} \sim 3,5$ e HYAL1 $Abs_{400nm} \sim 1,4$), embora a diferença entre os tampões terem sido apenas o sistema tampão utilizado e pH. Esta diferença pode estar relacionada ao pH do tampão (pH 3,8 para HYAL1 e 7 para PH20), uma vez que a solubilidade dos pigmentos depende da sua carga, que é afetada pelo pH da solução. Essa abundância de pigmentos, e elevados valores de absorbância, comprometem as medidas, o que pode ter levado a não distinção de atividade da HYAL no lisado para essa isoforma.

As análises de *western blot* foram realizadas para todas as amostras, mas apenas as amostras de lisado de PH20 apresentaram bandas com sonda de rato anti-StrepII. Destaca-se que, apesar do problema de interferência com o bioensaio de lisado de PH20 (teor de pigmentos elevado), o resultado do *western blot* (Fotografia 4-1) apresenta a cepa pJP22PH20 Mad – B5 como a de maior concentração de enzima. O Gráfico 4-5 apresenta os valores de atividade de HYAL no lisado para as cepas com a construção contendo PH20.

A amostra pJP22 PH20 Mad - B5 apresentou a maior atividade, assim como a banda mais intensa no *western blot* (~ 57 kDa). As amostras pJP22 PH20 Mad - G5, pJP22 PH20 Mad - D12 e pJP22 PH20 Mad – F1 também apresentaram uma banda e alguma bioatividade, embora não pudessem ser distinguidas do controle no bioensaio. Os valores do bioensaio para PH20 apresentaram valores negativos. Esses valores foram negativos, pois a degradação de pigmentos presentes na amostra, levaram a uma maior absorbância no comprimento de onda (400nm) do ensaio enzimático após o período de incubação, como pode ser observado com os resultados do controle negativo Gráfico 4 5.

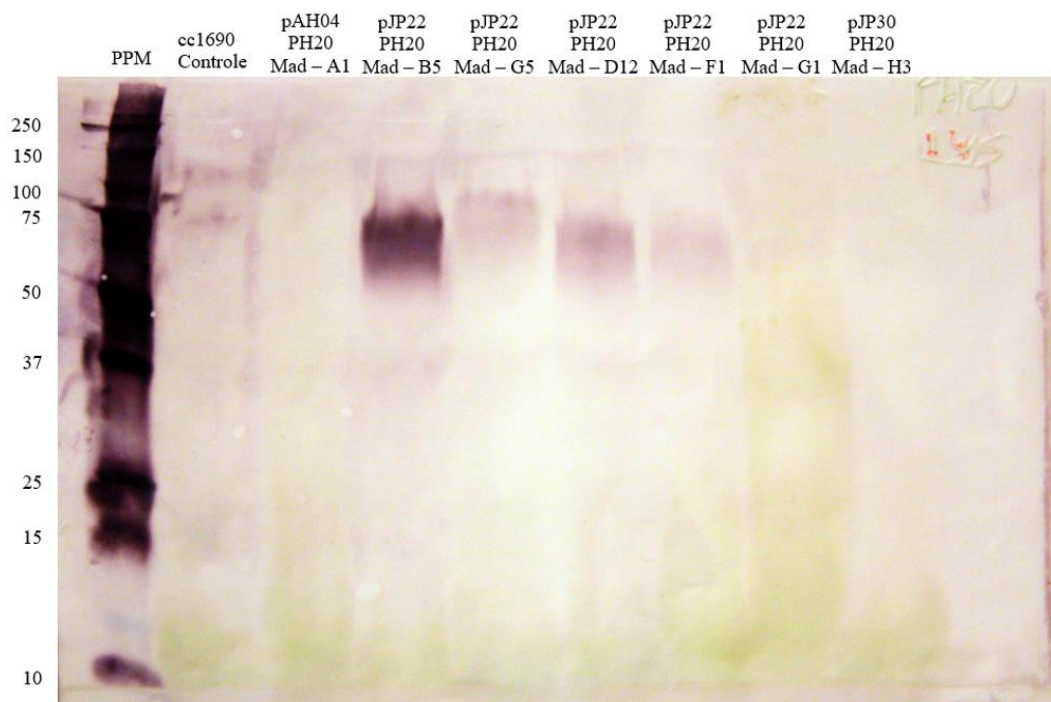
Gráfico 4-5: Ensaio de bioatividade no lisado para construções com PH20.



Nota: **pAH04** – construção sem peptídeo sinal. **pJP22** – construção com peptídeo sinal ARS1. **pJP30** - construção com peptídeo sinal SP5; **PH20 Mad** - Cadeia PH20. Sufixo - códigos para transformantes testados. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Autor

Fotografia 4-1: Western blot do lisado de construções de PH20.



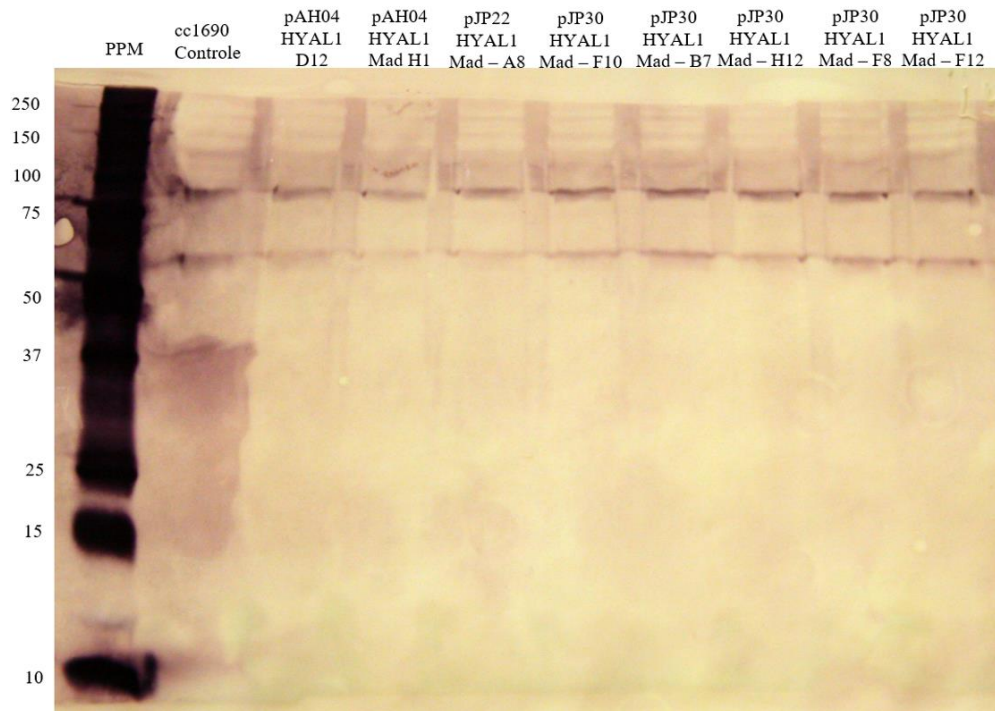
Nota: **pAH04** – construção sem peptídeo sinal. **pJP22** - construção com peptídeo sinal ARS1. **pJP30** - construção com peptídeo sinal SP5; **PH20 Mad** - Cadeia PH20. Sufixo - códigos para transformantes testados. **PPM** – Padrão de peso molecular All Blue Prestained Protein, BioRad® (Hercules, CA). Foto editada em Picasa3, utilizando função autocontraste.

Fonte: Autor

O *western blot* para o lisado de HYAL1 não apresentou bandas específicas para HYAL como observado na Fotografia 4-2. Novamente, a eficiência para a lise das amostras aparentemente afetou os resultados. A menor eficiência da lise para HYAL1 aparentemente

permitiu observar a atividade de HYAL, devido a menor concentração de interferentes, porém, pode ter comprometido a observação da banda de HYAL no *western blot*. As análises de *western blot* para as amostras do sobrenadante não apresentaram bandas específicas para HYAL. Etapas de concentração da amostra são necessárias para observar tanto a atividade quanto a banda no *western blot* para esse tipo de amostra, para possíveis cepas secretoras.

Fotografia 4-2: *Western blot* do lisado de construções de HYAL1.



Nota: **pAH04** – construção sem peptídeo sinal. **pJP22** - construção com peptídeo sinal ARS1. **pJP30** - construção com peptídeo sinal SP5; **HYAL1 Mad** - Cadeia HYAL1. Sufixo - códigos para transformantes testados. **PPM** – Padrão de peso molecular All Blue Prestained Protein, BioRad® (Hercules, CA). Foto editada em Picasa3, utilizando função autocontraste.

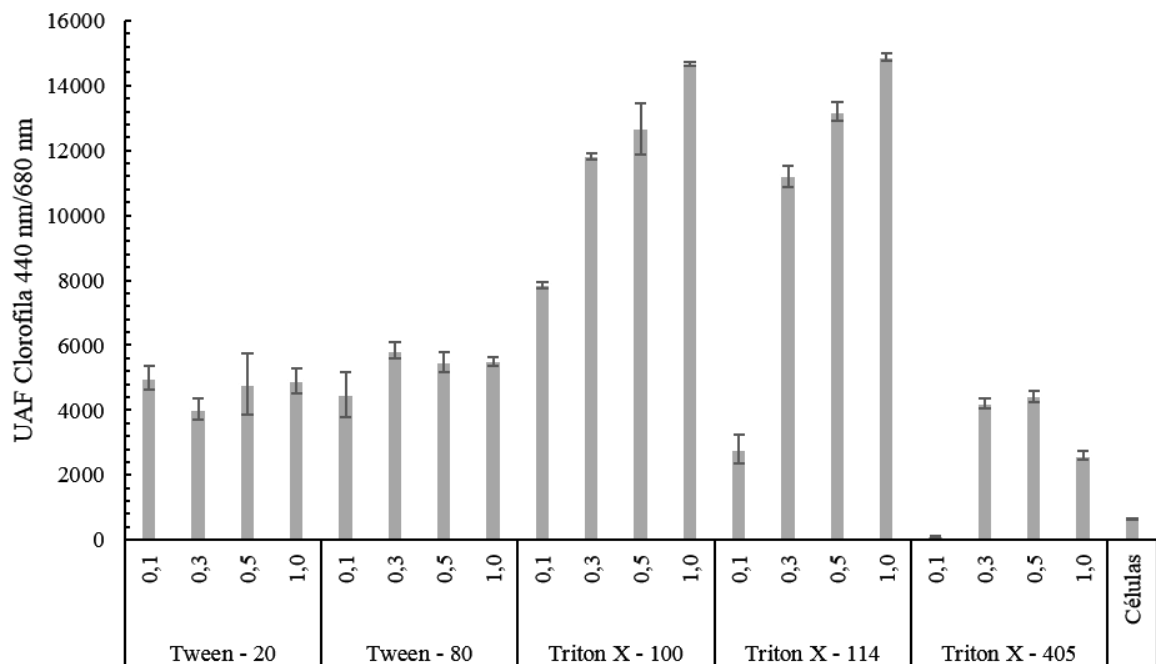
Fonte: Autor

A próxima etapa seria avaliar as cepas produtoras em fotobiorreator, em conjunto com técnicas de concentração do sobrenadante para detecção de HYAL por *western blot* e ensaio de atividade. Porém, as amostras dessa primeira rodada de análise foram perdidas por contaminação do estoque. Tentativas de recuperação em líquido com meio com antibiótico foram infrutíferas.

4.3.2. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE LISE

De acordo com dados da primeira iteração de screening, a lise celular não estava completa para algumas condições e, portanto, uma avaliação de possíveis tensoativos a serem adicionados foi realizada. As células selvagens CC1690 foram submetidas a sonicação em diferentes tampões e os resultados estão representados no Gráfico 4-6.

Gráfico 4-6: Fluorescência de clorofila do material lisado por sonicação com diferentes tensoativos



Nota: **UAF** – Unidade arbitrária de fluorescência. Tensoativos avaliados: Tween – 20, Tween – 80, Triton X -100, Triton X – 114, Triton X – 405. Concentrações avaliadas: 0,1 %, 0,3 %, 0,5 % e 1,0 % (m/v). Células – lise de células sem adição de tensoativo. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%.

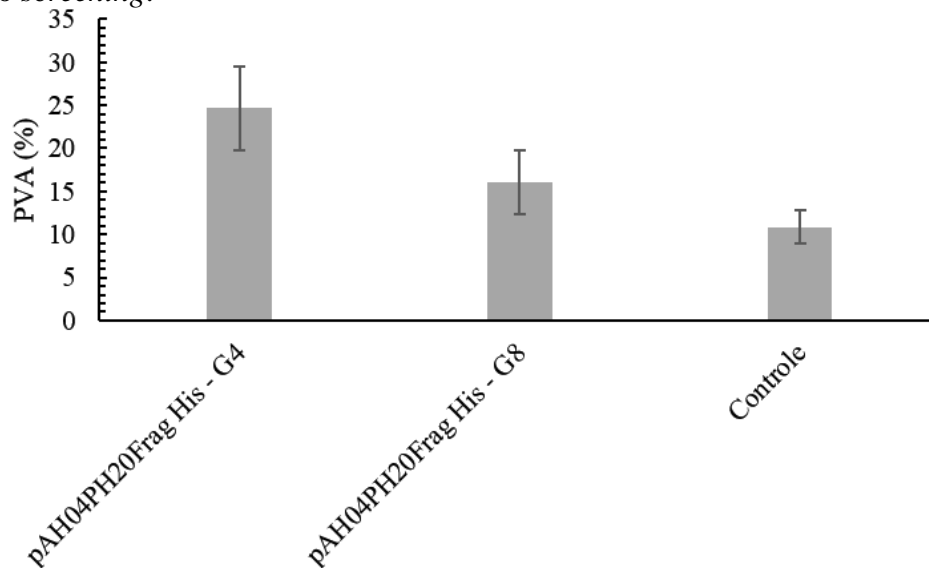
Fonte: Autor

A fluorescência de clorofila foi utilizada para avaliar a eficiência da lise celular. De acordo com os resultados obtidos Triton X - 100 e Triton X – 114 foram os melhores tensoativos para promover a lise de *C. reinhardtii*, ambos em concentração de 1,0% (m/v). Para os experimentos do segundo *screening* foi utilizado Triton X -100 1,0% (m/v) em vez de 0,1% (m/v), como no primeiro screening.

4.3.1. SEGUNDO SCREENING

Uma novo *screening* foi realizado com todas as construções, adicionado a construção pAH04PH20fragHis. Essa construção foi adicionada para testar o fragmento da porção madura de PH20, marcado com His-tag. Essas modificações foram inseridas para testar o fragmento de 447 aa descrito por Frost em células CHO (122) e para permitir purificação por IMAC (Cromatografia de afinidade por íon metálico). Contudo, nenhuma cepa produtora de HYAL foi encontrada para as construções com HYAL1 e apenas 2 possíveis cepas produtoras foram encontradas para PH20 nesse *screening*, como apresentados no Gráfico 4-7.

Gráfico 4-7: Ensaio de bioatividade de lisado de cepas positivas para construções com PH20 do segundo *screening*.



Nota: **pAH04** – construção sem peptídeo sinal. **PH20 Frag** – Fragmento da Cadeia codificadora de PH20. **Controle** – células selvagem CC1690. Sufixo - códigos para transformantes testados. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Autor

Em etapas futuras a serem desenvolvidas pelo grupo, estudos de cinética de cultivo dessas cepas serão realizadas, para avaliar o potencial de microalgas como produtora desse biofármaco. Além disso, as medidas de atividade de HYAL precisam ser melhoradas e existem diversas maneiras de fazê-lo. Técnicas de preparo de amostra podem ser utilizadas para a remoção de interferentes, como purificação em coluna de afinidade com Strep-tactin, ultrafiltração, precipitação, extração líquido-líquido ou precipitação. Todas essas técnicas possuem vantagens e desvantagens quanto a sua aplicação nessa etapa e podem contribuir para a avaliação da HYAL produzida em microalgas.

Outro método possível para possibilitar o *screening* de cepas secretoras de HYAL, aumentando o limite de detecção é utilizar técnicas de Dot-Blot. Basicamente, o sobrenadante das cepas sendo avaliadas é filtrado por membranas de nitrocelulose ou PVDF, seguido de etapas de detecção comum a *western blots*. O uso dessa tecnologia, permitiria avaliar com alto fluxo de processamento as cepas secretoras e definir a capacidade de secreção desse biofármaco pela *C. reinhardtii*.

4.4. CONCLUSÃO

Microalgas podem ser utilizadas para a produção de biofármacos, como a HYAL. Esse biofármaco foi utilizado com sucesso para demonstrar que esse sistema consegue produzir essa biomolécula na sua forma ativa, como demonstrados nos ensaios de atividade no lisado celular. As células de *C. reinhardtii* foram capazes de produzir as duas isoformas testadas (HYAL1 e PH-20) em sua forma ativa. Porém a capacidade de secreção dessa biomolécula continua não confirmada. A utilização de métodos mais sensíveis, como Dot blot ou a pré-concentração das amostras talvez permita detectar HYAL no sobrenadante. Além disso, a forma madura de HYAL1 foi produzida no citoplasma sem necessitar de glicosilações, como observado para as construções sem peptídeo sinal. Aparentemente, o fragmento de PH-20, sem a região C-terminal 477 – 490, é importante para produzir essa isoforma em sua forma ativa. Portanto, as construções plasmídias construídas são efetivas em gerar cepas produtoras de biofármacos e a execução técnicas mais sensíveis poderá permitir uma melhor avaliação da capacidade de secreção de HYAL.

5. CAPÍTULO – DESENVOLVIMENTO DE EQUIPAMENTOS DE LABORATÓRIO

5.1. INTRODUÇÃO

Uma vasta gama de grupos de pesquisa experimental depende de equipamentos comprados de empresas especializadas ou construídos no próprio laboratório de pesquisa. Empresas dedicadas a equipamentos de laboratório permitiram o desenvolvimento de equipamentos cada vez mais duráveis e sensíveis, sendo aplicados a um amplo espectro de áreas em ciência. Outro benefício da existência dessas empresas é a sua capacidade de distribuir equipamentos, o que permitiu o estabelecimento de grupos de pesquisa em diferentes partes do mundo. Porém, esse desenvolvimento e capilaridade estão vinculados a um alto custo, restringindo o acesso para algumas regiões do globo, como América Latina e África. Menos de 10% do total de vendas de seis empresas líderes nesse mercado em 2014 foi destinada a essas duas regiões (130), apesar da América Latina e África representarem 25% da população mundial (América Latina 8,6% e África 16,4%) (131). A disparidade entre o percentual total de vendas para essas duas regiões e a parcela da população mundial presente nessas regiões evidencia uma disparidade entre essas regiões, que pode ser um reflexo da desigualdade econômica entre as regiões no globo.

O desenvolvimento da ciência está intrinsecamente ligado ao desenvolvimento de equipamentos de laboratório. Por exemplo, em 1683, Antonie Philips van Leeuwenhoek foi o primeiro a observar e descrever microrganismos com seu microscópio artesanal. Descoberta essa que abriu um novo campo da ciência e só foi iniciada com o desenvolvimento desse microscópio (132). Portanto, desde a balança, o instrumento de medida quantitativo mais antigo (133), até sequenciadores de última geração, equipamentos de laboratório permitem cientistas a alcançarem novos conhecimentos. É necessário destacar que o desenvolvimento de equipamentos está diretamente ligado à busca de novos conhecimentos e à avaliação de teorias, onde esses dispositivos são uma extensão dos nossos sentidos para observar o mundo. Nesse contexto, tecnologias como manufaturas digitais (e.g. impressoras 3D) têm o poder de reduzir custos e permitir a rápida prototipagem de equipamentos e dispositivos para uso em laboratórios de pesquisa (134). Além disso, a capacidade de customização permite a construção de equipamentos para fins específicos, algo dificilmente alcançado no modelo baseado em empresas como provedoras de equipamentos. De fato, inúmeras iniciativas de desenvolvimento de equipamentos de laboratório desenvolveram-se, em grande parte, pela popularização de

impressoras 3D e plataformas de prototipagem eletrônica como o Arduíno® (135). Alguns exemplos de equipamentos de laboratório que foram desenvolvidos utilizando técnicas de manufatura digital e plataformas de prototipagem abertas são: OpenPCR - termociclador para reações de PCR (136), pHduíno - pHmetro desenvolvido utilizando arduíno (137), OpenQCM - microbalança de cristal de quartzo (138) e OpenScope - microscópio com autofócuo (139). Nesse contexto, um dos objetivos específicos do presente trabalho foi o desenvolvimento de equipamentos de laboratório voltados para bioprocessos envolvendo microalgas, mais especificamente, para os sistemas de cultivo como o fotobiorreator. Os equipamentos e dispositivos desenvolvidos foram: um fotobiorreator de 3,5L esterilizável com iluminação artificial, contador de células, suporte de microtubos, cuba e bandeja para eletroforese de agarose, microcentrífuga, sistema a vácuo para purificação de DNA e fotodocumentador de géis de ácidos nucleicos.

5.1.1. MANUFATURA DIGITAL

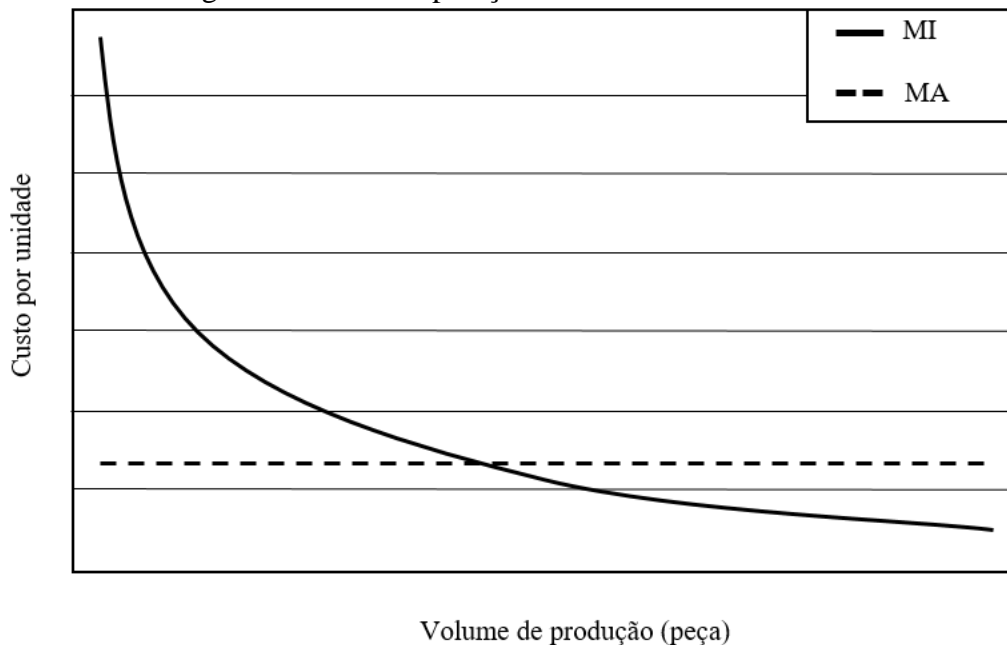
A manufatura digital é uma abordagem integrada de fabricação baseada em sistemas computacionais. Diferentes técnicas de manufatura digital existem e estão separadas em dois grupos, manufatura digital aditiva e subtrativa. Ambas existem e são empregadas em diferentes setores industriais, aumentando a produtividade e controle sobre o processo de fabricação. Apesar de existirem diferenças entre os processos de fabricação, todas envolvem o uso de máquinas numericamente controladas por computador (CNC - *Computer Numerical Control*). O uso dessa tecnologia baseada em computadores permite uma relação direta entre os modelos gerados em *Computer-Aided Design* (CAD) e o processo de fabricação, permitindo rápida customização e ganho de eficiência nos processos fabris. A manufatura digital aditiva baseia-se em processos em que diferentes materiais são adicionados por máquinas para, formar ao final, um objeto que pode ser testado imediatamente após ser produzido. Alguns exemplos de manufatura digital aditiva são: estereolitografia, sinterização por laser e fabricação por filamento fundido por meio de impressão 3D. Em contrapartida, a manufatura digital subtrativa baseia-se na remoção de material para alcançar a forma do objeto almejado. Alguns exemplos de manufatura digital subtrativa são: corte com jato de água, fresa e torno mecânico (140).

Recentemente, impressoras 3D se popularizaram devido a uma redução de até 3 ordens de magnitude em seu custo, tornando essa técnica de manufatura digital aditiva mais acessível (141). A redução de custo se deve ao desenvolvimento de impressoras 3D de código aberto, capazes de utilizar polímeros como PLA e ABS para o processo de fabricação. Essas

impressoras tornaram possível um maior acesso a esse tipo de equipamento, gerando uma comunidade de desenvolvedores compartilhando modelos em diversos repositórios. Repositórios como o Thingiverse possuem milhares de modelos prontamente acessíveis para baixar e serem utilizados e modificados conforme a necessidade da pesquisa sendo conduzida (142). Apesar da grande maioria dos modelos disponíveis estar relacionado a aplicações do cotidiano, é possível observar um aumento do interesse das aplicações em ciência. Esse crescente aumento do interesse é observado pelo surgimento de revistas dedicadas a manufatura digital aditiva como a Additive Manufacturing da Elsevier (143), repositórios dedicados a aplicação em ciência como o NIH 3D Print Exchange (144), e o número crescente de projetos de dispositivos e equipamentos para ciência.

Essas tecnologias de manufatura digital possuem um nicho importante em ciência, principalmente para equipamentos de laboratório que estão constantemente sendo melhorados e projetados para novas aplicações. Essa constante renovação, torna processos de manufatura, cujo custo seja independente da complexidade e volume de produção do objeto, vantajosos sobre processos de manufatura com elevado potencial de redução de custo, como a moldagem por injeção. O Gráfico 5-1 apresenta uma representação da tendência do custo por unidade de peças fabricadas por moldagem por injeção e manufatura digital aditiva.

Gráfico 5-1: Análise da tendência do custo de produção por unidade utilizando moldagem por injeção e manufatura digital aditiva. Comparação entre dois sistemas de manufatura.

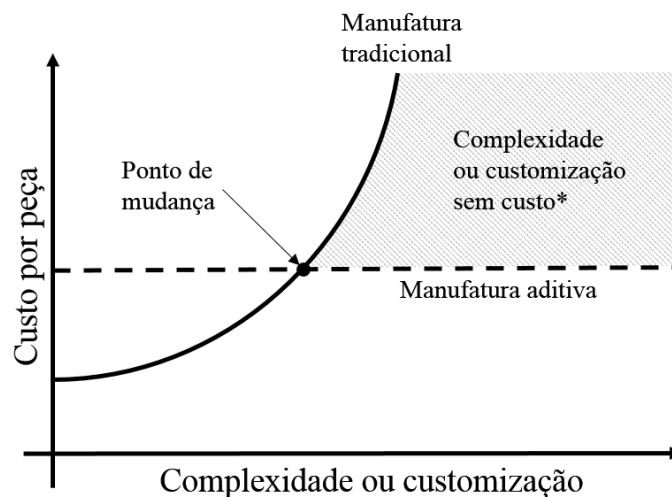


MI – Moldagem por injeção. **MA** – Manufatura digital aditiva.

Fonte: Adaptado de Atzeni et al. (145).

Essa necessidade de customização e modificação de peças e equipamentos de laboratório torna a manufatura digital aditiva uma alternativa interessante. Apesar de grande parte das necessidades de laboratórios de pesquisa serem contempladas por equipamentos produzidos por manufatura tradicional, há um espaço a ser preenchido por manufatura digital, especialmente quando considerado o custo envolvido. O Gráfico 5-2 representa a relação entre aumento do custo com aumento da complexidade da peça produzida por manufatura tradicional e por manufatura aditiva. Existe uma região no gráfico em que é vantajoso o uso manufatura digital e é um espaço que começa a ser explorado com laboratórios de pesquisa adotando essas técnicas de fabricação e compartilhando seus projetos em repositórios, como o NIH 3D Print Exchange.

Gráfico 5-2: Representação gráfica do custo por peça com o aumento da complexidade ou customização necessária na fabricação. Comparação entre manufatura tradicional e a manufatura aditiva.



*Não há custo adicional para aumento da complexidade ou customização de peças quanto ao custo de fabricação em manufatura aditiva. Ponto de mudança indica o ponto em que o custo é menor utilizando manufatura aditiva. Fonte: Adaptado de Conner et al. (146).

5.1.2. FOTOBIORREATORES

O cultivo de microalgas é realizado em biorreatores denominados fotobiorreatores, que se diferem dos biorreatores tradicionalmente utilizados em cultivos microbianos, como o vaso agitado, por prover adicionalmente ao cultivo uma fonte de luz (147). O formato, custo e eficiência desses fotobiorreatores variam de acordo com o projeto utilizado para sua construção, principalmente pelo sistema utilizado para suprir iluminação ao cultivo (147). O sistema de escolha para a produção de biomassa de microalgas se concentrou em fotobiorreatores abertos,

atingindo a produção de milhares de toneladas por ano, principalmente por sua baixa complexidade de construção e custo (148). Apenas algumas centenas de toneladas são produzidas em fotobiorreatores fechados (21). Fotobiorreatores abertos são sistemas abertos em que o cultivo é conduzido normalmente em lagos artificiais com agitação conduzida por pás e baixa profundidade (147). Apesar dos benefícios relacionados com o baixo custo de produção, fotobiorreatores abertos impossibilitam o cultivo em condições axênicas e normalmente apresentam baixa produtividade (149). Os fotobiorreatores fechados possuem algumas vantagens sobre sistemas abertos, como proteção do cultivo contra outras microalgas e contaminantes, maior produtividade por área e reduzida perda de água por evaporação. Porém, essas vantagens vêm associadas a um alto custo de construção por área quando comparado aos sistemas abertos. Esse elevado custo, impede o uso desse modelo de reator por exemplo para a produção de biocombustíveis. De fato, para esse propósito o custo por área não deve exceder 40 €/m², o que não é alcançado pelos reatores fechados desenvolvidos até o momento, em que estimativas do custo por área de fotobiorreatores estão entre 750-2400 €/m² (115). Na Tabela 5-1 está apresentada uma comparação entre fotobiorreatores fechados e abertos.

Tabela 5-1: Comparação das características entre os fotobiorreatores fechados e abertos.

Fator	Fotobiorreator fechado	Fotobiorreator aberto
Espaço necessário	Moderado	Alto
Perda por evaporação	Baixo	Alto
Eficiência de adição de CO ₂	Alta	Baixa
Manutenção	Alta	Baixa
Risco de contaminação	Baixo	Alto
Energia adicionada para mistura	Alta	Baixa
Custo	Alto	Baixo
Capacidade de esterilização	Presente	Ausente

Fonte: Adaptado de Borowitzka (149)

Além dessas diferenças entre fotobiorreatores fechados e abertos, está a diversidade de modelos fechados, em que não houve uma convergência no projeto desses reatores como para o caso de reatores de organismos heterotróficos como o vaso agitado. Existem diferentes modelos de fotobiorreatores fechados, variando em forma e material empregado para sua produção (148,149). Alguns modelos são: o fotobiorreator plano, anelar e tubular e alguns materiais empregados na fabricação são: o vidro borossilicato, polietileno de baixa e alta densidade e acrílico PMMA. Dentro dessa diversidade de modelos de fotobiorreatores, os tubulares apresentam para alguns cultivos vantagens em termos de produtividade, chegando a 7 vezes a produtividade em comparações com fotobiorreatores em coluna (150). Esses

fotobiorreatores possuem uma elevada relação de superfície irradiada por volume, o que evita problemas de sombreamento em cultivos densos e podem ser construídos com sistema de *air lift*, o que facilita o emprego de técnicas axênicas.

Para estudos em laboratório, o fotobiorreator tem que possuir várias características como: ser de fácil manuseio e manutenção, permitir autoclavagem para esterilização, possuir sistema de luz com intensidade controlada e possuir sistemas de acompanhamento do cultivo como pHmetro, densitômetro e termômetro. Algumas dessas características foram incorporadas ao fotobiorreator desenvolvido no presente estudo como descrito na seção resultados deste capítulo, sendo a capacidade de esterilização o principal item no desenvolvimento do fotobiorreator.

Cultivos de microalgas requerem ainda uma fonte de radiação eletromagnética (luz) em uma curta faixa do espectro (*Photosynthetically active radiation* (PAR) – 400 a 700 nm), assim como nutrientes na forma de sais e vitaminas (151). Os meios de cultivo suprem a demanda por sais e vitaminas, enquanto que a luz é suprida por uma fonte externa, como lâmpadas incandescentes, lâmpadas fluorescentes, LEDs (*Light emitting diodes*) e luz solar. A iluminação artificial aumenta o rendimento de bioprocessos pois, por vezes uma quantidade exata de luz é necessária pelo organismo fotossintetizante cultivado (152) e modulação da iluminação artificial é possível. Microalgas em seu habitat natural utilizam luz solar como fonte de energia luminosa e alguns sistemas de produção empregando microalgas também fazem uso dessa fonte. O emprego de energia solar reduz drasticamente o consumo de energia do sistema, permitindo baixos custos de produção. Porém, estão normalmente relacionados a menores produtividades quando comparados com sistemas de iluminação artificial (114). Em um sistema de laboratório, a versatilidade de sistemas de iluminação artificial, aliada a facilidade para trabalhos em contenção, tornam esse sistema uma boa escolha para laboratório de pesquisa. Para o presente trabalho foi escolhido o sistema de iluminação por LEDs devido a sua alta eficiência energética (LED branco = $2,68 \mu\text{mol-fóton s}^{-1}\text{W}^{-1}$ contra Lâmpadas fluorescentes $1,25 \mu\text{mol-fóton s}^{-1}\text{W}^{-1}$), facilidade de modulação de sua intensidade, capacidade de iluminação homogênea e disponibilidade em diferentes comprimentos de onda (114).

5.1.3. EQUIPAMENTOS DE PROJETO ABERTO – OPEN HARDWARE

Além da construção do fotobiorreator, outros 4 equipamentos de laboratório foram construídos. A lista de projetos de equipamentos desenvolvidos sobre a licença de *open source* aumenta a cada dia, com vários dedicados a aplicações em ciência. A Tabela 5-2 lista alguns exemplos e suas fontes para laboratórios de biologia. O maior exemplo do movimento *open source* é o sistema operacional GNU/Linux. Ele foi publicado na década de 90 e, é hoje, o sistema mais utilizado em supercomputadores, servidores e aparelhos de celular (Android) e, aumenta sua participação em computadores pessoais a cada ano (153). GNU/Linux é um exemplo do potencial de projetos abertos, onde comunidades podem constantemente melhorar um projeto aberto.

Tabela 5-2: Lista de *open hardwares* para laboratórios de biologia.

Área	Projeto	Fonte
Microscopia	Microscópio de Raspberry Pi	http://2015.igem.org/Team:Cambridge-JIC
	Foldscope	http://www.foldscope.com/
Biologia molecular	Termociclador (PCR)	http://openpcr.org/
	Open qPCR	https://www.chaibio.com/openqpcr
	Centrifuga	https://github.com/BioHackAcademy/BHA_Centrifuge
	Dremelfuge	http://www.thingiverse.com/thing:1483
	Colorometer	http://www.thingiverse.com/thing:73910
	Micropipeta	http://www.thingiverse.com/thing:73910
Outros	Agitador magnético	http://hackaday.com/2014/09/18/diy-magnetic-stirrer-looks-professional/
	Bomba de injeção	http://www.thingiverse.com/thing:210756
	Bomba peristáltica	http://www.thingiverse.com/thing:529863
	OpenQCM	http://openqcm.com/
	pHduino	http://phduino.blogspot.com.br/
	Micromanupulador	http://www.thingiverse.com/thing:239105

Fonte: Autor

No presente trabalho, 2 projetos abertos foram construídos e melhorados a partir de projetos abertos, uma microcentrífuga e uma cuba de eletroforese. Destaca-se, ainda, que foi desenvolvido um projeto original de contador de células. Todos esses projetos foram desenvolvidos para serem utilizados em laboratório. O contador de células é um microscópio *in situ* acoplado a um computador para contagem do número de células em fluxo, para ser empregado no acompanhamento de bioprocessos microbianos. O primeiro microscópio *in situ* (ISM) foi desenvolvido em 1990 [27] e, desde então, tem sido melhorado por vários

pesquisadores para a monitorização *in situ* de leveduras, de células de mamíferos e cultivos com microcarreadores, assim como em processos de cristalização de aminoácidos, proteínas e fármacos [28]. No presente trabalho, um modelo *open source* está sendo desenvolvido, o OpenCyclop, baseado em webcams e chips de microfluídica (μ -Slide I IBIDI®). Além desse equipamento, outros equipamentos essenciais em um laboratório de biologia molecular foram contruídos e estão listados a seguir.

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1. MATERIAIS

Filamentos de 1,75 mm de PLA - Ácido polilático de grau comercial e ABS – copolímero de acrilonitrila, butadieno e estireno. μ -Slide I IBIDI® (Dimensões do canal (C x L x A) 50 mm x 5 mm x 0.4 mm), tratado para cultura de células, estéril. Fita LED branco neutro de 5 m, 12V. Chapas de acrílico transparente de 5 mm e 3 mm. Webcam Labtec 1200 Logitech®. Chapa de polipropileno de 8 mm e 20 mm. Peças de metais utilizados para o fotobiorreator, são de aço inoxidável DIN/ISO A2. Placa de fibra de madeira de média densidade (MDF) de 3 e 6 mm. Kit de elastomero bi componente Redelease® Borracha Azul PS e Redelease® Borracha de silicone Rigida (Vermelha).

5.2.2. MÉTODOS

Para a construção dos equipamentos foram utilizadas técnicas de manufatura digital aditiva e substrativa, assim como ferramentas manuais. Os equipamentos construídos foram: fotobiorreator, painel de LED, contador de células, microcentrífuga, fotodocumentador e cuba de eletroforese. Os dispositivos construídos foram: estante de tubos de microcentrífuga, molde para construção de amostrador e sistema para preparo de miniprep a vácuo. A construção dos equipamentos foi realizada com o auxílio de alunos de graduação e pós-graduação de diferentes institutos.

5.2.2.1. Manufatura digital aditiva

Para a produção de equipamentos e dispositivo por manufatura digital aditiva, foram utilizados os polímeros de ABS e PLA. Os arquivos em formato estereolitográfico (.stl) foram carregados no software Repetier-Host e configurados para a impressora 3D Solidoodle 4

(Dimensão de impressão: 200 mm x 200 mm x 200 mm). O arquivo contendo o comando numérico computadorizado (CNC - gcode) foi gerado utilizando o Slic3r v 1.1.7. Impressões em PLA foram executadas utilizando temperatura de extrusão de 175 °C e temperatura de mesa de 70 °C. Impressões em ABS foram executadas utilizando temperatura de extrusão de 225 °C e temperatura de mesa de 100 °C. Os arquivos das peças e equipamentos foram gerados no software 123D®, da empresa AUTODESK, Inc.

5.2.2.2. Manufatura digital subtrativa

Para a produção de equipamentos e peças por manufatura digital subtrativa, foram utilizados chapas de acrílico de 3 mm e 5 mm, assim como MDF de 3 e 6 mm. A técnica utilizada foi o corte a laser na máquina Ruijie Laser RJ-1060.

5.2.2.3. Peças de silicone

Peças de silicone foram confeccionadas para o fotobiorreator, para selar o frasco presente no fotobiorreator, na confecção do amostrador e para criar moldes para peças de poliuretano. Silicones ou polissiloxanos são materiais resistentes ao calor e agentes químicos, flexíveis e utilizados como material para selar conexões. Por exemplo, a vida útil de elastômeros de silicone podem chegar a 15.000 h a 148 °C e 15-30 minutos a 371 °C (154). Assim, peças de silicone foram produzidas seguindo a instrução do fabricante (Redelease®). A base de silicone foi misturada com agente vulvanizador, degazeificada com bomba de vácuo e câmara de vácuo, com posterior deposição da mistura no molde pretendido. O material foi deixado para reagir por pelo menos 4 horas, seguido de demoldagem do mesmo.

5.2.2.4. Testes de autoclavação

Os fotobiorreatores construídos durante o projeto foram desenvolvidos a partir de versões anteriores presentes no laboratório de Biotecnologia Microalgal do Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (155), de modo que pudessem sofrer autoclavação, tendo em vista que no caso de trabalho com células modificadas geneticamente, que é objetivo deste trabalho, é imprescindível que ocorra esterilização do fotobiorreator. Os fotobiorreatores foram inseridos

no interior da autoclave e submetidos ao processo de esterilização, por vapor saturado. O ciclo de autoclavação empregado foi de 121 °C, por 30 minutos. Após esterilização, a estrutura do reator foi avaliada quanto à deformação de peças.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. DESENVOLVIMENTO DE FOTOBIORREATOR – 3,5L

5.3.1.1. Fotobiorreator – 3,5L

Diferentes versões do fotobiorreator foram construídas para alcançar uma versão funcional que preenchesse os requisitos para o estudo: sistema fechado, esterilizável por autoclavação e prático em seu manuseio. As características e atualizações inseridas em cada versão estão sumarizadas na Tabela 5-3.

Tabela 5-3: Comparação entre as diferentes versões dos fotobiorreatores construídos.

ITEM	Versões (v)			
	v1	v2	v3	v4
FOTOBIORREATOR				
Estrutura esterilizável	+	-	+	+
Suporte para frasco	-	Barra roscada	Barra roscada	Placas de PP*
Tampa para frasco	-	8 mm	8 mm	20 mm
Sistema para fixação de pHmetro	-	-	+	+
Amostrador	-	Sem fixador	Fixador com tampa de PP*	Fixador com tampa de silicone
Selo de silicone para tampa	-	-	+	+
Teflon em conexões vidro-silicone	-	-	-	+

*Polipropileno

A Fotografia 5-1 demonstra a primeira versão da estrutura do fotobiorreator (v1). Ela apresenta os componentes básicos para o fotobiorreator tubular, porém não possui elementos essenciais para aplicação neste trabalho, como o degaseificador. Contudo, foi possível realizar teste de esterilização da estrutura e tubos, demonstrando a aplicabilidade da estrutura de polipropileno e barras roscada de aço inoxidável.

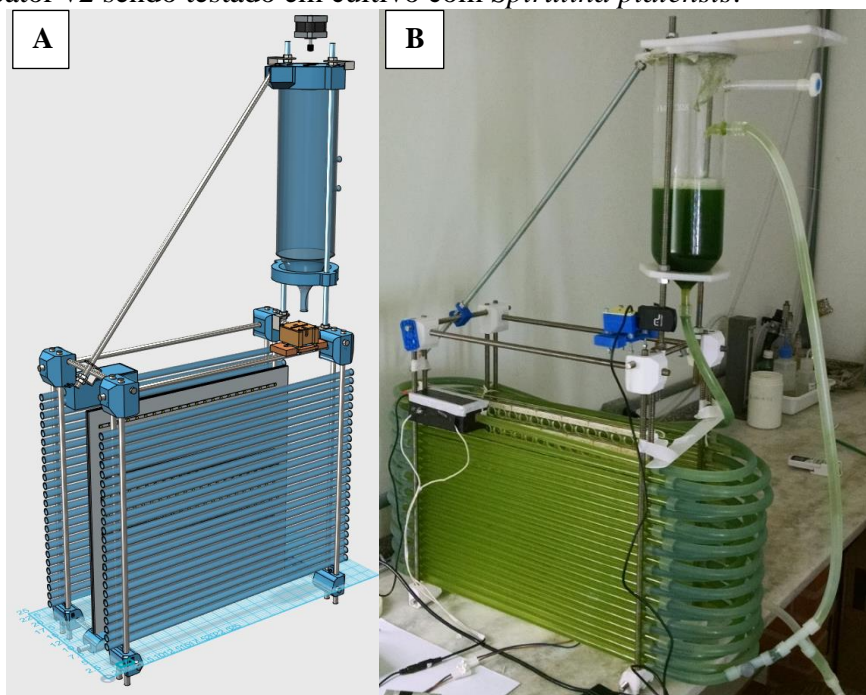
Fotografia 5-1: Fotobiorreator v1 3,5L. Tubos de vidro borossilicato e silicone apoiados em estrutura de polipropileno e barras roscadas de aço inoxidável.



Fonte: Autor

Na próxima iteração - fotobiorreator v2 - modificações foram feitas para alcançar uma estrutura mais rígida e aplicar o uso de técnicas de manufatura digital aditiva, como a impressão 3D. O intuito era facilitar atualizações nas peças estruturais do fotobiorreator. A Fotografia 5-2 apresenta o projeto em arquivo CAD, o protótipo montado e em funcionamento. Apesar do uso de impressoras 3D serem atrativas para o desenvolvimento de fotobiorreatores, os plásticos disponíveis para impressão não possuem as características térmicas necessárias para todo o bioprocessamento almejado pois perdem rigidez durante a autoclavação. O processo de autoclavação na presença de carga sobre as peças causaram deformações, levando à inviabilização dessa técnica de esterilização. Soluções como preparo de moldes (e.g. moldes de silicone) são uma alternativa quando aliados a polímeros de poliuretano. Alguns polímeros com maior resistência térmica foram testados como o Smooth-Cast ONYX®, com a temperatura de transição vítrea de 121 °C. Apesar de funcionais, estes polímeros não foram adotados por seu alto custo e necessidade de importação.

Fotografia 5-2: Fotobiorreator v2 3,5L. **A** – Projeto em CAD do fotobiorreator v2. **B** – Protótipo do fotobiorreator v2 sendo testado em cultivo com *Spirulina platensis*.



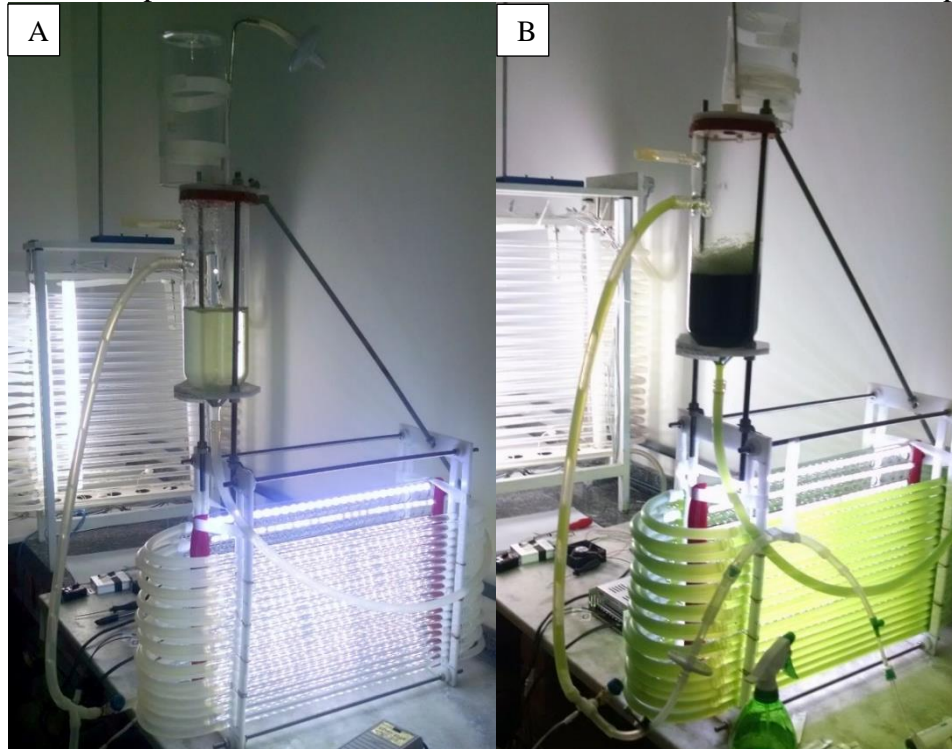
Fonte: Autor

Na iteração subsequente - fotobiorreator v3 - as peças foram novamente modificadas para barras roscadas de aço inox e polipropileno. Polipropileno possui alta resistência térmica e química, assim como biocompatibilidade (156). Apesar do polipropileno não ser diretamente aplicável para técnicas de manufatura digital como, impressão 3D e corte a laser, é possível o uso de máquinas de CNC *router* para confecção das peças. A disponibilidade de laboratórios de fabricação digital (Fablabs) na cidade de São Paulo permitiriam a fabricação por essa técnica, porém um maior período de tempo seria necessário para o desenvolvimento do fotobiorreator. Outra alternativa, seria utilizar chapas de polipropileno com espessuras menores para permitir o seu corte em cortadoras a laser. O empilhamento de peças com espessuras menores permitiriam formar a peça estrutural com a espessura necessária para suportar o peso dos tubos e frascos (~8mm). Porém, essas peças estruturais foram construídas com o uso de ferramentas manuais devido ao tempo necessário para testar e validar essas soluções.

O sistema de suporte do frasco sobre a estrutura utilizou o mesmo princípio aplicado para o fotobiorreator v2, uma barra roscada conectando o topo do frasco com a parte traseira do fotobiorreator, assim como alças metálicas na porção inferior para travar o frasco na posição demonstrada na Fotografia 5-3. Apesar da resistência térmica, o processo de autoclavação causou deformação na estrutura de polipropileno nas porções de menor espessura. Adição de fios de cobre, envoltos nessa porção da estrutura bloqueou a deformação e permitiu o uso do

fotobiorreator com estrutura de polipropileno. A Fotografia 5-3 demonstra o fotobiorreator v3 em teste de cultivo com *C. reinhardtii*, cepa selvagem CC1690.

Fotografia 5-3: Fotobiorreator v3 3,5L. **A** – fotobiorreator v3 em posição de cultivo, com cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii*, cepa selvagem CC1690 a $1,75 \times 10^5$ células por mL. **B** – fotobiorreator v3 após 5 dias de cultivo com densidade celular de 2×10^7 células por mL.

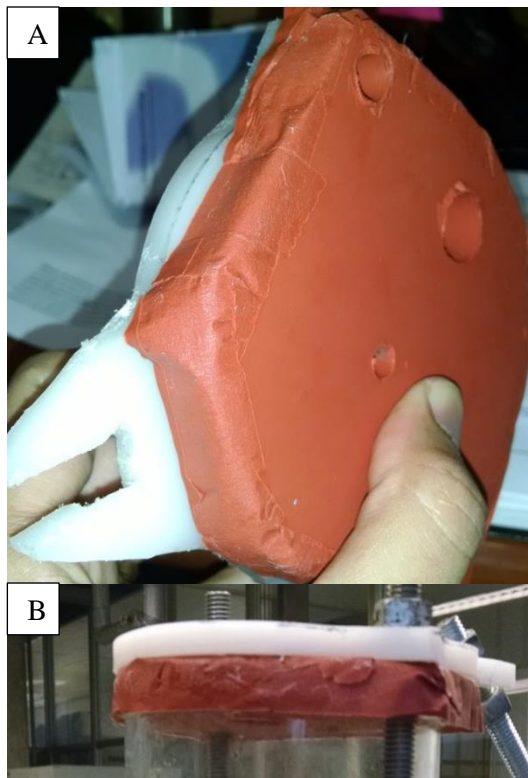


Fonte: Autor

Outra atualização incorporada ao fotobiorreator v3 foi um selo de silicone entre a tampa e o frasco, permitindo vedamento do mesmo. A Fotografia 5-4 apresenta uma foto aproximada do selo de silicone. O selo, junto com o fotobiorreator foram testados quanto à capacidade de autoclavação como exemplificado na Fotografia 5-5.

Apesar do reator fotobiorreator v3 ter alcançado os requerimentos mínimos para um sistema fechado autoclavável, uma nova versão foi desenvolvida para incorporar atualizações, antes da construção de réplicas para a continuidade do trabalho.

Fotografia 5-4: Selo de silicone. **A** – Foto aproximada do selo de silicone, com cavidades para tubos e sondas. **B** – Selo em posição de trabalho no fotobiorreator v3 3,5L.



Fonte: Autor

O fotobiorreator v3 possuía como base e tampa dos frascos, polipropileno de 8 mm de espessura, após alguns ciclos de autoclavagem ambas peças apresentaram deformações, que apesar de não comprometerem o processo, foram substituídas por peças de 20 mm de espessura. Outra modificação foi a saída de ar com filtro, que foi encurtada para manter o filtro em posição vertical durante o processo de autoclavagem para evitar condensação em seu interior.

Fotografia 5-5: Fotobiorreator v3 3,5L dentro da autoclave, em posição desmontado.

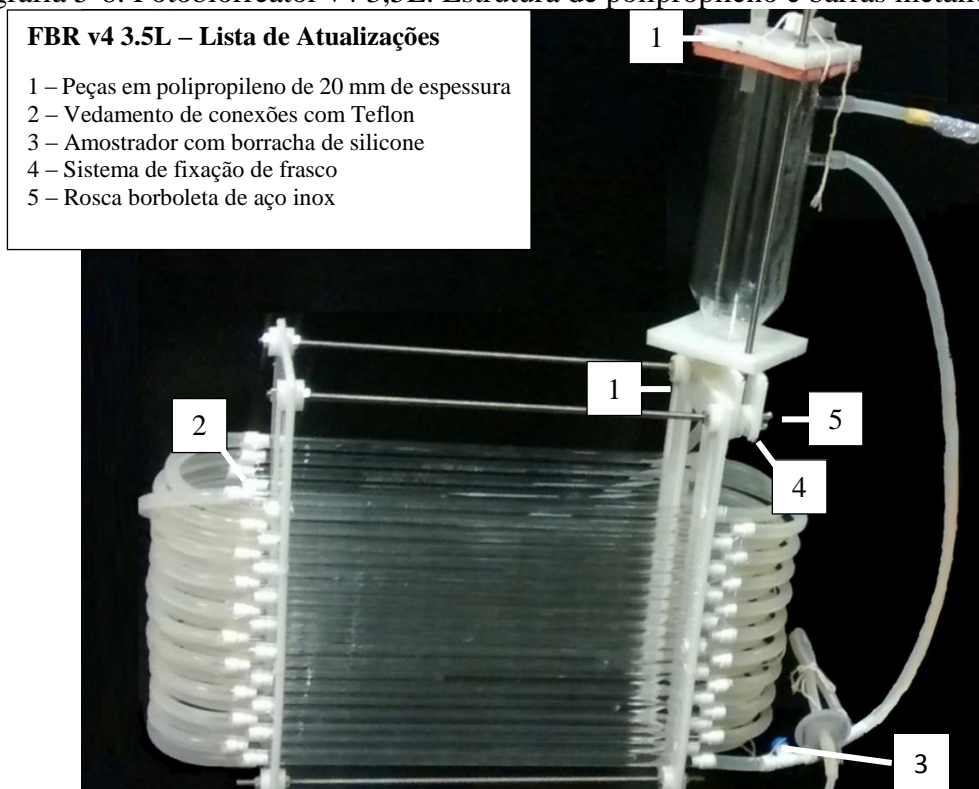


Fonte: Autor

A Fotografia 5-6 demonstra o fotobiorreator v4 3,5L e sumariza as modificações. Na versão fotobiorreator v3, as conexões tubos de vidro e de silicone não foram seladas com fitas de teflon, porém, no fotobiorreator v4, essas fitas foram adicionadas para evitar vazamento que ocorriam em algumas das conexões. Outra atualização inserida foi no amostrador que em versões anteriores utilizavam tampas de borrachas, fixadas utilizando tampas de polipropileno e fios de cobre. A nova versão de amostrador é feita com o tubo “T”, silicone para vedamento da conexão e material para punção com agulha para amostragem, fios de nylon para afixamento do silicone (Fotografia 5-7).

Outra modificação incorporada foi o sistema de fixação do frasco a estrutura do fotobiorreator (Fotografia 5-8). O novo sistema simplificou o manuseio e troca de posição do fotobiorreator de montado para desmontado e, reduziu a quantidade de barra roscada assim, reduziu também o custo de fabricação. Basicamente, o sistema de fixação são duas placas de polipropileno (5 cm x 20 cm x 0,8 cm), fixas na barra transversal da estrutura, com espaçadores de polipropileno, onde a base do frascos é fixada para a posição montada. Os espaçadores são necessários para permitir que o tubo de silicone vindo dos frascos passe sem ser comprimido. Além disso, roscas de aço inox “borboleta” foram adicionadas para facilitar o manuseio na ausência de ferramentas.

Fotografia 5-6: Fotobiorreator v4 3,5L. Estrutura de polipropileno e barras metálicas.



Fotografia 5-7: Amostrador fabricado com silicone e tubo “T” de polipropileno. Fixação do silicone feita com fio de nylon.



Fonte: Autor

Fotografia 5-8: Sistema de fixação do frasco do fotobiorreator v4 3,5L.



Fonte: Autor

Outros fotobiorreatores v4 foram construídos seguindo o modelo do primeiro protótipo e estão atualmente em uso no laboratório. Em conjunto com o painel de LED v3, que será apresentado no tópico a seguir, os fotobiorreatores v4 podem ser usados para o cultivo de culturas axênicas e cepas recombinantes. Os fotobiorreatores v4 possuem um volume máximo operacional de 3,5L, mínimo de 2,5L, intensidade máxima de $160 \mu\text{mol fotons/m}^2\text{s}$, à 25°C . O fluxo do meio de cultivo dos fotobiorreatores pode ser ajustado até 800 mL por min de vazão. Nesse fluxo, ele apresentou uma perda média de 1% de volume por dia devido à evaporação. No entanto, a adição de sistema de condensação na saída de ar pode reduzir a taxa de evaporação ainda mais. Os parâmetros alcançados com o fotobiorreator v4 são suficientes para o cultivo de diferentes cepas de microalgas, sejam elas recombinantes ou não. Experimentos foram conduzidos com este fotobiorreator e, os resultados estão apresentados no Capítulo 3.

5.3.1.2. Painel de LED

Diferentes versões do painel de LED foram realizadas ao longo deste trabalho. As diferentes versões foram desenvolvidas com o objetivo de testar materiais e avaliar a aplicabilidade de componentes. As características das versões de painéis de LED estão sumarizadas na Tabela 5-4.

Tabela 5-4: Comparação das características entre 3 versões de painéis de LED desenvolvidos.

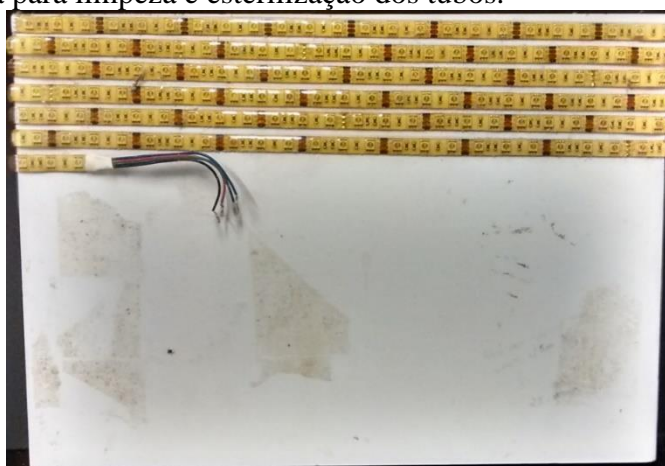
PAINEL de LED	v1	v2	v3
LEDs RGB*	+	-	-
LEDs branco	-	+	+
Estrutura de suporte de madeira	+	+	-
Estrutura de suporte de acrílico	-	-	+

*Vermelho, verde e azul (red, green and blue)

Fonte: Autor

A Fotografia 5-9 demonstra a primeira iteração de prototipagem, utilizando LEDs RGB. Essa versão conseguiu irradiar $60 \mu\text{mol f\u00f3tons/m}^2\text{s}^1$ nos tubos do fotobiorreator e possui a capacidade de combinar diferentes frequ\u00eancias de luz (vermelho, verde e azul). Por\u00e9m, ap\u00f3s o uso cont\u00ednuo ocorreram mudan\u00e7as no padr\u00e3o de cores, provavelmente devido a aquecimento nos circuitos dos LEDs. Um poss\u00edvel teste para verificar esta hip\u00f3tese seria alterar o material de suporte (madeira) para um com maior coeficiente de transfer\u00eancia de calor, como metais (e.g. alum\u00ednio). Por\u00e9m, o uso de metais envolve t\u00e9cnicas de fabrica\u00e7\u00e3o n\u00e3o dispon\u00edveis para o presente estudo e apresentam custo elevado. As dimens\u00f5es do painel de LED v1 (390mm x 490 mm) permitiram f\u00e1cil instala\u00e7\u00e3o a estrutura do fotobiorreator, simplificando o processo de remo\u00e7\u00e3o para autoclavagem do mesmo.

Fotografia 5-9: Prot\u00f3tipo de painel de LED v1. Painel facilmente remov\u00edvel, permitindo remo\u00e7\u00e3o da estrutura para limpeza e esteriliza\u00e7\u00e3o dos tubos.

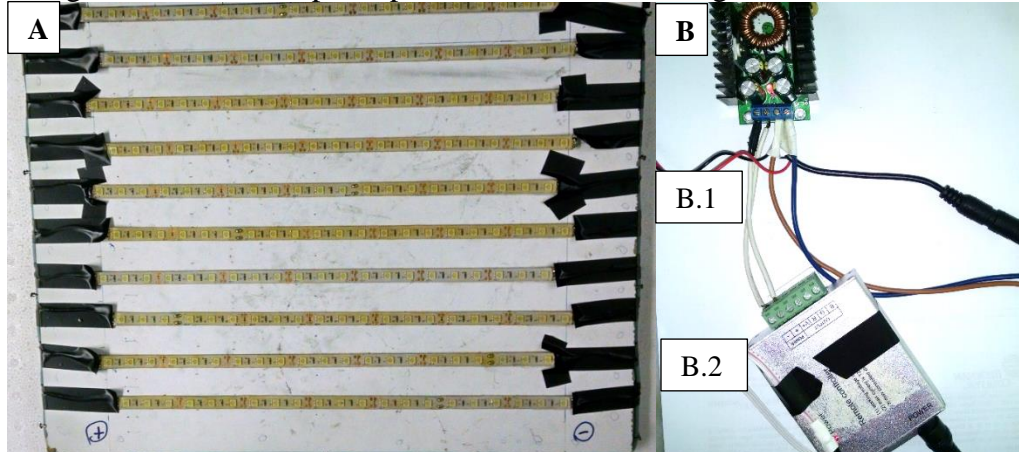


Fonte: Autor

Na itera\u00e7\u00e3o seguinte, um LED branco neutro foi escolhido e distribuído de forma mais homog\u00eanea sobre a \u00e1rea do suporte. A Fotografia 2-10 demonstra o prot\u00f3tipo v2. Essa vers\u00e3o atingiu uma intensidade luminosa de $200 \mu\text{mol f\u00f3tons/m}^2\text{s}$, na dist\u00e2ncia dos tubos do fotobiorreator ($\sim 7,3$ cm). Nessa vers\u00e3o a intensidade luminosa \u00e9 ajust\u00e1vel com o uso do regulador

de tensão do tipo *Step-Down* (Fotografia 5-10). Intensidade luminosa emitida por LEDs varia de acordo com a voltagem fornecida, no arranjo utilizado, voltagens de 6-12V são capazes de promover ativação do LED em diferentes intensidades.

Fotografia 5-10: Protótipo de painel de LED v2 com regulador de intensidade de luz

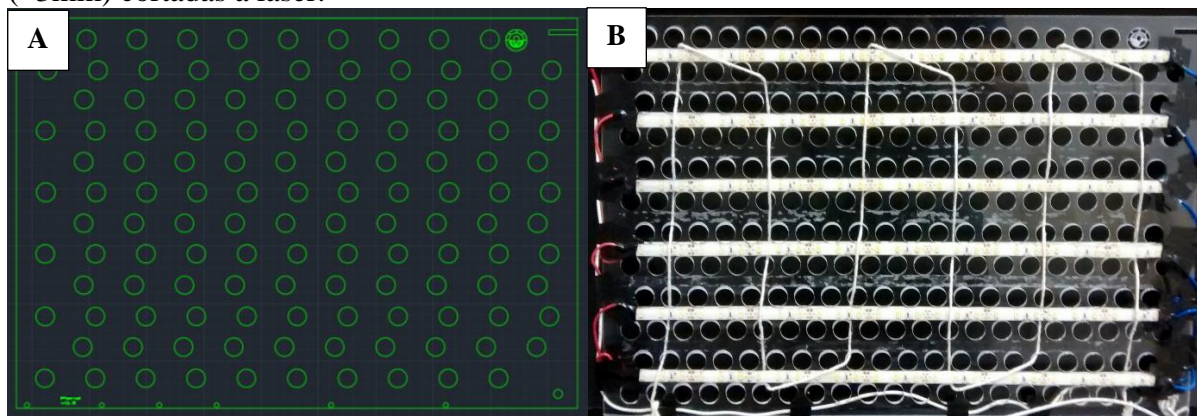


A – Painel de LED com tiras distribuídas de forma mais homogênea. **B** – Regulador de tensão do tipo *Step-Down* (**B.1**) com fonte de energia (**B.2**).

Fonte: Autor

A próxima iteração teve por objetivo reduzir o peso do painel, permitir livre circulação de ar e padronizar a distância entre as tiras de LED. Esses objetivos foram alcançados utilizando chapas de acrílico transparente (~3mm) cortadas a laser, a partir de projeto desenvolvido em AutoCAD 2016®. Essa nova versão atingiu uma intensidade luminosa de $160 \mu\text{mol f\u00f3tons/m}^2\text{s}$, na distância dos tubos do fotobiorreator (~7,3 cm), baixo aquecimento depois de horas de trabalho (~240h) e foi adotada para a continuidade do estudo. Além disso, menos tiras de fita de LED foram utilizadas nessa versão (Fotografia 5-11).

Fotografia 5-11: Projeto e protótipo de painel de LED v3. A – Projeto do painel de LED em arquivo CAD. B - Protótipo de painel de LED v3 usando chapas de acrílico transparente (~3mm) cortadas a laser.



Fonte: Autor

Apesar do desenvolvimento do painel de LED ter atingido os requisitos mínimos para cultivos de microalgas, algumas atualizações expandiriam o espectro de experimentos possíveis. Versões futuras do painel pretendem adicionar o controle dinâmico da intensidade luminosa, podendo ser alcançado por microcontroladores e reguladores de voltagem digitais. Essa habilidade, acoplada a um densitômetro permitiria estudos de correlação de intensidade luminosa e densidade do cultivo de maneira dinâmica, regulando a intensidade luminosa de acordo com a densidade celular do cultivo. Outra atualização é a capacidade de uso de luz em pulsos rápidos, que permitiria o estudo de cultivos em diferentes frequências de pulsos e intensidades (157). Ainda, outra modificação envolve o uso de LEDs com comprimentos de ondas específicos. Estudos mostraram que o uso de luz azul (~470nm) e vermelha (~680nm) influenciam a velocidade de crescimento, composição de pigmentos e de lípidos por célula (158,159). O interessante é que, em uma mesma velocidade de crescimento com o uso de fontes de luz de espectro curto, alcança-se uma maior eficiência de conversão energética de fóton emitido por tempo do que fontes com amplo espectro, uma vez que uma maior porcentagem é absorvível por pigmentos celulares. Contudo, LEDs com comprimentos de ondas específicos possuem diferentes eficiências de conversão energética e, a avaliação de custo energético precisa levar em consideração essa eficiência. Em estudo feito por Wang et.al foi encontrado que a luz vermelha apresentou maior eficiência energética para cultivos com *Spirulina platensis* (160). Essa eficiência é importante pois afeta diretamente a relação custo/produto nos bioprocessos de microalgas com iluminação artificial (114).

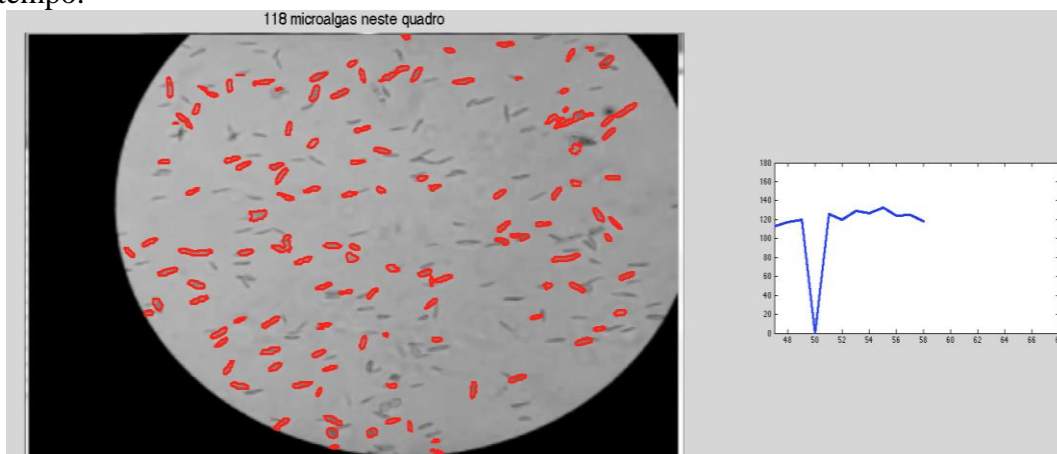
5.3.1.3. Open cyclop - ISM Microscópio

O protótipo de contador de células foi construído utilizando manufatura digital aditiva para criar uma estrutura para fixação de uma camera de microfluidica a um microscópio digital contruído a partir de uma webcam. Webcams são cameras com lentes de campo expandido, as lentes que compoe a webcam ao serem invertidas proprisciam magnificação de aproximadamente 400X. Um teste da magnificação utilizando o microscópio pode ser visto no link:

<http://www.youtube.com/watch?v=MYhmtUjVW7E&feature=share>

O programa que irá realizar a análise da imagem em tempo real, também está sendo desenvolvido. O programa foi desenvolvido em MATLAB®, pelo aluno de mestrado Danilo Vieira do Instituto Oceanográfico. A Fotografia 5-12 exemplifica um resultado da análise do programa.

Fotografia 5-12: Análise do software de contagem de células. Contornos vermelhos indicam as células identificadas pelo programa. Gráfico na porção direita demonstra a contagem realizada pelo tempo.



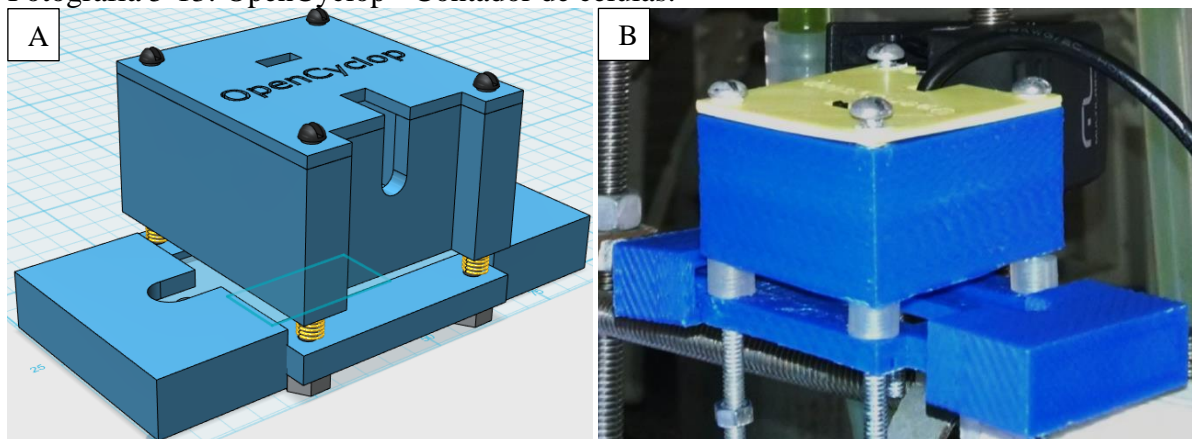
Fonte: Autor

No endereço a seguir é possível acompanhar o programa em execução, realizando a contagem de células em um fragmento de vídeo:

<https://www.youtube.com/watch?v=VIwjraNfmkQ>

O dispositivo depende de um *chip* de microfluidica que é posicionado na frente da lente da camera, através da estrutura impressa (Fotografia 5-13). O chip utilizado para essa versão foi o μ -Slide I IBIDI® (Dimensões do canal (C x L x A) 50 mm x 5 mm x 0.4 mm).

Fotografia 5-13: OpenCyclop - Contador de células.



Nota: **A** – Modelo CAD da estrutura do contador de células. **B** – Protótipo fabricado.
Fonte: Autor

Apesar da capacidade de contar células em fluxo, o OpenCyclop não foi avaliado em condições de cultivo. As próximas etapas no desenvolvimento desse equipamento irão avaliar o uso de linguagem de programação aberta, uso de módulos especializados de camera (pi Camera) e associação com bombas peristálticas de projeto aberto. Essas modificações tem o potencial de acelerar o processo de desenvolvimento desse equipamento, uma vez que aumenta a acessibilidade do projeto a outros pesquisadores que poderão modificar e melhorar o projeto a partir de arquivos dos códigos abertos do projeto.

5.4. CONCLUSÃO

Foi possível a construção de fotobiorreator esterilizável em autoclave, e esses equipamentos estão sendo utilizados no laboratório. Esse fotobiorreator foi empregado nas etapas subsequentes do estudo e dados da performance dos fotobiorreatores com células selvagens e recombinantes estão apresentados nos próximos Capítulos. Apesar da infinidade de modificações que podem ser incorporadas aos fotobiorreatores, o seu estado de desenvolvimento atual permite o desenvolvimento de projetos que requeiram proteção contra contaminantes da cultura estudada. O desenvolvimento de fotobiorreatores é contínuo e é constante a necessidade de adapta-los as necessidades dos projetos de pesquisa propostos e novas soluções e materias serão essenciais para o desenvolvimento dos fotobiorreatores. Além disso, o emprego de técnicas de manufatura digital na fabricação de equipamentos de laboratório foi essencial para o desenvolvimento e construção dos equipamentos apresentados nesse capítulo. Equipamentos como a microcentrífuga e sistemas de géis de agarose são cruciais para o desenvolvimento de pesquisas envolvendo biologia molecular e laboratórios de pesquisa

serão beneficiados pelo movimento *open source*, agora expandido para os equipamentos de laboratório.

6. CAPÍTULO – SUMÁRIO E TRABALHOS FUTUROS

6.1. SUMÁRIO DA TESE

A produção de proteínas heterólogas em microalgas é um campo novo e que possui várias facetas a serem exploradas para ter o seu real potencial avaliado. Contudo, é um sistema de expressão que deve ser avaliado e possui potencial para atingir os principais requerimentos para uma aplicação biotecnológica de produção de proteínas heteróloga. No presente trabalho uma avaliação dessa tecnologia foi executada, assim como o desenvolvimento de ferramentas para avançar esse campo de pesquisa. O fotobiorreator desenvolvido durante esse projeto é uma importante ferramenta nessa empreitada. Um sistema fechado, esterilizável e com um volume maior de trabalho, permite a avaliação de cepas quanto a sua produtividade e adaptação a condições de cultivo mais próximas as de cultivo industrial. Além disso, fotobiorreatores são a peça chave no desenvolvimento de bioprocessos, possibilitando o acoplamento de sistemas e técnicas que impactarão os rendimentos dos cultivos.

No entanto, apesar de ser uma peça fundamental em bioprocessos, os biorreatores e técnicas de cultivo necessitam de métodos de monitoramento para que sejam avaliados constantemente de forma rápida e precisa. Uma das formas mais baratas e eficientes para avaliar esses sistemas é a utilização de cepas recombinantes produtoras de proteínas heterólogas. Idealmente, essas proteínas precisam ter um baixo limite de detecção e facilidade de medição. Com esse objetivo em mente, no presente trabalho, foi realizado a avaliação de proteínas fluorescentes como proteínas repórter. Essas proteínas têm excelentes características que as tornam ideais para serem utilizadas em desenvolvimento de bioprocessos em escala laboratorial. As proteínas fluorescentes são extremamente baratas de serem quantificadas, têm baixo limite de detecção, e podem ser detectadas por diferentes técnicas.

Além disso, sistemas de expressão de proteínas estão sendo desenvolvidos e apresentam vantagens e desvantagens de acordo com as ferramentas biológicas que possuem disponíveis. Uma das ferramentas com grande potencial de impactar bioprocessos é a capacidade de secreção da proteína de interesse na forma ativa em altos títulos. Sistemas de produção de biofármacos, como a produção de anticorpos por células CHO vêm sendo desenvolvidos nesse sentido (27). O motivo é simples, a desvinculação do produto das células assim que é produzido permite que as células possam ser mantidas viáveis por maior tempo, enquanto o produto é prontamente separado e purificado durante o cultivo (61). Essas estratégias apresentam vantagens, como recuperar o produto antecipadamente, evitando modificações que podem

comprometer a atividade e qualidade das proteínas de interesse. Portanto, o avanço das microalgas como sistemas de expressão depende do uso de peptídeos sinais eficientes, permitindo que o cultivo seja conduzido de forma a potencializar o número de células viáveis por período prolongado. No presente projeto 10 peptídeos sinais foram avaliados, sendo 6 deles inéditos na literatura e com resultados de secreção superiores aos até então descritos. Esses resultados são fundamentais para alavancar o uso de microalgas como plataforma de expressão de proteínas.

Ademais, para avaliar o sistema de expressão de microalgas, a HYAL, uma enzima humana com potencial uso terapêutico, foi testada. Cepas produtoras das duas isoformas avaliadas no projeto foram obtidas, demonstrando a capacidade desse sistema de produzir moléculas com aplicação terapêutica. Contudo, a atividade de HYAL no sobrenadante não foi detectada nos ensaios desse projeto, o que não permite concluir se *C. reinhardtii* é capaz ou não de secretar essas enzimas em sua forma ativa, uma vez que técnicas com maior sensibilidade devam ser utilizadas para alcançar essa conclusão. Os limites de detecção dos métodos utilizados foram provavelmente mais elevados do que a quantidade produzida durante os experimentos. Contudo, técnicas mais sensíveis como o emprego de hialuronato biotinilado (124), acopladas com processos de recuperação acoplada ao cultivo, permitiriam o desenvolvimento de processos com produtividades apreciáveis dessa enzima.

Em suma, o presente projeto desenvolveu ferramentas que auxiliarão no desenvolvimento do sistema de expressão de proteínas heterólogas baseado em microalgas e estabelece uma base para o desenvolvimento de projetos envolvendo esses microrganismos. Outros projetos utilizando microalgas devem ser desenvolvidos para avaliar e desenvolver o sistema de expressão baseado em microalgas, assim como, para gerar uma massa crítica de cientistas e cidadãos, necessária para o desenvolvimento de qualquer projeto e área do conhecimento.

Destaca-se a importância do desenvolvimento de sistemas de expressão em microalgas no Brasil. Atualmente o Brasil é mundialmente reconhecido por sua tradição em bioeconomia devido a produção de etanol por fermentação alcoólica, demonstrando nossa capacidade inventiva e disposição de utilizar bioprocessos em larga escala (161). Ademais, possuímos os recursos naturais em abundância para sustentar esse tipo de tecnologia que pode ser implantada em regiões de baixo desenvolvimento, impactando positivamente essas regiões com crescimento econômico e social.

6.2. CONCLUSÃO

No presente trabalho foram desenvolvidas diferentes ferramentas para avaliar o sistema de expressão de proteínas heterólogas baseado em microalgas, de ferramentas moleculares a equipamentos, como o desenvolvimento do fotobiorreator v4, peça fundamental em estudos com microalgas. Esse fotobiorreator permitiu o cultivo de células recombinantes em sistema fechado, atingindo valores de 10 mg/L.dia de produtividade de proteína recombinante durante o cultivo e taxa de crescimento de 1,27 d⁻¹. Além desse equipamento, algumas ferramentas moleculares foram avaliadas quanto a sua aplicabilidade em sistemas de secreção de microalgas. As proteínas fluorescentes mTagBFP, Cerulean, Emerald, crGFP, cOFP, tdTomato e mCherry foram avaliadas quanto a sua aplicabilidade em estudos de secreção de microalgas. As proteínas vermelhas apresentaram os melhores resultados, como: baixa interferência dos pigmentos fotossintéticos em suas medidas e elevada relação sinal ruído em medidas de secreção. Outras ferramentas desenvolvidas nesse projeto, foram 5 novos peptídeos sinais funcionais, de 6 avaliados, não descritos anteriormente na literatura. O peptídeo sinal teórico SP5 apresentou a maior capacidade de secreção entre os peptídeos sinais testados. O peptídeo sinal da IBP1 apresentou também elevados valores de secreção, porém alta frequência de colônias negativas. Além dessas ferramentas, no intuito de avaliar a capacidade desse sistema, duas isoformas de HYAL (HYAL1 e PH20) foram expressas nesse sistema. Ambas as isoformas foram expressas em *C. reinhardtii* em sua forma ativa. Contudo, a detecção dessa enzima no sobrenadante não foi possível, devido a baixa sensibilidade das técnicas utilizadas.

Portanto, as ferramentas e estudos conduzidos nessa tese permitirão o avanço no campo de expressão de proteínas heterólogas em microalgas.

6.3. TRABALHOS FUTUROS

O fotobiorreator desenvolvido possui a capacidade de acoplamento de sensores e funcionalidades que permitirão o desenvolvimento de bioprocessos mais complexos e com maiores rendimentos. Algumas das funcionalidades que poderão ser adicionadas ao fotobiorreator estão relacionadas a sensores de acompanhamento do processo e atuadores. Sensores como pHmetros, densitômetros, fluorímetros, sensores de gases e sensores de espuma permitirão um maior controle do processo. Além disso, controle dinâmico da intensidade luminosa acoplado a medidas de densidade celular, podem permitir cultivos em que fotoinibição seja reduzida, podendo ter impacto, na fase lag dos cultivos. Além desses módulos,

o próximo passo lógico é o acoplamento de sistemas que permitam a perfusão de células com seu reciclo para avaliar a produtividade desse modelo de processo em microalgas, uma vez que está disponível para teste uma célula secretora de proteínas fluorescente de fácil detecção. Para esse tipo de experimento, é necessário o acoplamento de bombas de infusão e sangramento no processo, assim como membranas porosas para a separação das células do produto, durante o cultivo com a circulação de cultivo acionado por bombas.

Outra perspectiva futura, é a inserção de proteínas heterólogas nas construções desenvolvidas no presente trabalho com interesse biotecnológico. O leque de opções de proteínas heterólogas varia de enzimas industriais a proteínas para a fabricação de nanomateriais como seda de aranha até biofármacos. Contudo essas pesquisas devem estar acompanhadas de técnicas sensíveis para a detecção do produto, para permitir o desenvolvimento desses processos.

Como esse campo é relativamente novo, técnicas como o cruzamento de cepas não foram explorados. Dado a diversidade disponível em banco de germoplasma e técnicas de cruzamento de linhagens essas técnicas devem ser avaliadas, e novamente, a proteína fluorescente mCherry permitirá acessar a viabilidade dessas técnicas. Técnicas de cruzamento foi utilizada na domesticação de diversas culturas, com diversos exemplos de sucesso como o milho, soja e arroz e causaram nessas culturas modificações de alto impacto a sua bioeconomia.

Por fim, microalgas são um grupo de espécies de organismos unicelulares eucariotos com diversas características, adaptadas a diferentes ecossistemas. Esse potencial biotecnológico está longe de ter sido explorado e ferramentas de manipulação genética dessas células precisam ser desenvolvidas. Essas ferramentas possibilitarão o desenvolvimento de bioprocessos cada vez mais eficientes e que supram as necessidades tecnológicas humanas e a diversidade dessa classe de organismo é uma fonte de possíveis soluções.

7. REFERENCIAS

1. Kretzmer H. Look Down - Les miserables. Les miserables; 1985.
2. Harvey D, Bardelang P, Goodacre SL, Cockayne A, Thomas NR. Antibiotic Spider Silk: Site-Specific Functionalization of Recombinant Spider Silk Using “Click” Chemistry. *Adv Mater* [Internet]. 2017;1604245. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/adma.201604245>
3. Anbalagan A, Schwede S, Lindberg CF, Nehrenheim E. Influence of hydraulic retention time on indigenous microalgae and activated sludge process. *Water Res* [Internet]. 2016;91:277–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2016.01.027>
4. Ng KM, Ferreyra J a, Higginbottom SK, Lynch JB, Kashyap PC, Gopinath S, et al. Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature* [Internet]. 2013;502(7469):96–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3825626&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
5. Johnson WZ and MB. Microalgae as a Feedstock for Biofuel Production. *Virginia Coop Ext.* 2009;442–886.
6. Sarrouh B, Santos TM, Miyoshi A, Dias R, Azevedo V. Up-To-Date Insight on Industrial Enzymes Applications and Global Market. *J Bioproc Biotech.* 2012;S4(2):1–10.
7. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2014 Oct 9;32(10):992–1000. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25299917>
8. Paddon CJ, Westfall PJ, Pitera DJ, Benjamin K, Fisher K, McPhee D, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature* [Internet]. 2013;496(7446):528–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23575629>
9. Sauer M. Industrial production of acetone and butanol by fermentation-100 years later. *FEMS Microbiol Lett.* 2016;363(13):1–4.
10. Levett I, Birkett G, Davies N, Bell A, Langford A, Laycock B, et al. Techno-economic assessment of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production from methane - The case for thermophilic bioprocessing. *J Environ Chem Eng* [Internet]. 2016;4(4):3724–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2016.07.033>
11. Vonshak A. *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology.* London: Taylor and Francis; 1997. 233 p.
12. Cristóbal J, Matos CT, Aurambout J-P, Manfredi S, Kavalov B. Environmental sustainability assessment of bioeconomy value chains. *Biomass and Bioenergy* [Internet]. 2016;89. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096195341630023X>
13. Golden JS, Handfield RB, Daystar J, McConnell TE. *An Economic Impact Analysis of the U.S. Biobased Products Industry: A Report to the Congress of the United States of America.* 2015.
14. Tomiya N. Humanization of recombinant glycoproteins expressed in insect cells. *Trends Glycosci Glycotechnol* [Internet]. 2009 [cited 2013 Jun 23];21(118):71–86. Available from: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/tigg/21.71?from=CrossRef>
15. Yong YC, Yu YY, Yang Y, Liu J, Wang JY, Song H. Enhancement of extracellular electron transfer and bioelectricity output by synthetic porin. *Biotechnol Bioeng.* 2013;110(2):408–16.
16. Noor-Mohammadi S, Pourmir A, Johannes TW. Method for assembling and expressing multiple genes in the nucleus of microalgae. *Biotechnol Lett* [Internet]. 2014 Mar [cited 2014 Dec 4];36(3):561–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24129955>

17. Tran M, Mayfield SP. Antibody Engineering. Kontermann R, Dübel S, editors. 2010 [cited 2014 Jul 10];1:503–16. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-01144-3>
18. Potvin G, Zhang Z. Strategies for high-level recombinant protein expression in transgenic microalgae: a review. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2010 [cited 2012 Oct 9];28(6):910–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20728531>
19. Hayashida FM. Ancient beer and modern brewers: Ethnoarchaeological observations of chicha production in two regions of the North Coast of Peru. *J Anthropol Archaeol*. 2008;27(2):161–74.
20. Sheldon RA, Van Pelt S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem Soc Rev* *Chem Soc Rev*. 2013;42(42):6223–35.
21. Posten C. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Eng Life Sci*. 2009;9(3):165–77.
22. Behr A, Brehme VA, Ewers CLJ, Grön H, Kimmel T, Küppers S, et al. New developments in chemical engineering for the production of drug substances. *Eng Life Sci*. 2004;4(1):15–24.
23. Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending Healthy Life Span—From Yeast to Humans. *Science* (80-) [Internet]. 2010;328(5976):321–6. Available from: http://www.jstor.org/stable/40544559%5Cnhttp://www.jstor.org/stable/40544559?seq=1&cid=pdf-reference#references_tab_contents%5Cnhttp://about.jstor.org/terms
24. Radzun KA, Wolf J, Jakob G, Zhang E, Stephens E, Ross I, et al. Automated nutrient screening system enables high-throughput optimisation of microalgae production conditions. *Biotechnol Biofuels* [Internet]. 2015;8(1). Available from: <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/8/1/65>
25. Yadav JSS, Yan S, Ajila CM, Bezawada J, Tyagi RD, Surampalli RY. Food-grade single-cell protein production, characterization and ultrafiltration recovery of residual fermented whey proteins from whey. *Food Bioprod Process* [Internet]. 2016;99:156–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2016.04.012>
26. Liu S, Simaria AS, Farid SS, Papageorgiou LG. Designing cost-effective biopharmaceutical facilities using mixed-integer optimization. *Biotechnol Prog*. 2013;29(6):1472–83.
27. Peng L, Yu X, Li C, Cai Y, Chen Y, He Y, et al. Enhanced recombinant factor VII expression in Chinese hamster ovary cells by optimizing signal peptides and fed-batch medium. *Bioengineered* [Internet]. 2016;5979(May). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27116572>
28. Rader RA. FDA Biopharmaceutical Product Approvals and Trends in 2012. *Bioprocess Int*. 2012;11(3):18–28.
29. Rasala B a, Lee P a, Shen Z, Briggs SP, Mendez M, Mayfield SP. Robust Expression and Secretion of Xylanase I in *Chlamydomonas reinhardtii* by fusion to a selection Gene and processing with the FMDV 2A peptide. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jan [cited 2012 Oct 9];7(8):e43349. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3427385&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
30. Baneyx F, Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2004 Nov [cited 2012 Mar 16];22(11):1399–408. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15529165>
31. Saraswat M, Musante L, Ravid?? A, Shortt B, Byrne B, Holthofer H. Preparative purification of recombinant proteins: Current status and future trends. *Biomed Res Int*. 2013;2013.
32. Hamilton SR, Davidson RC, Sethuraman N, Nett JH, Jiang Y, Rios S, et al.

- Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science*. 2006;313(5792):1441–3.
33. Mayfield SP, Franklin SE, Lerner R a. Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2003 Jan 21;100(2):438–42. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=141013&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 34. Dove A. Uncorking the biomanufacturing bottleneck. *Nat Biotechnol*. 2002;20:777–9.
 35. Walker TL, Purton S, Becker DK, Collet C. Microalgae as bioreactors. *Plant Cell Rep* [Internet]. 2005 Dec [cited 2012 Oct 9];24(11):629–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16136314>
 36. Yoon HS, Hackett JD, Ciniglia C, Pinto G, Bhattacharya D. A Molecular Timeline for the Origin of Photosynthetic Eukaryotes. *Mol Biol Evol*. 2004;21(5):809–18.
 37. Perin G, Cimetta E, Monetti F, Morosinotto T, Bezzo F. Novel micro-photobioreactor design and monitoring method for assessing microalgae response to light intensity. *Algal Res* [Internet]. 2016;19:69–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.07.015>
 38. Eichelberger L, De Mori C, Nascimento Junior A, Vieira VM, Cerbaro J. RELATÓRIO DE AVALIAÇÃO DOS IMPACTOS DAS TECNOLOGIAS GERADAS PELA EMBRAPA [Internet]. Passo Fundo; 2013. Available from: http://bs.sede.embrapa.br/2012/relatorios/trigo_2012_centeioserrano.pdf
 39. Fujita D, Trijatmiko KR, Tagle AG, Sapasap MV, Koide Y, Sasaki K, et al. NAL1 allele from a rice landrace greatly increases yield in modern indica cultivars. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2013;110(51):20431–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3870739&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 40. FAO. Statistical Yearbook of the Food And Agricultural Organization for Feeding the world. In: *FAO Statistical Yearbook 2013*. FAO; 2013. p. 123–58.
 41. Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng* [Internet]. 2006 Feb [cited 2012 Oct 9];101(2):87–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16569602>
 42. Enzing C, Ploeg M, Barbosa M, Sijtsma L. Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe. *JRC Scientific and Policy Reports*. European Commission. 2014.
 43. R-Lee TL, González-Mariño GE. Microalgae for “Healthy” Foods-Possibilities and Challenges. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2010;9(6):655–75.
 44. Surzycki R, Greenham K, Kitayama K, Dibal F, Wagner R, Rochaix J-D, et al. Factors effecting expression of vaccines in microalgae. *Biologicals* [Internet]. 2009 Jun [cited 2012 Oct 9];37(3):133–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19467445>
 45. Rosales-Mendoza S, Paz-Maldonado LMT, Soria-Guerra RE. *Chlamydomonas reinhardtii* as a viable platform for the production of recombinant proteins: current status and perspectives. *Plant Cell Rep* [Internet]. 2012 Mar [cited 2012 Oct 9];31(3):479–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22080228>
 46. Cordero BF, Couso I, León R, Rodríguez H, Vargas MA. Enhancement of carotenoids biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* by nuclear transformation using a phytoene synthase gene isolated from *Chlorella zofingiensis*. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2011 Jul [cited 2012 Oct 9];91(2):341–51. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3125507&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

47. Mayfield SP, Manuell AL, Chen S, Wu J, Tran M, Siefker D, et al. *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2007 Apr [cited 2012 Oct 9];18(2):126–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17317144>
48. Niu YF, Zhang MH, Xie WH, Li JN, Gao YF, Yang WD, et al. A new inducible expression system in a transformed green alga, *Chlorella vulgaris*. *Genet Mol Res* [Internet]. 2011 Jan;10(4):3427–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22033900>
49. Kathiresan S, Sarada R. Towards genetic improvement of commercially important microalga *Haematococcus pluvialis* for biotech applications. *J Appl Phycol* [Internet]. 2009 Apr 1 [cited 2012 Oct 9];21(5):553–8. Available from: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10811-009-9414-0>
50. Barnes D, Franklin S, Schultz J, Henry R, Brown E, Coragliotti A, et al. Contribution of 5'- and 3'-untranslated regions of plastid mRNAs to the expression of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast genes. *Mol Genet Genomics* [Internet]. 2005 Dec [cited 2012 Oct 12];274(6):625–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16231149>
51. Rosenberg JN, Oyler G a, Wilkinson L, Betenbaugh MJ. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2008 Oct [cited 2012 Oct 9];19(5):430–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18725295>
52. Rasala B a, Mayfield SP. The microalga *Chlamydomonas reinhardtii* as a platform for the production of human protein therapeutics. *Bioeng Bugs* [Internet]. 2010 [cited 2012 Oct 9];2(1):50–4. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3127021&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
53. Eichler-Stahlberg A, Weisheit W, Ruecker O, Heitzer M. Strategies to facilitate transgene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* [Internet]. 2009 Mar [cited 2012 Oct 9];229(4):873–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19127370>
54. Fuhrmann M, Oertel W, Hegemann P. A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* [Internet]. 1999 Aug;19(3):353–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10476082>
55. Heitzer M, Zschoernig B. Construction of modular tandem expression vectors for the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* using the Cre/lox-system. *Biotechniques* [Internet]. 2007 Sep [cited 2012 Oct 5];43(3):324–32. Available from: <http://www.biotechniques.com/article/000112556>
56. Ryan MD, King a M, Thomas GP. Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. *J Gen Virol* [Internet]. 1991 Nov;72 (Pt 11):2727–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1658199>
57. Triton Algae Innovations [Internet]. 2017 [cited 2017 Jan 19]. p. 1–6. Available from: <http://www.tritonhn.com/index.php>
58. Blobel G, Dobberstein B. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J CELL BmLOC*. 1975;67:835–51.
59. Saraogi I, Shan S. Molecular mechanism of co-translational protein targeting by the signal recognition particle. *Traffic* [Internet]. 2011;12(5):535–42. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3077218&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

60. Rance J, Young R. Mammalian expression vector with a highly efficient secretory signal sequence [Internet]. Canada; WO2008148519A2, 2010. p. 1–13. Available from: <http://www.google.com/patents/EP2152728A2?cl=en>
61. Karst DJ, Steinebach F, Soos M, Morbidelli M. Process performance and product quality in an integrated continuous antibody production process. *Biotechnol Bioeng*. 2016;
62. Yuk IH, Zhang JD, Ebeling M, Berrera M, Gomez N, Werz S, et al. Bioreactor productivity and media cost comparison for different intensified cell culture processes. *Biotechnol Prog* [Internet]. 2016;1–34. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/btpr.1868/abstract%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24403277>
63. Shimomura O, H. Johnson F, Saiga Y. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea. *J Cell Comp Physiol*. 1962;1353(165):223–39.
64. M Chalfie, Y Tu, G Euskirchen, WW Ward DP. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 1994;263(5148):802–5.
65. Lambert T, Thorn K. Fluorescent protein properties [Internet]. 2016 [cited 2017 Jan 13]. Available from: <http://nic.ucsf.edu/FPvisualization/>
66. Tomosugi W, Matsuda T, Tani T, Nemoto T, Kotera I, Saito K, et al. An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity. *Nat Methods*. 2009;6(5):351–3.
67. Shcherbakova DM, Verkhusha V V, Biology S. Near-infrared fluorescent proteins for multicolor in vivo imaging. *Nat Methods*. 2013;10(8):751–4.
68. Knop M, Edgar B a. Tracking protein turnover and degradation by microscopy: photo-switchable versus time-encoded fluorescent proteins. *Open Biol* [Internet]. 2014 Jan;4(April):140002. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4043113&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
69. Shen Y, Rosendale M, Campbell RE, Perrais D. pHuji, a pH-sensitive red fluorescent protein for imaging of exo- and endocytosis. *J Cell Biol*. 2014;207(3):419–32.
70. Piston DW, Kremers G-J. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends Biochem Sci*. 2007;32(9):407–14.
71. Dedecker P, De Schryver FC, Hofkens J. Fluorescent proteins: shine on, you crazy diamond. *J Am Chem Soc* [Internet]. 2013 Feb 20;135(7):2387–402. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23317378>
72. Subach OM, Gundorov IS, Yoshimura M, Subach F V., Zhang J, Grünwald D, et al. Conversion of Red Fluorescent Protein into a Bright Blue Probe. *Chem Biol*. 2008;15(10):1116–24.
73. Rizzo M a, Springer GH, Granada B, Piston DW. An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat Biotechnol*. 2004;22(4):445–9.
74. Tsien RY. The Green Fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 1998;67(11):509–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9759496>
75. Shaner NC, Campbell RE, Steinbach P a, Giepmans BNG, Palmer AE, Tsien RY. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2004 Dec [cited 2013 May 21];22(12):1567–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15558047>
76. Zhang Y, Werling U, Edelmann W. SLiCE: a novel bacterial cell extract-based DNA cloning method. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2012 Apr [cited 2014 May 23];40(8):e55. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3333860&tool=pmcentrez>

- &rendertype=abstract
77. Rasala B a, Barrera DJ, Ng J, Plucinak TM, Rosenberg JN, Weeks DP, et al. Expanding the spectral palette of fluorescent proteins for the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* [Internet]. 2013 May [cited 2014 Feb 4];74(4):545–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23521393>
 78. Gorman DS, Levine RP. Cytochrome F and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *chlamydomonas reinhardtii*. *PNAS*. 1965;54(6):1665–9.
 79. Abràmoff MD, Hospitals I, Magalhães PJ, Abràmoff M. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics Int*. 2004;11(7):36–42.
 80. Costantini LM, Snapp EL. Fluorescent proteins in cellular organelles: serious pitfalls and some solutions. *DNA Cell Biol* [Internet]. 2013;32(11):622–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23971632>
 81. Jain RK, Joyce PB, Molinete M, Halban PA, Gorr SU. Oligomerization of green fluorescent protein in the secretory pathway of endocrine cells. *Biochem J* [Internet]. 2001;360(Pt 3):645–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1222268&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 82. Buyel JF, Twyman RM, Fischer R. Extraction and downstream processing of plant-derived recombinant proteins. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2015;33(6):902–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.04.010>
 83. Steentoft C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, Kong Y, Vester-Christensen MB, Schjoldager KT-BG, et al. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J* [Internet]. 2013;32(10):1478–88. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3655468&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 84. Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz J, Witman GB, et al. The *Chlamydomonas* Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science* (80-). 2010;318(5848):245–50.
 85. Faye L, Boulaflous A, Benchabane M, Gomord V, Michaud D. Protein modifications in the plant secretory pathway: Current status and practical implications in molecular pharming. *Vaccine*. 2005;23(15 SPEC. ISS.):1770–8.
 86. D'Alessandris C, Andreozzi F, Federici M, Cardellini M, Brunetti A, Ranalli M, et al. Increased O-glycosylation of insulin signaling proteins results in their impaired activation and enhanced susceptibility to apoptosis in pancreatic beta-cells. *FASEB J*. 2004;18(9):959–61.
 87. Martoglio B, Dobberstein B. Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol* [Internet]. 1998 Oct;8(10):410–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9789330>
 88. Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* [Internet]. 1997 Jan;10(1):1–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10065837>
 89. Baba M, Suzuki I, Shiraiwa Y. Proteomic analysis of high-CO₂-inducible extracellular proteins in the unicellular green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol* [Internet]. 2011 Aug [cited 2014 Jun 4];52(8):1302–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21680606>
 90. Lauersen KJ, Berger H, Mussgnug JH, Kruse O. Efficient recombinant protein production and secretion from nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biotechnol* [Internet]. 2013 Aug 20 [cited 2014 Mar 25];167(2):101–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23099045>

91. Raymond J a., Janech MG, Fritsen CH. Novel Ice-Binding Proteins From a Psychrophilic Antarctic Alga (Chlamydomonadaceae, Chlorophyceae). *J Phycol* [Internet]. 2009 Feb [cited 2014 Apr 10];45(1):130–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1529-8817.2008.00623.x>
92. Nguyen TH, Law DTS, Williams DB. Binding protein BiP is required for translocation of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in. 1991;88(February):1565–9.
93. Pelham HRB. The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci*. 1990;39(10):433–504.
94. Platis D, Drossard J, Fischer R, Ma JK-C, Labrou NE. New downstream processing strategy for the purification of monoclonal antibodies from transgenic tobacco plants. *J Chromatogr A* [Internet]. 2008 Nov 21 [cited 2012 Feb 13];1211(1–2):80–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18945431>
95. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* [Internet]. 2011 Jan [cited 2014 Mar 20];8(10):785–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21959131>
96. Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, Varlamov A, Vaskin Y, Efremov I, et al. Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012;28(8):1166–7.
97. Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* [Internet]. 1999;294(5):1351–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10600390>
98. Schroda M. The Chlamydomonas genome reveals its secrets: Chaperone genes and the potential roles of their gene products in the chloroplast. *Photosynth Res*. 2004;82(3):221–40.
99. de Hostos EL, Togasaki RK, Grossmanw A. Purification and Biosynthesis of a Derepressible Periplasmic Arylsulfatase from Chlamydomonas reinhardtii. *J Cell Biol*. 1988;106:29–37.
100. Van K, Spalding MH. Periplasmic Carbonic Anhydrase Structural Gene (Cah1) Mutant in Chlamydomonas reinhardtii 1. *Plant Physiol*. 1999;120(3):757–64.
101. Gatignol A, Durand H, Tiraby G. Bleomycin resistance conferred by a drug-binding protein. *FEBS Lett*. 1988;230(1–2):171–5.
102. Pédelacq J-D, Cabantous S, Tran T, Terwilliger TC, Waldo GS. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*. 2006;24(1):79–88.
103. Choo KH, Tan TW, Ranganathan S. A comprehensive assessment of N-terminal signal peptides prediction methods. *BMC Bioinformatics*. 2009;10:1–12.
104. Friso G, van Wijk KJ. Update: Post-translational protein modifications in plant metabolism. *Plant Physiol* [Internet]. 2015;169(November):pp.01378.2015. Available from: <http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.15.01378>
105. Peck SC. Analysis of protein phosphorylation: Methods and strategies for studying kinases and substrates. *Plant J*. 2006;45(4):512–22.
106. Dumas P, Bergdoll M, Cagnon C, Masson JM. Crystal structure and site-directed mutagenesis of a bleomycin resistance protein and their significance for drug sequestering. *EMBO J*. 1994;13(1):2483–92.
107. Niikura Y, Kitagawa R, Ogi H, Abdulle R, Pagala V, Kitagawa K. CENP-A K124 Ubiquitylation Is Required for CENP-A Deposition at the Centromere. *Dev Psychopathol*. 2015;32(5):589–603.
108. Watt AD, Perez KA, Rembach A, Sherrat NA, Hung LW, Johanssen T, et al. Oligomers, fact or artefact? SDS-PAGE induces dimerization of ??-amyloid in human brain samples. *Acta Neuropathol*. 2013;125(4):549–64.
109. Platis D, Labrou NE. Application of a PEG/salt aqueous two-phase partition system for

- the recovery of monoclonal antibodies from unclarified transgenic tobacco extract. *Biotechnol J* [Internet]. 2009 Sep [cited 2012 Mar 25];4(9):1320–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19557796>
110. Hassan S, Van Dolleweerd CJ, Ioakeimidis F, Keshavarz-Moore E, Ma JKC. Considerations for extraction of monoclonal antibodies targeted to different subcellular compartments in transgenic tobacco plants. *Plant Biotechnol J*. 2008;6(7):733–48.
 111. Voigt J, Frank R. 14-3-3 Proteins Are Constituents of the Insoluble Glycoprotein Framework of the *Chlamydomonas* Cell Wall. *Plant Cell*. 2003;15(6):1399–413.
 112. Dyballa N, Metzger S. Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *J Vis Exp*. 2009;(30):2–5.
 113. Roth MS, Latz MI, Goericke R, Deheyn DD. Green fluorescent protein regulation in the coral *Acropora yongei* during photoacclimation. *J Exp Biol* [Internet]. 2010;213(21):3644–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20952612>
 114. Blanken W, Cuaresma M, Wijffels RH, Janssen M. Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost. *Algal Res* [Internet]. 2013 Oct [cited 2014 Jan 21];2(4):333–40. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221192641300091X>
 115. Acién FG, Fernández JM, Magán JJ, Molina E. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2012;30(6):1344–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.02.005>
 116. Alibaba. Silk yarn. 2017. p. 1–5.
 117. Global Market Study on Biopharmaceuticals: Asia to Witness Highest Growth by 2020 [Internet]. Vol. PMRREP2827. New York City; 2015. Available from: <http://www.persistencemarketresearch.com/mediarelease/biopharmaceutical-market.asp>
 118. Os maiores gastos do SUS com medicamentos [Internet]. Agência Câmara de Notícias. 2010 [cited 2012 Oct 11]. Available from: <http://www2.camara.gov.br/agencia/noticias/SAUDE/192120-MEDICAMENTOS-MAIS-CAROS-FORNECIDOS-PELO-SUS.html>
 119. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2006. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2006 Jul;24(7):769–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16841057>
 120. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2010 Sep;28(9):917–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20829826>
 121. Jung Y, Jung M-Y, Park J-H, Jung GC, Hong YS, Yeom CH, et al. Production of human hyaluronidase in a plant-derived protein expression system: plant-based transient production of active human hyaluronidase. *Protein Expr Purif* [Internet]. 2010 Dec [cited 2012 Oct 10];74(2):181–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20558297>
 122. Frost GI. Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration. *Expert Opin Drug Deliv* [Internet]. 2007 Jul;4(4):427–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17683255>
 123. Wohlrab J, Finke R, Franke WG, Wohlrab A. Efficacy study of hyaluronidase as a diffusion promoter for lidocaine in infiltration analgesia of skin. *Plast Reconstr Surg* [Internet]. 2012 Apr [cited 2012 Oct 12];129(4):771e–2e. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22456420>
 124. Frost GI, Csóka a B, Wong T, Stern R, Csóka TB. Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1997 Jul 9;236(1):10–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9223416>
 125. Reitingner S, Boroviak T, Laschober GT, Fehrer C, Müllegger J, Lindner H, et al. High-

- yield recombinant expression of the extremophile enzyme, bee hyaluronidase in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* [Internet]. 2008 Feb [cited 2012 Oct 12];57(2):226–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18024155>
126. Hofinger ES a, Spickenreither M, Oschmann J, Bernhardt G, Rudolph R, Buschauer A. Recombinant human hyaluronidase Hyal-1: insect cells versus *Escherichia coli* as expression system and identification of low molecular weight inhibitors. *Glycobiology* [Internet]. 2007 Apr [cited 2012 Oct 12];17(4):444–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17227790>
 127. Lin Y, Kimmel LH, Myles DG, Primakoff P. Molecular cloning of the human and monkey sperm surface protein PH-20. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(21):10071–5.
 128. Pan T, Wang Z, Xu J-H, Wu Z, Qi H. Extractive fermentation in cloud point system for lipase production by *Serratia marcescens* ECU1010. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2010 Feb [cited 2010 Nov 3];85(6):1789–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19798498>
 129. Jungbauer A. Continuous downstream processing of biopharmaceuticals. *Trends Biotechnol* [Internet]. 2013;31(8):479–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.05.011>
 130. Thayer AM. Top instrument firms in 2014. *Chem Eng News* [Internet]. 2015;94(17):10–3. Available from: <http://cen.acs.org/articles/93/i17/Top?Instrument?Firms?2014.html>
 131. Worldometers [Internet]. 2016 [cited 2016 Dec 30]. Available from: <http://www.worldometers.info/world-population/population-by-region/>
 132. Anderson D. Lens on Leeuwenhoek [Internet]. “Wrote Letter 39 of 1683-09-17 (AB 76) to Francis Aston.” 1683 [cited 2016 Dec 26]. Available from: <http://lensonleeuwenhoek.net/content/wrote-letter-39-1683-09-17-ab-76-francis-aston>
 133. SZABADVARY F. THE HISTORY OF CHEMICAL LABORATORY EQUIPMENT. Berkeley,: XVIIth International Congress of History of Science; 1985. p. 77–95.
 134. Pearce JM. Building Research Equipment with Free, Open-Source Hardware. *Science* (80-). 2012;337(6100):1304–5.
 135. Arduino [Internet]. [cited 2016 Dec 26]. Available from: <https://www.arduino.cc/>
 136. OpenPCR [Internet]. [cited 2016 Dec 26]. Available from: <http://openpcr.org/>
 137. Neve CA. pHduino [Internet]. [cited 2016 Dec 26]. Available from: <https://github.com/hephesto/phduino>
 138. OpenQCM [Internet]. [cited 2016 Dec 26]. Available from: <http://openqcm.com/>
 139. OpenScope [Internet]. 2015 [cited 2016 Dec 26]. Available from: <http://2015.igem.org/Team:Cambridge-JIC/Project>
 140. Digital Manufacturing [Internet]. Wikipedia. 2016 [cited 2016 Dec 30]. Available from: http://www.nist.gov/el/msid/upload/18_wKing.pdf
 141. Laplume AO, Petersen B, Pearce JM. Global value chains from a 3D printing perspective. *J Int Bus Stud* [Internet]. 2016;47:595–609. Available from: <http://dx.doi.org/10.1057/jibs.2015.47>
 142. Thingiverse [Internet]. [cited 2016 Dec 30]. Available from: <http://www.thingiverse.com/>
 143. Wicker R. Additive Manufacturing [Internet]. *Additive Manufacturing*. Elsevier; [cited 2017 Feb 17]. Available from: <https://www.journals.elsevier.com/additive-manufacturing>
 144. Health NI of. NIH 3D Print Exchange [Internet]. [cited 2017 Feb 17]. Available from: <https://3dprint.nih.gov/>
 145. Atzeni E, Iuliano L, Minetola P, Salmi A. Redesign and cost estimation of rapid manufactured plastic parts. *Rapid Prototyp J*. 2010;16(5):308–17.

146. Conner BP, Manogharan GP, Martof AN, Rodomsky LM, Rodomsky CM, Jordan DC, et al. Making sense of 3-D printing: Creating a map of additive manufacturing products and services. *Addit Manuf* [Internet]. 2014;1:64–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addma.2014.08.005>
147. Ugwu CU, Aoyagi H, Uchiyama H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresour Technol*. 2008;99(10):4021–8.
148. Jesus Ruiz, Olivieri G, Vree J de, Bosma R, Willems P, Reith JH, et al. Towards industrial products from microalgae. *Energy Environ Sci* [Internet]. 2016;9:3036–43. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6EE01493C>
149. Borowitzka MA. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *J Biotechnol*. 1999;70(1–3):313–21.
150. López MCGM, Sánchez EDR, Casas López JL, Fernández FGA, Sevilla JMF, Rivas J, et al. Comparative analysis of the outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* in tubular and bubble column photobioreactors. *J Biotechnol*. 2006;123(3):329–42.
151. Kim TH, Lee Y, Han SH, Hwang SJ. The effects of wavelength and wavelength mixing ratios on microalgae growth and nitrogen, phosphorus removal using *Scenedesmus* sp. for wastewater treatment. *Bioresour Technol* [Internet]. 2013;130:75–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.134>
152. Schulze PSC, Barreira L a., Pereira HGC, Perales J a., Varela JCS. Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. *Trends Biotechnol*. 2014;32(8):422–30.
153. Baden T, Chagas AM, Gage G, Marzullo T, Prieto-Godino LL, Euler T. Open Labware: 3-D Printing Your Own Lab Equipment. *PLoS Biol*. 2015;13(3):1–12.
154. Polmanteer KE. Silicone Rubber, Its Development and Technological Progress [Internet]. Vol. 61, *Rubber Chemistry and Technology*. 1988. p. 470–502. Available from: <http://www.rubberchemtechnol.org/doi/abs/10.5254/1.3536197>
155. Carvalho J, Bezerra R, Matsudo M, Sato S. Cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* by fed-batch process. In: Leem JW, editor. *Advanced Biofuels and Bioproducts*. New York: Springer New York; 2013. p. 781–805.
156. Ma J, Nan X, Larsen RM, Huang X, Yu B. Mechanical properties and biocompatibility of functionalized carbon nanotubes polypropylene composites. *J Biomater Sci*. 2016;27(10):1003–16.
157. Vejrazka C, Janssen M, Streefland M, Wijffels RH. Photosynthetic efficiency of *Chlamydomonas reinhardtii* in flashing light. *Biotechnol Bioeng* [Internet]. 2011 Dec [cited 2014 Apr 10];108(12):2905–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21769862>
158. Yocum CS, Blinks LR. LIGHT-INDUCED EFFICIENCY AND PIGMENT ALTERATIONS IN RED ALGAE. *J Gen Physiol*. 1958;41(6):1113–7.
159. Das P, Lei W, Aziz SS, Obbard JP. Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. *Bioresour Technol* [Internet]. 2011;102(4):3883–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.102>
160. Wang CY, Fu CC, Liu YC. Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. *Biochem Eng J*. 2007;37(1):21–5.
161. Silva B. A Bioeconomy in the Making: How Industrial Biotechnology Is Advancing a Sustainable and Prosperous Future for Brazil. *Ind Biotechnol*. 2016;12(1):11–2.
162. Algaranha T. Algaranha [Internet]. iGEM Wiki. 2016 [cited 2016 Jan 19]. Available from: http://2016.igem.org/Team:USP_UNIFESP-Brazil/Hardware
163. Society W. BioHack Academy [Internet]. 2016. Available from: <http://biohackacademy.github.io/>

APÊNDICE A - EQUIPAMENTOS DE LABORATÓRIO

Outros equipamentos foram construídos durante o estudo, no intuito de suprir demandas experimentais para o projeto e melhorar o fluxo experimental. Foram construídos microcentrífugas, cubas de eletroforese de agarose, fotodocumentador e dispositivos de laboratório como a estante de microtubos e sistema de miniprep a vácuo. A estante de microtubos foi construída utilizando chapa de acrílico de 4 mm cortada a laser e montada como exemplificado na Fotografia 7-1.

Fotografia 7-1: Estante de microtubos de acrílico

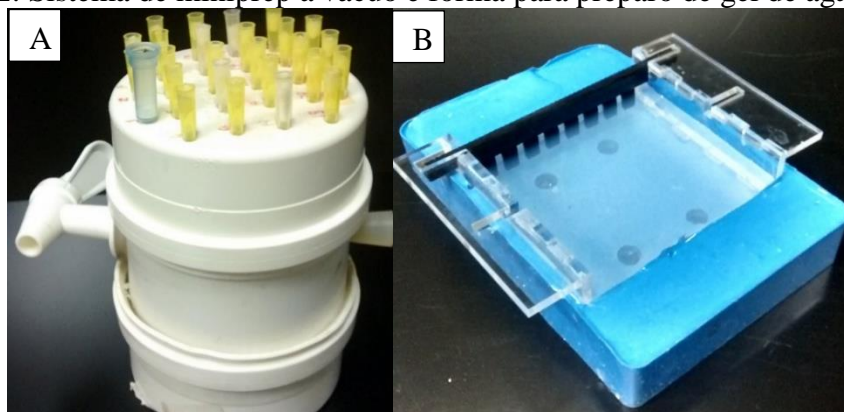


Fonte: Autor

Outros dispositivos construídos foram o sistema de miniprep a vácuo e forma para preparo de gel de agarose (Fotografia 7-2). Ambos reduzem o tempo de preparo dos experimentos em que são empregados, melhorando o fluxo de experimentos, aumentando a produtividade em laboratório.

Outros equipamentos foram construídos em parceria com o time AlgAranha, participante da competição internacional (iGEM), sendo desenvolvido três equipamentos, uma cuba de eletroforese, uma microcentrífuga e um fotodocumentador (162).

Fotografia 7-2: Sistema de miniprep a vácuo e forma para preparo de gel de agarose.

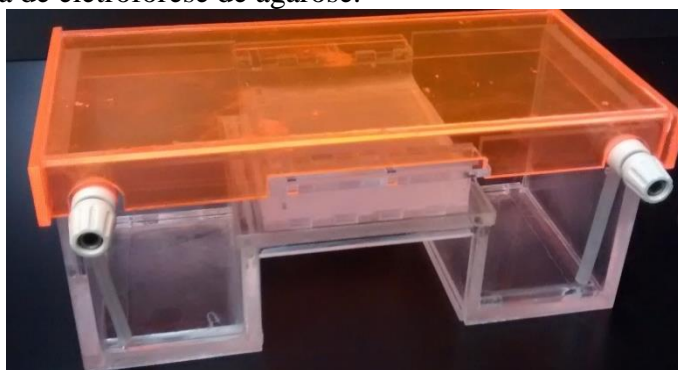


Nota: **A** – Tubos e tampas de PVC foram conetadas e seladas, furos de 3 mm foram posicionados na porção superior para acoplar colunas de miniprep. **B** – Forma para géis de agarose foi feita com silicone, para bandeja cortada a laser. Pente de oito posições foi impresso com PLA.

Fonte: Autor

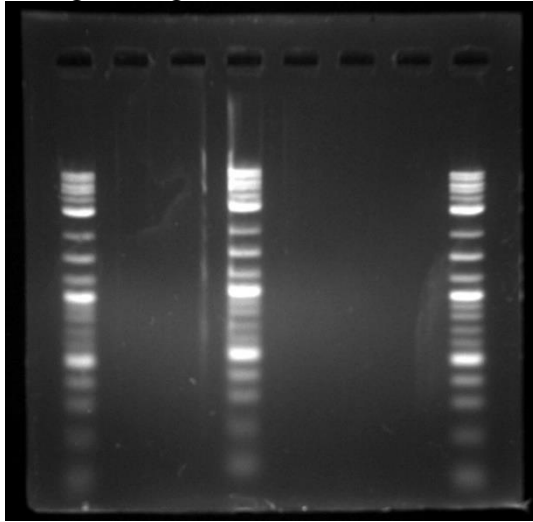
A cuba de eletroforese para géis de agarose, Fotografia 7-16, foi construída utilizando chapas de acrílico de 5 mm foi possível contruir uma cuba sem vazamentos e capaz de executar corridas de separação de DNA como observado na Fotografia 7-17. Os eletrodos de platina foram posicionados na porção inferior da cuba, com isolamento da porção vertical do filamento com tubo de silicone. Conectores *Banana jack* foram utilizados para realizar a conexão dos eletrodos com a fonte de energia. A cuba foi capaz de gerar campo eletromagnético uniforme, com diferença de potencial suficiente para permitir a separação de DNA em géis de agarose. A Fotografia 7-17 é o resultado de uma corrida utilizando padrão de peso molecular de DNA em três diferentes posições do gel. Os três padrões correram de forma homogênea, demonstrando a aplicabilidade dessa cuba em pesquisa.

Fotografia 7-3: Cuba de eletroforese de agarose.



Fonte: Autor

Fotografia 7-4: Eletroforese de gel de agarose teste da cuba.

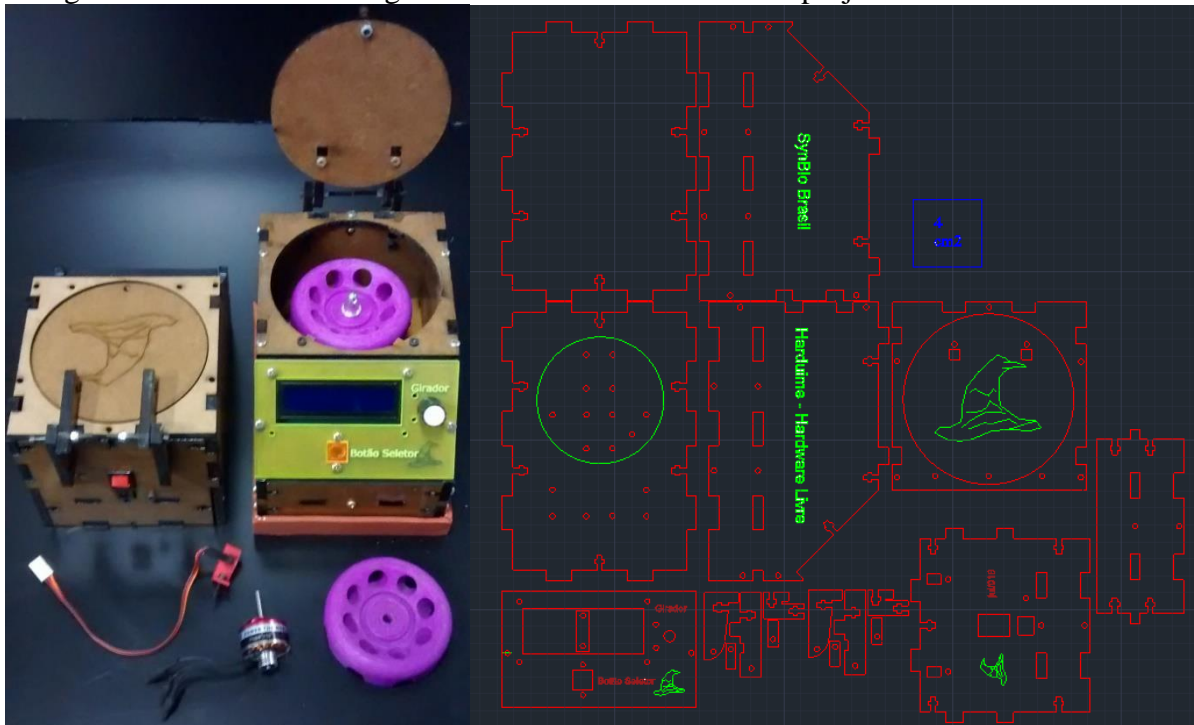


Nota: Gel carregado em três faixas com 4 μL de 2-Log DNA Ladder NEB®, corados com Gel red. Corrida realizada a 120V, por 60 min em tampão de borato de sódio.

Fonte: Autor

Preparos de amostra de DNA necessitam de microcentrífugas que atinjam altas rotações para permitir separação do DNA da amostra sendo processada. Uma microcentrífuga foi construída e testada para preparações de minipreps (Fotografia 7-5). A microcentrifuga tem a capacidade de atingir 15000 RPM, controle de aceleração, função *spin* e temporizador e foi construída em conjunto com um grupo acadêmico de alunos envolvidos com Hardware Livre (Hardware Livre USP).

Fotografia 7-5: Microcentrífuga em estrutura de MDF 6mm e projeto em autoCAD.



Nota: Microcentrífuga em estrutura de MDF, impermeabilizado, com motor brushless, rotor fabricado em impressora 3D, sensor hall e base de silicone.

Fonte: Autor

Diversos modelos digitais (15 versões) foram projetados até a definição do modelo construído apresentado na Fotografia 7-5. Esse modelo iniciou-se a partir de um projeto de código aberto da Waag society, um laboratório de fabricação digital (Fablab) de Amsterdam, Países baixos (163). O manual de montagem, código de controle, arquivos de corte a laser, impressão 3D e manual de utilização podem ser encontrados na wiki do time AlgAranha (162).

E por fim, um fotodocumentador está sendo contruído (Fotografia 7-19). Ele é constituído de uma camera escura, com lampadas UV no interior (UVB), com uma porta para a colocação do gel e um orifício para a fotodocumentação utilizando um *smartphone*. As dobradiças da porta foram fabricadas por impressão 3D, assim como os suportes para as lampadas no interior do equipamento. Contudo, sua funcionalidade ainda não foi avaliada. As primeiras versões incluíam uma base para o filtro comum a esses equipamentos. O filtro utilizado é um filtro do tipo Short Pass Filter para o UV, removendo ondas da porção visível do espectro, permitindo a radiação no comprimento do UV chegar até a amostra para identificação das bandas de DNA marcadas com fluoroforos excitáveis por UV. Contudo, esses filtros encareceriam o sistema, e um projeto baseado em epifluorescência está sendo desenvolvido.

Fotografia 7-6: Protótipo de fotodocumentador de géis de agarose.



Fonte: Autor