



EXPRESSÃO DA CADEIA BETA DO HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE BOVINO RECOMBINANTE (rbFSH- β) EM *Komagataella phaffii* PARA OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE SUPEROVULAÇÃO

GABRIEL NOGUEIRA SOARES; ANA BEATRIZ RIBEIRO SILVA; LETICIA GARCIA CARDOSO; STEPHANY GONÇALVES DOS SANTOS; IVAN CARLOS DOS SANTOS

RESUMO

O Brasil possui um rebanho bovino comercial com mais de 200 milhões de animais, sendo um dos maiores produtores mundiais de alimento de origem animal. Para a produção animal, a reprodução é uma parte fundamental e pode ser realizada em laboratório por meio da fertilização *in vitro* e transferência de embrião. Assim, técnicas de superovulação como a administração do hormônio folículo-estimulante (FSH) podem ser utilizadas e, para se obter melhores resultados nesses protocolos, há a necessidade do controle de qualidade e pureza do hormônio utilizado. Nesse aspecto, o desenvolvimento de proteínas recombinantes em sistemas de expressão como as leveduras é uma alternativa biotecnológica que pode aumentar a eficiência dos protocolos de superovulação. Este projeto avaliou a expressão proteica da cadeia beta do hormônio folículo-estimulante bovino recombinante (rbFSH- β) em *Komagataella phaffii* utilizando 3 diferentes concentrações de metanol durante a fase de indução da fermentação, sendo 0,5%, 1,0% e 1,5% de metanol em 48 horas de indução. Os clones foram crescidos no meio sólido yeast extract-dextrose-peptone (YPD) e transferidos para meio líquido glicerol + sais, onde foram induzidos por 48 horas. A purificação do sobrenadante foi feita utilizando tubos de ultrafiltração Amicon com membrana de celulose de 10 kDa, no qual foi trocado o meio glicerol + sais por tampão fosfato de sódio monobásico 0,1 M, pH 7 e as amostras foram concentradas 40x. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 15% com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) para confirmação da presença da rbFSH- β , sendo também realizada a dosagem de proteínas pelo método de Bradford. A análise estatística foi baseada nas concentrações das expressões proteicas de cada amostra. A eletroforese confirmou a presença da banda da rbFSH- β e seu grau de pureza. A amostra induzida com metanol na concentração de 1,0% demonstrou maior concentração proteica da rbFSH- β , aumentando em quase 25x a concentração da proteína em comparação com o grupo controle negativo, que não houve indução com metanol. Os resultados podem contribuir com estudos que visam otimizar a expressão de proteínas recombinantes em sistemas de expressão como a *Komagataella phaffii* que utilizam o promotor AOX1 para indução da fermentação.

Palavras-chave: fertilização *in vitro*; superovulação; expressão heteróloga; FSH- β recombinante; *Komagataella phaffii*.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de alimento de origem animal, possuindo um rebanho bovino comercial com mais de 200 milhões de animais. A nutrição e reprodução bovina são duas partes fundamentais dentro da produção animal e a biotecnologia pode desempenhar um papel crucial no aperfeiçoamento da produção animal, seja no âmbito nutricional ou reprodutivo (SAID, S. et al., 2020; PIÑA et al., 2023).

A partir do século XX, técnicas como a de superovulação e transferência de embriões

foram responsáveis por grande parte da produção de embriões bovinos que são utilizados em processos de fertilização do óvulo com espermatozoide em laboratório, conhecida como fertilização *in vitro* (FIV) (LOLLATO et al., 2022). Como exemplo, em circunstâncias normais uma cabra ovula de 1 a 3 óvulos por ciclo estral. Já com a superovulação, por meio da administração de doses do hormônio FSH, esse valor pode aumentar para entre 10 e 20 óvulos disponíveis (KHAN et al., 2023).

Os protocolos utilizados na superovulação influenciam diretamente na qualidade da resposta ovulatória. Isto é, a resposta ovulatória é dependente da qualidade dos hormônios utilizados durante a técnica de superovulação. Extratos pituitários (ou extratos da glândula pituitária, conhecida como hipófise) obtidos diretamente de animais podem conter algumas desvantagens como alto custo para extração, baixo rendimento e transmissão de doenças. Dentro do extrato pituitário estão os hormônios folículo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH) (SANDERSON e MARTINEZ, 2020).

O FSH é uma glicoproteína composta por duas cadeias polipeptídicas, a cadeia alfa (α) e a cadeia beta (β). Mutações nos genes que expressam a FSH- β podem acarretar disfunções em mulheres como atraso puberal caracterizado por ausência ou pequeno desenvolvimento mamário, amenorreia primária e infertilidade. Isso pode significar que alterações na FSH- β também podem levar a disfunções no organismo, pois ela perderia sua especificidade biológica. Assim, a FSH- β pode ser alvo de pesquisas para conferir se possui atividade biológica como cadeia única (COSTA et al., 2003).

O receptor do FSH exibe um alto grau de especificidade tecidual. Ele é encontrado nas células de Sertoli nos testículos, estimulando a produção de espermatozoides, e nas células da granulosa nos ovários, estimulando o crescimento e maturação dos folículos ovarianos (LANDOMIEL et al., 2014).

Os folículos ovarianos são gerados durante a fase embrionária. Sendo assim, ao nascimento, o ovário apresenta cerca de 400.000 folículos, limitados e não-renováveis. Ao atingir a maturidade sexual, ou puberdade na espécie humana, a fêmea sofre uma série de alterações fisiológicas que desencadeiam respostas que preparam o corpo da fêmea para futuras gestações (ACOSTA-BUENO et al., 2020).

O mecanismo que desencadeia as alterações fisiológicas da maturação sexual não é conhecido por completo na literatura, porém o aumento no nível do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) no cérebro é uma característica já estabelecida. Do ponto de vista neuroendócrino, essa característica é o marco do início da maturação sexual, processo conhecido como período fértil (SEMAAN e KAUFFMAN, 2022).

A adenohipófise ao receber o estímulo de GnRH estimula a produção de dois hormônios: o FSH e LH. O GnRH estimula a expressão gênica da subunidade beta de LH e subunidades α e β de FSH. Dentro deste contexto de crescimento folicular, o FSH se destaca. Neste sentido a produção da bFSH- β recombinante (rbFSH- β) pode ser uma alternativa biotecnológica que poderia gerar a produção em larga escala com alto grau de pureza (SALEH; TAYLOR, 2023).

Para a escolha de um sistema de expressão deve-se levar em consideração algumas características biotecnológicas. A produção de proteínas em larga escala e o controle regulatório da expressão gênica são algumas características importantes. Além disso, a justificativa para a produção de proteínas recombinantes leva em consideração que a fonte natural da qual a proteína é obtida (no caso do FSH, obtido dos extratos pituitários diretamente de animais, por exemplo o hormônio folículo-estimulante bovino (bFSH)) é mais cara e possui baixo rendimento (KARAOĞLAN, 2023).

Neste cenário, células hospedeiras como as leveduras se destacam. Elas apresentam vantagens em relação aos outros sistemas de expressão pois incluem a capacidade de produzir alterações pós-traducionais como modificações da conformação tridimensional da proteína e

metilações, além de sua capacidade de escalonamento. Essas e outras características fazem com que as leveduras se destaquem como sistemas de expressão a serem utilizados para a produção de proteínas recombinantes (KARAOĞLAN, 2023).

A *Komagataella phaffii* (*K. phaffii*), anteriormente conhecida como *Pichia pastoris*, é uma célula hospedeira muito interessante a ser utilizada como sistema de expressão. A *K. phaffii* possui um mecanismo de controle de expressão gênica, que garante que somente as proteínas dobradas corretamente no retículo endoplasmático sejam secretadas para o meio extracelular (HUO et al., 2007).

Além disso, a *K. phaffii* é uma levedura metilotrófica. Isso significa que ela consegue crescer em metanol como única fonte de carbono e energia por meio de genes superexpressos que codificam enzimas da via de assimilação e dissimilação do metanol. O gene AOX1 (álcool oxidase 1) é um forte promotor que controla a expressão gênica da proteína recombinante, fazendo com que o gene seja induzido na presença de metanol e reprimido por glicose e etanol (TÜRKANOĞLU ÖZÇELİK et al., 2019).

Nesse contexto, esse projeto teve como objetivo avaliar métodos para otimizar a expressão proteica da rbFSH- β produzida em *Komagataella phaffii* utilizando diferentes concentrações de metanol.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos clones

Os clones utilizados no projeto, de propriedade da Proteobrás Desenvolvimento Biotecnológico Ltda., foram fornecidos em parceria pela empresa. Os clones de *K. phaffii* são modificados geneticamente para expressão da cadeia beta do hormônio foliculo-estimulante bovino (bFSH- β).

Meio sólido para cultivo da *K. phaffii*

Para a propagação da levedura, foi utilizado o meio sólido yeast extract-dextrose-peptone (YPD), nas concentrações de: 1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% dextrose e 3% ágar. O meio foi esterilizado na autoclave e vertido 20 mL de meio em cada placa de Petri.

Inoculação

Após a solidificação do meio, foram pipetados 20 μ L da amostra de clones de *K. phaffii* geneticamente modificada para produção da bFSH- β em cada placa de Petri e estriadas com bolinhas de vidro. As placas foram armazenadas em estufa a 30°C por 72 horas para crescimento.

Meio líquido para cultivo da *K. phaffii*

Após o crescimento das leveduras, elas foram transferidas para 4 diferentes Erlenmeyers de 500 mL (A, B, C e D) contendo 50 mL de meio líquido glicerol + sais previamente esterilizados, que foram colocados sob agitação constante de 500 rpm a 30°C por 24 horas.

Fermentação e indução

Após 48 horas de agitação do meio glicerol contendo as leveduras, foi adicionado metanol (MeOH) em cada erlenmeyer para iniciar a indução da fermentação em diferentes concentrações, sendo: A grupo controle (0 μ L de MeOH); B metanol 0,5% (250 μ L de MeOH); C metanol 1,0% (500 μ L de MeOH); D metanol 1,5% (750 μ L de MeOH).

O metanol foi adicionado por 4 vezes num intervalo de 12h/12h. Além disso, para cada 250 μ L de metanol foi adicionado 3 μ L de PTM1 (12 mL/L de metanol). Durante o processo de fermentação, o meio ficou sob agitação constante de 500 rpm a 30°C.

Purificação e concentração

Para a purificação da rbFSH- β , ao final da fermentação, o fermentado foi vertido em tubos falcon de 15 mL e centrifugados a 1472g por 40 minutos. O sobrenadante foi separado das leveduras e as leveduras foram descartadas.

O sobrenadante foi centrifugado em tubos de ultrafiltração Amicon com membrana de celulose de 10 kDa, onde foi lavado 3 vezes com tampão fosfato de sódio monobásico 0,1 M, pH 7,0 até a troca completa do meio. Por último, as amostras foram concentradas 40x.

Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE)

Para verificar se a proteína de interesse estava presente na amostra, foi realizado o processo de eletroforese com gel de corrida de poliacrilamida (SDS-PAGE) na concentração de 15%. A comparação da massa molecular da rbFSH- β foi feita utilizando as proteínas padrões: SBTI (20 kDa), tripsinogênio (24 kDa) e BSA (66 kDa). Para visualização da proteína no gel após a eletroforese, foi utilizada a coloração por prata.

Dosagem de proteína

A concentração proteica das amostras foi estimada por meio da utilização do corante coomassie proposto por Bradford (1976) e utilizada soroalbumina bovina (BSA) 0,05 mg/ml para a curva padrão.

Tabela 1. Volumes de BSA, amostra, água e coomassie para dosagem de proteína.

Massa (μ g)	BSA 0,05 mg/ml (μ L)	Água (μ L)	Coomassie (μ L)
0,0	0	200	600
1,0	20	180	600
2,0	40	160	600
3,5	70	130	600
5,0	100	100	600
Concentração (μ g/ μ L)	Amostra (μ L)	Água (μ L)	Comassie (μ L)
Desconhecida	20	180	600
Desconhecida	50	150	600
Desconhecida	100	100	600

Após a adição do corante coomassie, esperou-se 20 minutos para reação do corante com a proteína e posteriormente foi realizada a leitura em espectofotômetro a 595 nm. A absorbância de cada amostra foi lida e anotada para comparação com a curva padrão da BSA e determinação da concentração das amostras de concentração desconhecida.

Tabela 2. Cálculo utilizado para determinação da tangente da curva padrão da BSA.

A	B	C	D
Absorbância	Média aritmética	Absorbância corrigida (B –Tangente: branco)	Tangente: C
			$\frac{C}{\text{massa BSA}}$

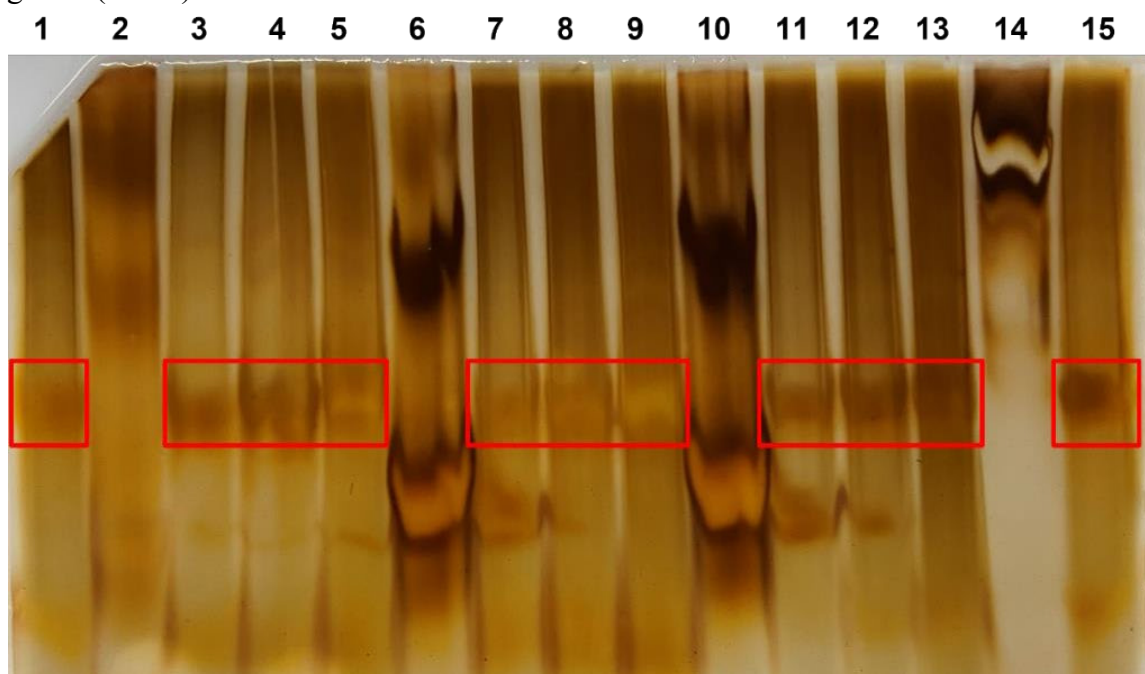
Com os valores da tangente já definidos, o cálculo da concentração das amostras desconhecidas foi feito pela razão entre C (absorbância corrigida) da amostra e D (tangente) da BSA. Para determinar qual tangente da curva de BSA seria utilizada, foi comparada o valor de C da amostra com o valor de C da BSA que mais se aproximaram.

Análise estatística

Todos os experimentos foram conduzidos de forma inteiramente casualizados. A avaliação estatística dos dados foi baseada na concentração proteica da rbFSH- β fermentada em 3 diferentes concentrações de metanol e um grupo controle negativo, e foi calculada mediante a análise de variância unilateral (ANOVA) com $p < 0,05$ e ao teste de Tukey.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

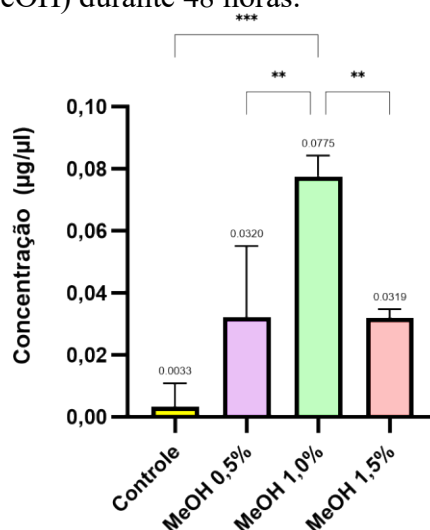
Figura 1. Eletroforese em SDS-PAGE 15%. Os retângulos vermelhos indicam a cadeia beta do hormônio foliculo- estimulante bovino recombinante (rbFSH- β), com massa molecular 18 kDa. Legenda das canaletas: 1. FSH - controle negativo (5 uL); 2. SBTI (3 uL); 3. FSH - MeOH 0,5% (2,5 uL); 4. FSH - MeOH 0,5% (5 uL); 5. FSH - MeOH 0,5% (20 uL); 6. Tripsinogênio (3 uL); 7. FSH - MeOH 1,0% (2,5 uL); 8. FSH - MeOH 1,0% (5 uL); 9. FSH - MeOH 1,0% (20 uL); 10. Tripsinogênio (3 uL); 11. FSH - MeOH 1,5% (2,5 uL); 12. FSH - MeOH 1,5% (5 uL); 13. FSH - MeOH 1,5% (20 uL); 14. BSA (2 uL); 15. FSH - controle negativo (10 uL).



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Foi possível observar as bandas da rbFSH- β (18 kDa) por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida em comparação com padrões de proteínas com massas moleculares já conhecidas (canaletas 2, 6, 10 e 14). Além disso, é possível observar que a expressão proteica aumenta nos trios de canaletas com a mesma amostra de acordo com o aumento do volume utilizado (canaletas 3 a 5, 7 a 9 e 11 a 13), indicando uma boa resolução da corrida do gel. Ainda, as amostras que utilizaram metanol 1,0% (canaletas 7, 8 e 9) indicaram maior concentração proteica em comparação com as demais concentrações de metanol, confirmando que a indução da fermentação com metanol 1,0% foi maior em comparação com as concentrações de 0,5% e 1,5%.

Figura 2: Representação gráfica da dosagem de proteína da cadeia beta do hormônio folículo-estimulante bovino recombinante (rbFSH- β) expressa em *Komagataella phaffii* em diferentes concentrações de metanol (MeOH) durante 48 horas.



A indução da fermentação utilizando metanol aumentou significativamente a expressão proteica, comparado ao grupo controle negativo. A amostra que utilizou metanol na concentração de 1,0% apresentou maior concentração proteica. As amostras fermentadas com metanol nas concentrações de 0,5% e 1,5% não demonstraram aumento significativo estatisticamente.

A expressão proteica não aumentou de forma proporcional à concentração de metanol. Isso pode ser explicado pela propriedade do metanol de ser citotóxico às células de levedura. Altas concentrações de metanol no meio de fermentação podem levar a desequilíbrios químicos importantes para a manutenção do metabolismo das leveduras.

4 CONCLUSÃO

A *K. phaffii* é um sistema de expressão passível de manipulação para expressão proteica. Ainda, a eletroforese demonstrou a pureza da proteína expressa pela *K. phaffii*, onde é possível observar somente uma banda proteica na canaleta que contém a amostra da rbFSH- β , não havendo indícios de outras proteínas com massa molecular semelhante. Essa é uma característica importante para a produção de proteínas com a finalidade de serem utilizadas em protocolos como o de superovulação.

A partir dos dados obtidos acima, é possível afirmar que a indução da fermentação de *K. phaffii* para expressão da rbFSH- β utilizando metanol na concentração de 1,0% demonstrou maior aumento da concentração proteica da rbFSH. A concentração proteica do metanol 1,0% foi quase 25 vezes maior comparado ao grupo controle negativo. As amostras fermentadas com metanol nas concentrações de 0,5% e 1,5% não demonstraram aumento significativo estatisticamente. Esse resultado pode ser aplicado na otimização de protocolos como o de superovulação a fim de aumentar a expressão de proteínas recombinantes.

A pesquisa foi adaptada para ser realizada com equipamentos que mimetizam um biorreator, sendo mais indicado o uso de biorreatores. Os biorreatores podem ser programados para adicionarem metanol de forma constante, o que deve ser mais viável para o metabolismo da levedura. Além disso, variáveis como pH, aeração, oxigênio dissolvido e adição de antiespumante não foram consideradas na pesquisa.

REFERÊNCIAS

SAID, S. et al. The role of biotechnology in animal production. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 492, n. 1, p. 012035, 1 abr. 2020.
<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/492/1/012035/meta>.

KHAN, S. et al. Factors affecting superovulation induction in goats (*Capra hircus*): An analysis of various approaches. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 10, 24 mar. 2023.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1152103>.

LOLLATO, J.P.M.; SOUZA, A.C.C.; SILVA, R.C.P.; MARQUES, M.O.; CROZARA, A.s.; GONÇALVES, R.L.; CUNHA, L.s.; SENEDA, M.M.; MOROTTI, F.. *In vivo* embryo production in bovine donors with low and high antral follicle counts superovulated with low and high FSH doses. **Livestock Science**, [S.L.], v. 262, p. 104985, ago. 2022. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2022.104985>.

COSTA, E. M. F. et al. Genética molecular do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, p. 440–452, 1 ago. 2003.
<https://doi.org/10.1590/S0004-27302003000400016>.

SANDERSON, N.; MARTINEZ, M.. A single administration of a long-acting recombinant ovine FSH (roFSH) for cattle superovulation. **Theriogenology**, [S.L.], v. 154, p. 66-72, set. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.037>.

LANDOMIEL, Flavie et al. Biased signalling in follicle stimulating hormone action. **Molecular And Cellular Endocrinology**, [S.L.], v. 382, n. 1, p. 452-459, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2013.09.035>.

ACOSTA-BUENO, Carmen et al. Estrategias de mejora de la fertilidad: preservación, rejuvenecimiento y células madre. **Medicina Reproductiva y Embriología Clínica**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 33-49, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.medre.2020.02.004>.

SALEH, Farrah L.; TAYLOR, Hugh S.. Clinical applications of gonadotropin-releasing hormone analogues: a broad impact on reproductive medicine. **F&S Reports**, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 83-87, jun. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.xfre.2023.01.008>.

KARAOĞLAN, Mert. Alternative secretory signal sequences for recombinant protein production in *Pichia pastoris*. **Enzyme And Microbial Technology**, [S.L.], v. 168, p. 110256, ago. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmtec.2023.110256>.

SEMAAN, Sheila J.; KAUFFMAN, Alexander S.. Developmental sex differences in the peripubertal pattern of hypothalamic reproductive gene expression, including *Kiss1* and *Tac2*, may contribute to sex differences in puberty onset. **Molecular And Cellular Endocrinology**, [S.L.], v. 551, p. 111654, jul. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2022.111654>.

HUO, Xiangdong et al. Co-expression of human protein disulfide isomerase (hPDI) enhances secretion of bovine follicle-stimulating hormone (bFSH) in *Pichia pastoris*. **Protein Expression And Purification**, [S.L.], v. 54, n. 2, p. 234-239, ago. 2007. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2007.03.016>.

TÜRKANOĞLU ÖZÇELİK, A.; YILMAZ, S.; INAN, M. *Pichia pastoris* Promoters. **Methods in Molecular Biology**, p. 97–112, 2019. Doi: 10.1007/978-1-4939-9024-5_3.