



Análise preliminar da expressão proteica de fragmento de anticorpo recombinante em *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*)

Preliminary analysis of protein expression of recombinant antibody fragment in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*)

Cairo Alencar Zancanella¹, Luís Felipe Minozzo Figueiredo².

RESUMO

A paracoccidiodomicose (PCM) é uma micose endêmica na América Latina, com alta mortalidade no Brasil, e coinfeção PCM/HIV agrava a doença. Ferramentas moleculares melhoram a compreensão epidemiológica, mas o diagnóstico clínico é demorado. Portanto, este trabalho teve como propósito conduzir uma análise de proteínas a fim de avaliar a eficácia das expressões realizadas em ensaios anteriores. As proteínas presentes no sobrenadante de amostras obtidas de ensaios anteriores foram analisadas por dodecilsulfato de sódio de poliácridamida (SDS-PAGE). Devido à dificuldade em determinar a concentração proteica, as amostras foram liofilizadas e ressuspendidas. A concentração de proteínas foi determinada pelo ensaio de Bradford. Observou-se que as colônias A8 (colônia 31, 6, 45 e 13) e A3 (colônias 7 e 28) demonstraram maior eficiência no processo de expressão proteica. Além disso, verificou-se que a absorbância, embora correlacionada com o crescimento celular, não reflete diretamente a produção de proteínas.

PALAVRAS-CHAVE: Bradford, proteína recombinante, *Komagataella phaffii*.

ABSTRACT

Paracoccidiodomycosis (PCM) is an endemic mycosis in Latin America, with high mortality rates in Brazil, and the co-infection of PCM/HIV worsens the disease. Molecular tools enhance epidemiological understanding, but clinical diagnosis is time-consuming. Therefore, the purpose of this study was to conduct a protein analysis to assess the effectiveness of expressions performed in previous assays. The proteins in the supernatant of samples obtained from previous assays were analyzed by sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Due to the difficulty in determining protein concentration, the samples were lyophilized and re-suspended. Protein concentration was determined by the Bradford assay. It was observed that colonies A8 (colony 31, 6, 45, and 13) and A3 (colony 7 and 28) demonstrated greater efficiency in the protein expression process. Additionally, it was found that absorbance, although correlated with cell growth, does not directly reflect protein production.

KEYWORDS: Bradford, recombinant protein, *Komagataella phaffii*.

INTRODUÇÃO

A paracoccidiodomicose (PCM) é uma micose endêmica na América Latina causada por uma espécie do gênero *Paracoccidioides* e é responsável por aproximadamente metade das mortes totais devido a micoses sistêmicas no Brasil. A PCM em hospedeiros imunocompetentes pode se apresentar em duas formas clínicas: aguda/subaguda e crônica. No entanto, estudos clínicos relacionados à PCM em pacientes infectados pelo HIV mostram que as manifestações aguda e crônica da doença podem ocorrer simultaneamente (Prado *et al.*, 2009; Benard & Duarte, 2000; Messina *et al.*, 2020; Paniago *et al.*, 2005).

O desenvolvimento de ferramentas moleculares para identificar as espécies do gênero *Paracoccidioides* ajudou a aprimorar o conhecimento sobre a PCM no campo da epidemiologia, embora no cenário clínico a necessidade de identificar a espécie seja incerta e com relativa demora (Benard & Duarte, 2000; Messina *et al.*, 2020; Paniago *et al.*, 2005). Dentro deste contexto, proporcionar um método de diagnóstico mais rápido para PCM

¹ Bolsista da Fundação Araucária. Universidade Tecnológica Federal de Toledo, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: cairo.zancanella@gmail.com. ID Lattes: 9257386272026597.



utilizando fragmento de anticorpo monoclonal e proteína recombinante se mostra de grande relevância.

A levedura metilotrófica *Komagataella phaffii*, anteriormente denominada *Pichia pastoris*, tem suscitado crescente interesse devido à sua eficiente capacidade de secreção de proteínas heterólogas, a elevada concentração de biomassa que pode ser alcançada. Além disso, os sistemas de levedura oferecem vantagens significativas em relação aos sistemas bacterianos, incluindo a capacidade de realizar modificações pós-traducionais, o potencial para aplicações em engenharia metabólica e garantir a correta conformação e dobramento da proteína final, necessários para sua atividade correta (Gasser *et al.*, 2008).

Portanto, com o propósito de avaliar a eficácia das expressões realizadas em ensaios anteriores, foi conduzida uma análise das proteínas expressas.

METODOLOGIA

Inicialmente, procedeu-se à análise das proteínas presentes no sobrenadante das amostras por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). As amostras submetidas à análise correspondem às expressões conduzidas em ensaios anteriores, sendo o foco da análise o sobrenadante dessas expressões, coletado após um período de 72 horas de indução da expressão proteica. Realizou-se previamente o total de 8 conjuntos de experimentos, cada um envolvendo 7 colônias distintas. A separação das amostras de proteína foi realizada por SDS-PAGE em um gel de 12 %, sob condições redutoras. Como não foi possível determinar a concentração proteica das amostras, aplicou-se 15 µL de sobrenadante de meio clarificado na proporção 1:1 com tampão de amostra com redução (tris-HCl 0,13 mol/L, glicerol 21 % v/v; dodecilsulfato de sódio 36,8 g/L; 2-mercaptoetanol 10,5 % v/v; azul de bromofenol 0,1 g/L). A separação foi realizada em voltagem constante de 100 V, e o gel foi corado utilizando o método de coloração por azul de Coomassie brilhante (BOUZON, 2006).

Tendo em vista a impossibilidade inicial de realizar a dosagem, assim como a não observação no gel de poliacrilamida, decidiu-se concentrar as proteínas presentes nas amostras. Para isso, as amostras foram congeladas em ultrafreezer a -40 °C e liofilizadas empregando um liofilizador da marca Liotop modelo L101 por um período de 34 horas. Logo após, as amostras foram ressuscitadas com água destilada, utilizando um volume de 500 µL para os ensaios que apresentavam visualmente uma menor quantidade de proteínas e 1000 µL para aqueles com maior quantidade.

Posteriormente a esta etapa, procedeu-se a determinação da concentração de proteínas por meio do ensaio de Bradford modificado para microplaca (Bradford, 1976). Em resumo, uma curva padrão foi construída utilizando o soro de albumina bovina (BSA) a uma concentração de 0,1 mg/mL, com cinco pontos (variando de 0,0125 a 0,1 mg/mL). Simultaneamente, as amostras de proteína foram adicionadas à microplaca com uma diluição de 1:2. No entanto, é importante destacar que, devido a resultados do ensaio, algumas amostras precisaram ser quantificadas novamente sem que fossem diluídas no ensaio. Além disso, em virtude das limitações do leitor de microplacas utilizado, a leitura

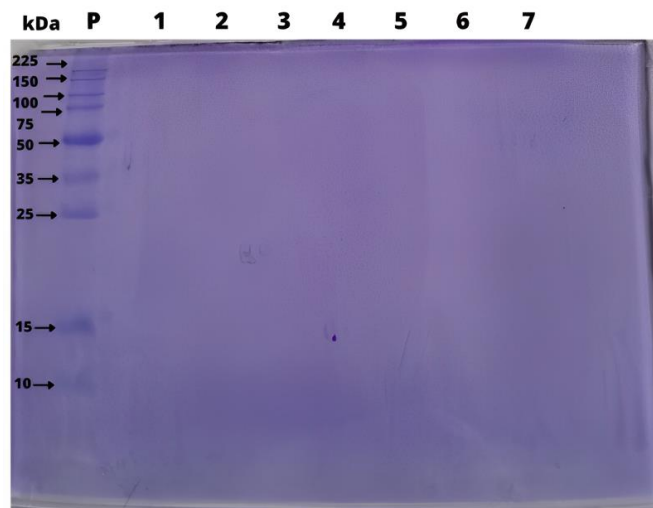


das absorvâncias foi realizada no comprimento de onda mais próximo disponível, que foi de 630 nm, em vez do valor ideal de 595 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para iniciar a avaliação das proteínas obtidas por meio da expressão em *K. phaffii*, conduziu-se o ensaio de SDS-PAGE em um gel de poliacrilamida 12 %, sob condições redutoras, utilizando uma amostra sem diluição, após 72 horas de expressão. No entanto, ao analisar a Figura 1, é possível notar que a intensidade do sinal das proteínas está significativamente reduzida. Essa diminuição pode estar relacionada à concentração das proteínas na amostra, uma vez que, em casos de concentrações muito baixas, a detecção das mesmas no gel pode ser comprometida.

Figura 1 – Ensaio SDS-PAGE.



Legenda: P - padrão de massa molecular; 1 a 7 - 15 μ L das amostras das expressões das colônias 1 a 7 após 72 h de indução, na proporção 1:1 com tampão de amostra com redução. A separação foi realizada a 100 V e o gel foi corado com azul de Coomassie brilhante.

Fonte: Autoria própria (2023).

Dessa forma, com o objetivo de concentrar as proteínas contidas nas amostras, considerando que estas se encontravam em suspensão em uma matriz aquosa e que, devido à natureza das proteínas, estas são sensíveis ao calor, optou-se pela aplicação do método de liofilização. Posteriormente a esse procedimento, as amostras liofilizadas foram reconstituídas em um volume de 500 μ L ou 1000 μ L de água destilada, de acordo com a quantidade original da amostra. Pode-se observar o volume final de ressuspensão para cada amostra na Tabela 1.

Após a ressuspensão das amostras, procedeu-se à realização do teste de Bradford com o intuito de quantificar a concentração das proteínas presentes. Uma curva padrão foi estabelecida utilizando a média das absorvâncias obtidas a partir das amostras de BSA com concentrações conhecidas, e a linearização desse padrão é apresentada na Figura 2.



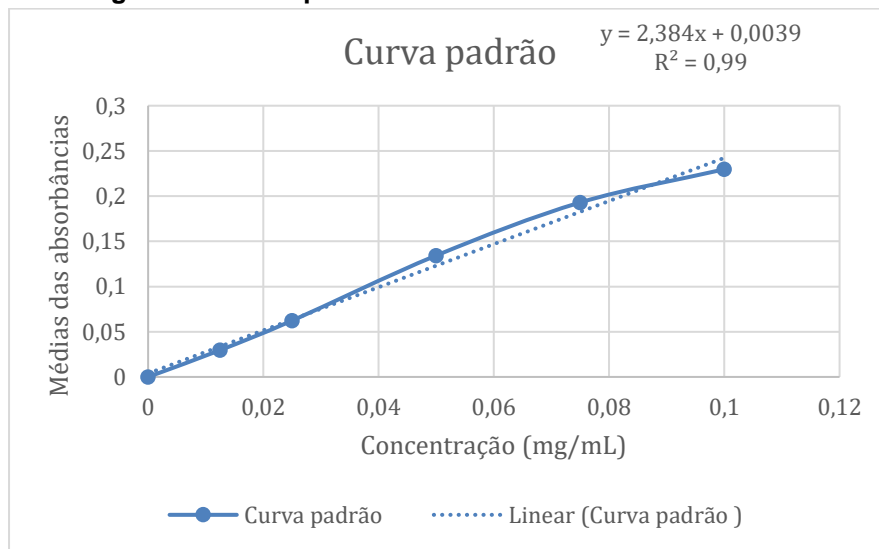
Tabela 1 – Amostras utilizadas e suas colônias com respectivo volume adicionado.

Amostras	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
Colônias e Volume adicionado (uL)	7 - 1000	6 - 1000	7 - 500	6 - 500	7 - 1000	6 - 500	7 - 500	6 - 1000
	18 - 500	13 - 500	18 - 1000	13 - 1000	18 - 1000	13 - 1000	18 - 1000	13 - 1000
	28 - 500	31 - 1000	28 - 1000	31 - 1000	28 - 1000	31 - 500	28 - 1000	31 - 500
	48 - 1000	39 - 500	48 - 1000	39 - 1000	48 - 1000	39 - 1000	48 - 500	39 - 1000
	58 - 1000	45 - 500	58 - 1000	45 - 1000	58 - 1000	45 - 500	58 - 500	45 - 500
	75 - 500	70 - 1000	75 - 1000	70 - 500	75 - 1000	70 - 500	75 - 1000	70 - 500
	76 - 1000	77 - 1000	76 - 1000	77 - 1000	76 - 1000	77 - 1000	76 - 500	77 - 1000

Cada amostra (A) corresponde a 7 colônias distintas, sendo que cada colônia foi analisada em quadruplicata. O número precedente ao hífen no quadro indica a identificação da colônia, enquanto o número subsequente ao hífen denota o volume de água adicionado. Além disso, ressalta-se que as amostras de número ímpar (A1, A3, A5 e A7) correspondem a colônias que demonstraram uma menor adaptação à expressão de proteínas, ao passo que as amostras de número par (A2, A4, A6 e A8) apresentaram uma melhor adaptação, conforme observado em experimentos anteriores.

Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 2 – Curva padrão obtida com as amostras de BSA.



Fonte: Autoria própria (2023).

Posteriormente, a partir da média das absorbâncias das amostras, determinou-se a concentração das proteínas no ensaio, cujos valores de concentração estão apresentados na Tabela 2.

Pode-se notar que as amostras que apresentaram concentrações mais elevadas de proteínas foram aquelas que apresentaram uma maior adaptação para expressão mais eficaz das proteínas em ensaios anteriores que já haviam sido apresentados ao SICITE



2022 pelo trabalho “Análise cinética de *Pichia pastoris* (ou *Komagataella phaffi*) transformadas com fragmento de anticorpo conjugado a fosfatase alcalina” (Zancanella; Figueiredo, 2022), nomeadamente A8 (colônia 31, 6, 45 e 13). No entanto, vale destacar que as amostras A3 (colônias 7 e 28), que foram classificadas como menos adaptadas, também apresentaram concentrações proteicas significativas no sobrenadante da cultura.

Tabela 2 – Amostras utilizadas e suas colônias com a concentração proteica determinada.

Amostras	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
Colônias e Concentração determinadas (mg/mL)	7 - 0,043	6 - 0,065	7 - 0,095	6 - 0,068	7 - 0,018	6 - 0,071	7 - 0,094	6 - 0,125
	18 - 0,031	13 - 0,033	18 - 0,017	13 - 0,042	18 - 0,016	13 - 0,047	18 - 0,039	13 - 0,109
	28 - 0,027	31 - 0,024	28 - 0,090	31 - 0,017	28 - 0,038	31 - 0,017	28 - 0,066	31 - 0,149
	48 - 0,037	39 - 0,030	48 - 0,019	39 - 0,032	48 - 0,024	39 - 0,030	48 - 0,022	39 - 0,052
	58 - 0,034	45 - 0,035	58 - 0,016	45 - 0,026	58 - 0,016	45 - 0,080	58 - 0,062	45 - 0,118
	75 - 0,063	70 - 0,035	75 - 0,014	70 - 0,022	75 - 0,015	70 - 0,144	75 - 0,013	70 - 0,039
	76 - 0,024	77 - 0,015	76 - 0,012	77 - 0,021	76 - 0,034	77 - 0,051	76 - 0,016	77 - 0,069

Cada amostra (A) corresponde a 7 colônias distintas, sendo que cada colônia foi analisada em quadruplicata. O número precedente ao hífen no quadro indica a identificação da colônia, enquanto o número subsequente ao hífen denota a concentração proteica obtida, já multiplicada pelo fator de diluição.

Fonte: Autoria própria (2023).

Dessa forma, relacionou-se as concentrações proteicas deste estudo, obtidas através da Lei de Lambert-Beer, com os valores máximos de absorvância determinados em experimentos anteriores. Constatou-se que as colônias 6, 13, 31 e 45 de ensaios anteriores, atingiram valores máximos de absorvância a 595 nm de 2.208, 2.276, 2.481 e 2.268, respectivamente, enquanto as colônias 7 e 28 registraram valores máximos de 2.537 e 2.456. É importante destacar que, embora as colônias 7, 28 e 31 tenham apresentado previamente uma maior densidade celular, a elevada absorvância e o crescimento em meio de cultura sólido não necessariamente implicou em uma maior produção de proteínas. Portanto, a seleção adequada das colônias em ensaios de expressão apresenta uma significativa importância.

Apesar de algumas dessas colônias não terem demonstrado valores de densidade celular (OD₆₀₀) tão elevados quanto outras em ensaios anteriores, a análise das proteínas revelou que a relação entre concentração proteica e densidade celular não é necessariamente proporcional. Este resultado está em consonância com as conclusões apresentadas por Rodrigues *et al.* (2011). Além disso, o estudo de Rodrigues *et al.* (2011) também aponta que a densidade celular está associada a um fenômeno conhecido como efeito de sombreamento de célula para célula.



CONCLUSÃO

Os dados evidenciam a importância da seleção cuidadosa das colônias mais e menos adaptadas ao processo de expressão de proteínas em *Komagataella phaffii*, visto que as colônias A8 (colônia 31, 6, 45 e 13) e A3 (colônias 7 e 28) demonstraram maior eficiência no processo de expressão proteica. Além disso, verificou-se que a absorvância, embora correlacionada com o crescimento celular, não reflete diretamente a produção de proteínas. Contudo requer-se ainda a caracterização funcional do produto recombinante obtido através da determinação da massa molecular das proteínas expressas, bem como a avaliação de sua atividade biológica.

Agradecimentos

Gostaria de registrar os agradecimentos ao CNPq através da Chamada Universal MCTIC/CNPq n.º 28/2018, à UTFPR-Toledo pelo fomento ao projeto de pesquisa e a Fundação Araucária pela bolsa de iniciação científica. Também gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Luís Felipe Minozzo Figueiredo por toda a orientação.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

- PRADO, M *et al.* Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2009.
- BENARD, G.; DUARTE, A. J. S. Paracoccidioidomycosis: a model for evaluation of the effects of human immunodeficiency virus infection on the natural history of endemic tropical diseases. **Clinical Infectious Diseases**, 2000.
- MESSINA, F. *et al.* Clinical and microbiological characteristics of paracoccidioidomycosis in patients with AIDS in Buenos Aires, Argentina. **Medical Mycology**, 2020.
- PANIAGO, A. M. *et al.* Paracoccidioidomycosis in patients with human immunodeficiency virus: review of 12 cases observed in an endemic region in Brazil. **Journal of Infection**, 2005.
- RODRIGUES, Lúcia Helena Ribeiro *et al.* Algal density assessed by spectrophotometry: A calibration curve for the unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Journal Of Environmental Chemistry And Ecotoxicology**. Porto Alegre, RS, p. 225-228. ago. 2011.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>.
- ZANCANELLA, C. A.; FIGUEIREDO, L. F. M. Análise cinética de *Pichia pastoris* (ou *Komagataella phaffii*) transformadas com fragmento de anticorpo conjugado a fosfatase alcalina. XXVIII SICITE-UTFPR, Santa Helena (2022).
- BOUZON, Zenilda Laurita. Histoquímica e ultra-estrutura da ontogênese dos tetrasporângios de *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). **Rev. bras. Bot.**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 229-238, June 2006.