



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**PRODUÇÃO DE BIOFÁRMACOS PELA LEVEDURA *PICHIA*
*PASTORIS***

Trabalho submetido por

Diana de Jesus Leal Matos Guerreiro

para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por

Doutora Maria Catarina Marques Dias de Almeida

novembro de 2016

Agradecimentos

As primeiras pessoas a quem gostaria de agradecer é aos meus pais, em especial à minha mãe, que sempre me apoiou neste objetivo da minha vida. Não posso esquecer todos os restantes familiares, avós e irmão.

Um especial agradecimento ao meu companheiro, Pedro, pela paciência, incentivo e apoio em todos os momentos.

À minha orientadora, Professora Catarina Dias de Almeida, por todo o apoio, disponibilidade e orientação que demonstrou para comigo. Quero agradecer a especial paciência que teve comigo ao longo da elaboração desta monografia.

Quero também agradecer a todos os professores que me transmitiram ao longo deste curso os conhecimentos e me capacitaram das ferramentas necessárias para a conclusão do meu curso.

Agradeço também ao Instituto Superior de Ciências de Saúde Egas Moniz pela oportunidade e a todos os meus colegas de curso com quem tive o prazer de trabalhar mas em especial quero deixar o meu agradecimento à minha amiga e colega Vanessa Sainz, que caminhou ao meu lado ao longo do curso e mesmo longe nunca deixou de estar perto para me apoiar e incentivar.

Por fim quero agradecer aos meus amigos, que sempre apoiaram e compreenderam as ausências ao longo desta etapa e que estiveram sempre presentes nos momentos mais difíceis.

Resumo

A produção comercial de biofármacos tem vindo a crescer desde a década de 70, altura em que a indústria biotecnológica se começou a aperfeiçoar exponencialmente.

Atualmente, o mercado de produção de proteínas recombinantes atingiu valores multimilionários. Para a indústria biotecnológica, o objetivo é obter processos competitivos: altamente produtivos, para além de eficientes. Nas últimas décadas, muitos estudos têm sido realizados no sentido de melhorar os processos de produção de proteínas heterólogas não só explorando novas tecnologias mas também novos hospedeiros.

A levedura *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) é considerada um hospedeiro com características específicas, que tornam o seu sistema de expressão uma ferramenta muito utilizada na produção de biofármacos em várias áreas da saúde.

Os avanços no desenvolvimento de novas linhagens, vetores, aperfeiçoamento de técnicas bem como a melhor compreensão da biologia das espécies *P. pastoris* aumentaram o valor comercial desta levedura na indústria biotecnológica.

O objetivo desta monografia foi explorar os mecanismos de expressão da levedura *P. pastoris*, bem como analisar evidência científica sobre novos avanços nesta área de constante desenvolvimento.

Por outro lado, esta monografia teve como segundo objetivo pesquisar novas referências de investigação que adotaram o sistema de expressão da *P. pastoris* para a produção de proteínas para aplicação na indústria farmacêutica em áreas de investigação associadas à diabetes, à alergia, ao cancro, ao papiloma vírus humano e à aterosclerose.

Palavras-chave: *Pichia pastoris*, proteínas recombinantes heterólogas, biofármacos, indústria biotecnológica

Abstract

The commercial production of biopharmaceuticals has been growing since the 70s, when the biotechnology industry market share began to improve exponentially.

Nowadays, the recombinant protein production market reached multibillion-dollar values, seeking competitive production processes.

For the biotechnology industry the goal is to get highly productive and efficient processes, and in recent decades many studies have been conducted to improve the heterologous protein production processes not only exploring new technology but also new hosts.

The yeast *P. pastoris* is considered a host with specific features that make its expression system a highly used tool in the production of biopharmaceuticals in several areas of health.

The advances in the development of new strains, vectors, improved techniques and better understanding of the biology of *P. pastoris* species increased the commercial value of this yeast in the biotechnology industry.

The intent of this monograph was to explore the mechanisms of expression of the yeast *P. pastoris*, as well as to analyze scientific evidence about new advances in this area of constant development.

Moreover, this monograph second intent was to explore new research results that have adopted the expression system of *P. pastoris* in the production of proteins for use in the pharmaceutical industry. Some of the research areas discussed in this monograph were diabetes, allergy, cancer, human papilloma virus and atherosclerosis.

Keywords: *Pichia pastoris*, heterologous recombinant protein, biopharmaceuticals, biotechnonology

Índice geral

Resumo	1
Abstract	2
Índice geral	3
Índice de figuras	4
Índice de tabelas	5
Lista de Abreviaturas	6
1. Introdução	8
2. Organização Genética e fisiologia da levedura <i>P. pastoris</i>	9
3. Sistemas de expressão utilizados na produção de biofármacos	11
4. Sistema de expressão da levedura <i>P. pastoris</i>	12
4.1. Principais vantagens da utilização do sistema de expressão da <i>P. pastoris</i>	12
4.2. Promotores de expressão da <i>P. pastoris</i>	15
4.3. Modificações pós-traducionais.....	17
4.4. Estudos de aperfeiçoamento das características de expressão proteica na <i>P. pastoris</i>	19
5. <i>P. pastoris</i> como sistema de expressão de biofármacos utilizados na indústria farmacêutica	24
5.1. Diabetes.....	25
5.2. Alergias	28
5.3. Tratamentos anticancerígenos e o sistema de expressão proteico da <i>P. pastoris</i> . 32	
5.4. Fragmentos de anticorpos scFv como potenciais marcadores.	35
5.5. Expressão da proteína de resistência do cancro da mama utilizando a <i>P. pastoris</i>	38
5.6. <i>P. pastoris</i> como sistema de expressão para desenvolvimento de vacinas contra o papiloma vírus humano.	39
5.7. Desenvolvimento de fármacos para a aterosclerose utilizando <i>P. pastoris</i>	41
6. Conclusões	43
7. Bibliografia	46

Índice de figuras

Figura 1 - Levedura <i>P. pastoris</i>	9
Figura 2. Desenvolvimentos recentes em biologia sintética que melhoraram a qualidade dos produtos biofarmacêuticos na <i>P. pastoris</i>	14
Figura 3 - Linhas de investigação dos sistemas de expressão da levedura recombinante, <i>P. pastoris</i>	24
Figura 4 - Tendências da prevalência da diabetes nas regiões da OMS, entre 1980 e 2014.....	25
Figura 5 - Distribuição geográfica mundial dos alergênicos das ordens Proteales, Lamiales e Pinales.....	28
Figura 6 – Terapia ADEPT com recurso a anticorpos humanizados monoclonais para direcionamento celular	32
Figura 7 – Ensaio químico de imunofluorescência com tecidos tumorais LS174T, COLO205 e tecidos do fígado.	36
Figura 8 – Imagens de dissecação de tecidos tumorais ortotópicos utilizando CF750-A33scFv-Fc., em três ratos diferentes.....	36
Figura 9 - Polimorfismo na sequência Kozak sequência no gene GP Iba e na expressão <i>in vitro</i> das variantes polimórficas.	41

Índice de tabelas

Tabela 1 - Exemplos de proteínas heterólogas expressas pela *P. pastoris*. 12

Tabela 2 – Exemplos de promotores alternativos ao pAOX1 na *P. pastoris* 16

Tabela 3 – Análise comparativa de características de cinco sistemas diferentes de expressão proteica. 17

Tabela 4 – Composição e aplicações de glicoformas major expressas por linhagens recombinadas de *P. pastoris* através de sistema *GlicoSwitch*.. 19

Lista de Abreviaturas

ADEPT: Antibody-Directed Enzyme-Prodrug Therapy

AIA: Ácido indolacético

AOX1: Álcool oxidase 1

AOX2: Álcool oxidase 2

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementar

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensageiro

EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein

EUA.: Estados Unidos da América

EPO: Eritropoetina

Fabs: Fragmentos de ligação ao antigénio

FD: Ferridoxinas - proteínas ferro-enzofre

FDA: Food and Drug Administration

GDEPT: Gene-Directed Enzyme-Prodrug Therapy

HER2: Recetor tipo 2 do factor de crescimento epidérmico Humano

hGh: Hormona de Crescimento

HRP: *Horseradish peroxidase* ou peróxido de hidrogénio óxido-redutase

HPV: Papiloma vírus Humano

IMAC: Cromatografia de imobilização por afinidade metal-iões

IgE: Imunoglobulina E

IUIS: União Internacional de Sociedades de Imunologia

MAB: Anticorpos monoclonais

MAP QUINASE: Proteína-quinases ativadas por mitógenos

Mbp: milhões de pares de base

MUT⁻: Fenótipo que não utiliza metanol em *P. pastoris* recombinada

MUT⁺: Fenótipo que utiliza mais metanol em *P. pastoris* recombinada

MUTs: Fenótipo que utiliza lentamente o metanol em *P. pastoris* recombinada

Na⁺,K⁺-ATPase: Adenosina trifosfatase sódio-potássio

NOS: Enzima óxido nítrico sintetase

OMS.: Organização Mundial de Saúde

OCH1, Gene codificante da enzima alpha-1,6-manosiltransferase

pAOX1: Promotor da enzima álcool oxidase 1

pFDH: Promotor da enzima formaldeído desidrogenase dependente de glutatona

pGAP: Promotor do gene da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

PHO1: péptido de secreção da fosfatase ácida da *P. pastoris*

pICL1: promotor do gene enzima isocitrato liase 1

PpATT1: Gene homólogo do gene activator transcricional GAL4 da levedura *S. cerevisiae*

RE: Retículo endoplasmático

scFvs: Fragmentos variáveis de cadeia única

ScGAL4 Gene ativador transcricional envolvido na regulação das enzimas metabólicas da galatose na *S. cerevisiae*

SUC2: Sacarose invertase da *S. cerevisiae*

1. Introdução

A insulina recombinante para tratamento da Diabetes foi o primeiro biofármaco aprovado para uso clínico pela Food and Drug Administration (FDA), no início dos anos 1980 (Ferrer-Miralles, Domingo-Espín, Corchero, Vázquez & Villaverde, 2009).

Desde a aprovação deste biofármaco obtido a partir da bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*), já foram aprovados mais de 230 biofármacos, que são utilizados na prevenção e tratamento de várias doenças, abrangendo desde doenças infecciosas, desordens inflamatórias, doenças metabólicas e cânceros (Jiang et al., 2014).

O termo “biofármaco” refere-se não só a proteínas recombinantes terapêuticas como também a produtos e derivados de ácidos nucleicos (Vogl, Hartner & Glieder, 2013). Existem atualmente, como exemplos de biofármacos de origem proteica utilizados na indústria farmacêutica, as vacinas, os interferões, hormonas como a insulina, hormona de crescimento (hGh), a eritropoetina (EPO) e os anticorpos, nomeadamente fragmentos de anticorpos, Fabs (fragmento de ligação ao antígeno), scFvs (fragmento variável de cadeia única) e nanocorpos. Os anticorpos representam a maior percentagem de biofármacos aprovados (Vogl et al., 2013).

Um dos primeiros biofármacos aprovados pela FDA, produzidos pela levedura *P. pastoris*, foi o *Ecallantide*, uma proteína recombinante, inibidora da calicreína, utilizada para tratamento de crises agudas de angioedema hereditário (Lunn & Banta, 2011). A calicreína é uma glicoproteína, que faz parte da família das proteases serínicas presentes nos tecidos e nos fluidos corporais dos mamíferos. As calicreínas plasmáticas atuam ao nível da cascata da coagulação sanguínea e na fibrinólise. Apesar da sua importância as calicreínas apenas estão presentes nos órgãos e fluidos biológicos em baixas concentrações (Raspi, 1996).

2. Organização Genética e fisiologia da levedura *P. pastoris*

O genoma da levedura *P. pastoris*, tem o tamanho de 9,43 milhões de pares de base (Mbp), organizado em quatro cromossomas. O crescimento é feito por via respiratória, a via preferencial desta levedura (Fickers, 2014).

Recentemente reclassificada como *Komagataella pastoris*, cujo aspeto ao microscópio é o apresentado na Figura 1 (Ahmad, Hirz, Pichler & Schwab, 2014).



Figura 1 - Levedura *P. pastoris* (<http://www.diark.org>).

A *P. pastoris* é classificada como uma levedura metilotrófica, que consegue crescer em meios em que o metanol é a única fonte de carbono e energia. Esta levedura foi descoberta pela companhia petrolífera *Phillips*, sendo depois utilizada na conversão de metanol em proteína celular. Esta companhia desenvolveu processos de melhoramento da levedura para a tornar mais eficiente na produção em biomassa a partir do metanol. Contudo, com a crise do petróleo em 1970, o processo tornou-se demasiado dispendioso devido ao elevado custo do metanol (Serrano-Rivero, Marrero-Domínguez & Fando-Calzada, 2015).

No final do ano de 1980, a companhia petrolífera *Phillips* e o Instituto de Biotecnologia dos Estados Unidos da América (EUA), desenvolveram um conjunto de novas ferramentas para a produção de proteínas heterólogas através da *P. pastoris*, nomeadamente vetores de expressão, métodos de transformação genética, marcadores de seleção e bioprocessos, com o intuito de explorar o potencial produtivo desta levedura (Serrano-Rivero et al., 2015). Foi possível desenvolver meios e métodos de crescimento da levedura da *P. pastoris* em meios de cultura contínuos em larga escala, tendo o metanol como sua fonte de carbono (Cregg, Barringer, Hessler & Maddenet, 1985).

Até à data do artigo, Serrano-Rivero et al. (2015), os autores referem que mais de mil proteínas heterólogas foram clonadas e expressas através da *P. pastoris*, nomeadamente, fragmentos de anticorpos, precursores da insulina, fatores de necrose tumoral, antigénio do citomegalovírus pp55 e enzimas líticas.

O processo metabólico da *P. pastoris* envolve um conjunto de enzimas específicas e os passos iniciais deste processo ocorrem nos peroxissomas onde o metanol é convertido em formaldeído por duas enzimas álcool desidrogenases. O formaldeído é posteriormente convertido em dihidroxiacetona e gliceraldeído-3-fosfato por uma dihidroxiacetona sintase. Dentro do peroxissoma, o peróxido de oxigénio obtido nos primeiros passos da oxidação do metanol, é convertido por uma catalase, em oxigénio e água. Os passos seguintes da assimilação do metanol ocorrem no citosol (Fickers, 2014).

Para a produção e transformação proteica a *P. pastoris* dispõe de três tipos de linhagens hospedeiras, que diferem ao nível da sua capacidade de metabolizar o metanol. Existe o fenótipo Mut⁺ (linhagem selvagem), Mut^s (utilização de metanol lenta, resultante da deleção da álcool oxidase 1 (AOX1)), e a Mut⁻ (utilização de metanol baixa, resultante da deleção de AOX1-AOX2 (álcool oxidase 2)). O fenótipo Mut⁺ é frequentemente usado na produção de proteínas recombinantes, apesar do fenótipo Mut^s ser também utilizado em alguns casos (Fickers, 2014). Os genes AOX1 e AOX2 são genes codificantes das enzimas álcool oxidase 1 e 2 respetivamente (Vanz et al., 2013) e no caso da enzima codificada pelo gene AOX1, esta apresenta cerca de 90% de atividade celular da enzima álcool oxidase na célula e mais de 30% do total de proteínas solúveis (Cos, Ramón, Montesinos & Valero, 2006).

O promotor do gene AOX1 (pAOX1) pode ser facilmente reprimido quando a levedura *P. pastoris* é produzida em presença de glicerol, glucose ou etanol e fortemente induzida na presença do metanol (Serrano-Rivero et al., 2015).

3. Sistemas de expressão utilizados na produção de biofármacos

Na escolha de um processo de produção eficaz e produtivo de um biofármaco é necessário que seja selecionado um organismo hospedeiro adequado para o tipo de biofármaco que se procura obter (Weinacker, 2013).

Atualmente a produção de biofármacos pode ser feita a partir dos sistemas hospedeiros de expressão proteica, em células eucariotas, leveduras ou bactérias. O recurso a sistemas bacterianos tem a vantagem de serem sistemas de expressão mais rápidos e robustos em biorreatores de culturas simples, enquanto as células dos mamíferos assemelham-se mais às células humanas no que respeita às modificações pós-traducionais em eucariotas típicas, como por exemplo a glicosilação (Vogl et al., 2013). O processo de glicosilação é necessário para assegurar a função e atividade proteica *in vivo*, influenciando a sua estabilidade e solubilidade, conferindo lhes a capacidade de direcionamento e reconhecimento celular e imunogenicidade (Weinacker, 2013).

Os sistemas de expressão das células dos mamíferos para além de serem sistemas mais lentos, requerem meios de cultura complexos e são suscetíveis à contaminação por vírus.

A utilização de leveduras permite ter por um lado um crescimento robusto em meios de cultura simples (em biorreatores de grande escala) com modificações genéticas facilmente possíveis de realizar e com a introdução de modificações pós-traducionais desejáveis (Vogl et al., 2013).

4. Sistema de expressão da levedura *P. pastoris*

4.1. Principais vantagens da utilização do sistema de expressão da *P. pastoris*

A levedura *P. pastoris*, tem sido utilizada com sucesso na produção de várias proteínas recombinantes heterólogas, tal como é possível ver na Tabela 1 (Weinacker et al., 2013).

Tabela 1 - Exemplos de proteínas heterólogas expressas pela *P. pastoris*. Adaptado de (Serrano-Rivero et al., 2015).

Proteínas heterólogas	g·L ⁻¹
Fragmento c da toxina tetânica	12,0
Factor de necrose tumoral	8,0
Interleucina humana 2	4,0
Albumina sérica humana	4,0
Invertase	2,5
Inibidor de proteases kunitz	1,0
Análogo da apoproteína	0,8
Lisozima humana	0,7
Factor de crescimento epidérmico murino	0,45
Antígeno de superfície do vírus de hepatite b	0,3

Este sucesso deve-se às diferentes vantagens da utilização desta levedura como sistema de expressão proteica, como a sua capacidade de secretar proteínas devidamente enroladas, processadas pós-traducionalmente, ou seja, proteínas recombinantes ativas, diretamente para o meio de cultura (Ahmad et al., 2014).

Em Ahmad et al. (2014), os autores sugerem que “Segundo a regra do polegar, as proteínas secretadas nos seus hospedeiros nativos serão também secretadas na *P. pastoris*” (p.5305).

Outra das grandes vantagens da utilização desta levedura é esta possuir um promotor muito bem regulado, o pAOX1, que facilita a manipulação genética e por outro lado, por apresentar um metabolismo preferencialmente respiratório, permitindo obter-se elevadas densidades celulares em biorreatores sem perda de crescimento devido a produtos metabólicos tóxicos, como por exemplo o etanol. Outra vantagem na utilização

desta levedura em comparação com outros sistemas de expressão, eucariota ou procariota, é esta apresentar uma rápida taxa de crescimento e elevados níveis de produtividade na maioria dos meios de cultura sem proteínas, compostos apenas por uma fonte de carbono (glucose, glicerol ou metanol), biotina, sais e água (Serrano-Rivero et al., 2015).

A *P. pastoris* tem também vantagem de ser capaz de eliminar de endotoxinas e de não ser suscetível de contaminação por bacteriófagos bem como ausência de patogenicidade humana no espectro de vírus com ciclo lítico que atuam nesta levedura (Weinacker et al., 2013).

Os péptidos sinal mais utilizados para a secreção de proteínas heterólogas a partir da *P. pastoris* para o meio de cultura, derivam do fator α -MF de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), sinal de secreção da fosfatase ácida (PHO1) da *P. pastoris* ou da sacarose invertase da *S. cerevisiae* (SUC2) (Ahmad et al., 2014).

A *P. pastoris* consegue secretar elevadas quantidades de proteínas heterógenas para o meio de cultura e visto secretar apenas pequenas quantidades de proteínas endógenas, ou seja, não recombinantes, a secreção torna-se um método eficaz de separação (purificação) de proteínas recombinantes bem como de outros materiais celulares (Fickers, 2014) (Serrano-Rivero et al., 2015).

O sinal de secreção α -MF de *S. cerevisiae* é responsável pelo direcionamento proteico na via secretória da *P. pastoris* e é composto por uma pré-região e uma pró-região, sendo a primeira região responsável pelo direcionamento de proteínas pós-traducionais para o RE e conseqüentemente pela clivagem da peptidase sinal. Por sua vez a pró-região promove a transferência da proteína do RE para o complexo de golgi e a posterior clivagem da sequência sinal pelo produto do gene KEX2. O último passo é a clivagem das repetições glutamato e alanina (EA) pelo produto do gene STE13. Contudo um dos maiores problemas associados à utilização do sinal de secreção α -MF de *S. cerevisiae* é a não homogeneidade dos N-terminais das proteínas recombinantes no processamento incompleto da STE13. Ao desenvolver construções sem as repetições EA é possível aumentar a homogeneidade nos N-terminais das proteínas recombinantes porém esta remoção pode afetar a produção proteica (Ahmad et al., 2014)

Com os novos desenvolvimentos em biologia sintética surgiram novas ferramentas disponíveis na engenharia genética clássica (Liang, Luo & Zhao, 2012) e de novos sistemas de expressão (Lynch & Gill, 2012), surgindo novas oportunidades na produção

de biofármacos pela levedura *P. pastoris*, tal como é possível ver na Figura 2 (Vogl et al., 2013).

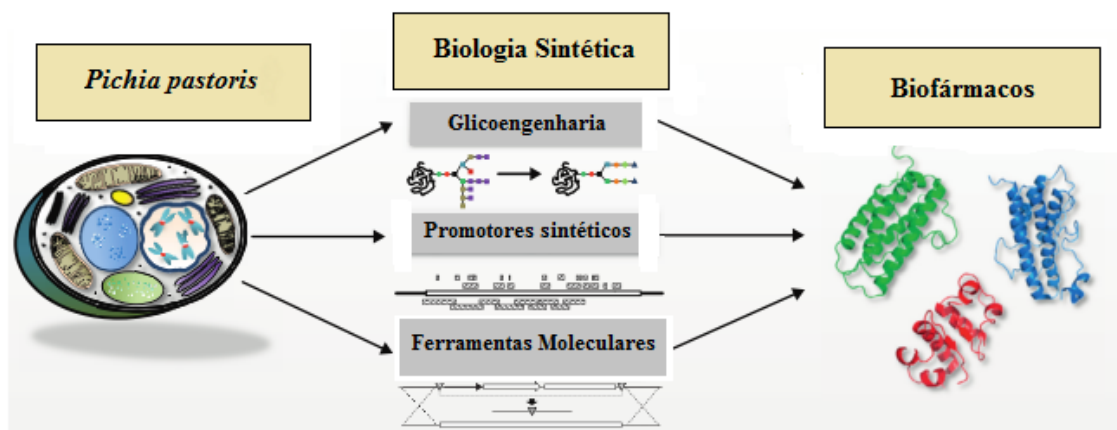


Figura 2. Desenvolvimentos recentes em biologia sintética que melhoraram a qualidade dos produtos biofarmacêuticos na *P. pastoris*. Adaptado de (Vogl et al., 2013).

4.2. Promotores de expressão da *P. pastoris*

Apesar de vantajosa, a expressão de proteínas heterólogas sob controle do promotor pAOX1 apresenta alguns inconvenientes tais como (Fickers, 2014):

- a) o metanol é um produto altamente inflamável e torna-se perigoso em grandes quantidades;
- b) não é possível obter, através destas proteínas, produtos alimentares ou suplementos alimentares visto o metanol ser um derivado do petróleo;
- c) a monitorização da concentração de metanol durante o processo é difícil e pouco viável;
- d) a acumulação de metanol no meio de cultura pode afetar a viabilidade celular e consequentemente a produção de proteínas heterólogas.

Por conseguinte, têm surgido novos promotores alternativos ao uso do pAOX1 (Tabela 2), nomeadamente o promotor da enzima formaldeído desidrogenase dependente de glutationa (pFDH) (Tabela 2), que pode ser induzido por metanol ou por metilamina. (Fickers, 2014) Para a expressão de níveis elevados de proteínas heterólogas, em presença de baixas concentrações de glucose ou de etanol, o promotor do gene ICL1 (pICL1) (Tabela 2) responsável pela codificação da enzima isocitrato liase 1 surge como uma boa alternativa (Prielhofer et al., 2013).

Outro exemplo de promotor alternativo ao uso de pAOX1 em presença de metanol é o promotor do gene da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (pGAP) (Tabela 2). Este promotor atua em presença de glucose e permite a obtenção de níveis de expressão semelhantes ao pAOX1 em presença de metanol (Ahmad et al., 2014) (Gmeiner et al., 2015) (Sears, O'Connor, Rossanese & Glick, 1998).

O promotor pGAP é um promotor constitutivo, que permite omitir a utilização de indutores no processo e garante a transcrição contínua da transcrição. Outro exemplo de um forte promotor constitutivo é o pGCW14, quando em presença de glicerol como fonte de carbono, descrito inclusive como um promotor superior ao pGAP e ao TEF1 (Tabela 2), aferido na expressão secretória de EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) (Ahmad et al., 2014).

No estudo de ADN *microarray* realizado por Prielhofer et al. (2013), foram identificados promotores cuja expressão é reprimida em presença de glicerol mas induzidos em meios de cultura limitados em glucose. Os promotores mais proeminentes descobertos neste estudo foi o promotor HGT1 controlador da expressão de um transportador de glucose de alta afinidade e um promotor aldeído desidrogenase

putativo. Relativamente à expressão de EGFP, o promotor aldeído desidrogenase putativo apresentou níveis superiores de expressão em cerca de 230% no rendimento em comparação com a expressão a partir de do pGAP (Ahmad et al., 2014).

Tabela 2 – Exemplos de promotores alternativos ao pAOX1 na *P. pastoris*. Adaptado de (Gonçalves et al., 2013) (Ahmad et al., 2014).

Promotor	Indutor/ Constitutivo	Regulação
pGAP	Constitutivo	Expressão na presença de glucose e em baixa extensão na presença de metanol e glicerol
pYPT1	Constitutivo	Expressão na presença carbono, glucose, metanol ou manitol
pTEF1	Constitutivo	Expressão na presença glicerol e glucose
pGCW14	Constitutivo	Expressão na presença de glucose, glicerol e metanol
pFDH	Indutivo	Expressão na presença de metanol ou de metilamina
pDAS	Indutivo	Expressão na presença de metanol
pICL1	Indutivo	Expressão na ausência de glucose e na adição de etanol
pPEX8	Indutor	Expressão do gene PER3 que participa na biogénese de peroxissomas; é expresso na presença de glucose em níveis significativamente baixos
pADH1	Indutivo	Expressão reprimida na presença de glucose e metanol e induzida na presença de glicerol e etanol
ENO1	Indutivo	Expressão reprimida na presença de glucose, metanol e etanol e induzida na presença de glicerol
GUT1	Indutivo	Expressão reprimida em presença metanol e induzida na presença de glucose, glicerol e etanol

4.3. Modificações pós-traducionais

Se compararmos as leveduras *P. pastoris* e *S. cerevisiae*, a primeira consegue obter níveis de produção de proteínas heterólogas, 10 a 100 vezes superiores à segunda. A manipulação genética da *P. pastoris* é muito parecida com a da *S. cerevisiae*, e a sua via de síntese proteica apresenta modificações pós-traducionais semelhantes às células de organismos superiores, constituindo mais uma vantagem para a sua utilização (Serrano-Rivero et al., 2015).

Na Tabela 3 faz se uma comparação entre cinco sistemas diferentes de expressão proteica:

Tabela 3 – Análise comparativa de características de cinco sistemas diferentes de expressão proteica. Adaptado de (Gonçalves et al., 2013).

Caraterísticas	<i>P. pastoris</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. bacillus</i>
Produtividade proteica	++	+	+	+
Secreção	++	+	-	++
Glicosilação	+	++	--	

As modificações pós-traducionais na *P. pastoris* são diversificadas, e podem ser desde (Weinacker et al., 2013):

- a) Ligações polipeptídicas;
- b) Glicosilação;
- c) Metilação;
- d) Acilação;
- e) Ajustamento proteolítico;
- f) Direcionamento subcelular.

A glicosilação proteica é uma modificação pós-traducional típica das células eucariotas necessária para a produção de proteínas heterólogas (Gonçalves et al., 2013). Estima-se que cerca de 50% a 70% das proteínas humanas sofrem glicosilação.

Existem dois tipos de glicosilação que podem ocorrer, a N-glicosilação e a O-glicosilação. O primeiro tipo de glicosilação referido ocorre quando à uma ligação covalente entre o grupo NH₂ do oligossacárido, N-acetilglicosamina, a um resíduo de asparagina. Os resíduos de asparagina contêm uma sequência específica de 3 resíduos aminoácidos, Asn-X-Thr/Ser, em que X não pode ser a prolina nem o ácido aspártico,

visto serem os únicos que conseguem interagir com a enzima oligossacaril-transferase. Quando se trata da O-glicosilação, esta ocorre quando o grupo OH do oligossacárido, N-acetilgalactosamina se liga a resíduos de serina ou de treonina.

No caso das leveduras, estas conseguem realizar tanto a N-glicosilação como a O-glicosilação, tal como as células eucariotas, contudo os padrões finais da glicosilação são diferentes (Dai et al., 2015).

Relativamente à O-glicosilação na *P. pastoris*, este processo resulta em cadeias de oligossacáridos longas que se ligam às proteínas secretadas contrariamente ao que acontece nas células eucariotas, em que as proteínas são compostas principalmente por ácido siálico, galactose e N-acetilglucosamina (Romanos, 1995).

Em relação à N-glicosilação, esta ocorre no retículo endoplasmático (RE) tal como nas células eucariotas, terminando de forma diferente, no complexo de golgi no caso das leveduras. Os produtos finais obtidos da glicosilação proteica, nas leveduras é uma forma altamente imunogénica de um resíduo de manose, hipermanosilado, que pode desencadear nos seres humanos, reações alérgicas se permanecer no sangue humano, ou conduzir à perda de atividade biológica ou de funções efectoras (Gonçalves et al., 2013).

A *P. pastoris* consegue realizar N-glicosilação e O-glicosilação, contudo esta última é praticamente inexistente nesta levedura (Dai et al., 2015).

A grande vantagem da *P. pastoris* é que no processo de N-glicosilação consegue-se obter glicoproteínas mais semelhantes com as produzidas pelas células humanas, ao apresentarem cadeias mais curtas de oligossacáridos e menos imunogénicas, ligados às proteínas (Gonçalves et al., 2013). As cadeias de oligossacáridos sintetizadas são cadeias de baixo grau de polimerização e sem ligações glicosídicas terminais α -1,3 manose (Serrano-Rivero et al., 2015).

4.4. Estudos de aperfeiçoamento das características de expressão proteica na *P. pastoris*




Com o objetivo de diminuir o risco de reações imunológicas contra as glicoproteínas produzidas por leveduras nativas, foram realizados estudos com o objetivo de desenvolver linhagens que apresentassem padrões de glicosilação semelhantes às produzidas pelas células eucariotas (Gonçalves et al., 2013).


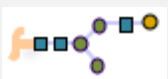
Os sistemas de vetores padrão utilizados para a expressão intracelular e secretória, fornecidos por exemplo, pela *Life Technologies* (Carlsbad, CA, EUA), recorrem a promotores como o pGAP e a promotores indutíveis como pAOX1 e pFDH (Ahmad et al., 2014).

No caso do kit de expressão *PichiaPink*™, este é considerado uma alternativa para a expressão intracelular ou para a expressão secretória que permite selecionar de forma fácil a integração de multiclonos por diferença de coloração com base nas linhagens obtidas (Ahmad et al., 2014).

Os estudos recorreram à modificação genética da via enzimática da N-glicosilação da *P. pastoris*, por exemplo, através dos sistemas *GlicoSwitch* (Tabela 4) e *GlicoFi*, que permitiram a inativação da expressão de genes associados à hipermanosilação das cadeias de oligossacáridos das leveduras, nomeadamente ao nível do gene OCH1, que codifica para enzima específica de inicialização da elongação, a alpha-1,6-manosiltransferase (Gonçalves et al., 2013).

Tabela 4 – Composição e aplicações de glicofomas major expressas por linhagens recombinadas de *P. pastoris* através de sistema *GlicoSwitch*. Adaptado de (<http://www.pichia.com/glycoswitch/>).

Linhagem	Composição	Aplicações
M5	Man5GLcNAc2 	Possivelmente útil para antígenos de vacinas
M5GN	GLcNAcMan5GLcNAc2 (ou M5 + IGN) 	Possivelmente útil para antígenos de vacinas, citocinas e anticorpos
M5NGal	GalGLcNAcMan5GLcNAc2 (ou M5GN + galactose) 	Possivelmente útil para antígenos de vacinas, citocinas e anticorpos

M3GN	Resíduos 2 GN, resíduos 3 manose + 1GN 	Possivelmente útil para citoquinas, fatores de crescimento e anticorpos
M3GNGal	M3GN + galactose 	Possivelmente útil para citoquinas, fatores de crescimento e anticorpos

No estudo desenvolvido por Hamilton et al. (2013), foi possível obter uma proteína corretamente O-glicosilada pela *P. pastoris*. Os autores utilizaram a coexpressão das enzimas α -1,2 manosidase e β -1,2-N-acetilglucosamiltransferase numa linhagem da *P. pastoris* com a via enzimática da N-glicosilação recombinada (Hamilton et al., 2013). Os autores obtiveram uma proteína cujos resíduos α -1,2 manose foram substituídos por um resíduo de N-acetilglucosamina, e posteriormente por resíduos de ácido siálico, tal como ocorre nas células eucariotas (Gonçalves et al., 2013).

A modificação das linhagens da *P. pastoris*, fez porém, com que estas linhagens recombinadas apresentassem defeitos que condicionavam fortemente a produção de proteínas heterólogas, sendo um deles a incapacidade de crescimento a temperaturas elevadas (37°C) e o outro a sua propensão celular à lise durante o crescimento das cadeias em biorreatores durante longos períodos de tempo. Conforme o processo usado, a lise celular podia afetar significativamente a fermentação, reduzindo o tempo de vida, das linhagens da *P. pastoris* recombinadas e potencialmente restringir a sua utilidade na expressão de hospedeiros na produção comercial de biofármacos (Vogl et al., 2013).

No sentido de resolver este problema, procurar maximizar a produção e minimizar os custos, tornou-se necessário estudar eventuais soluções no sentido de melhorar os níveis de produção celular das linhagens de *P. pastoris*.

O estudo desenvolvido por Jiang et al. (2014), permitiu mostrar que mutações no gene homólogo do gene ativador transcricional GAL4 da levedura *S. cerevisiae* (PpATT1), aumentaram drasticamente os níveis de produção celular das linhagens da *P. pastoris* recombinadas. Este gene é na *P. Pastoris*, o gene homólogo ScGAL4, gene ativador transcricional envolvido na regulação das enzimas metabólicas da galatose na *S. cerevisiae* (Traven, Jelacic & Sopta, 2006).

O estudo de Jiang et al. (2014) demonstrou que a eliminação do gene PpATT1 permitiu às linhagens da *P. pastoris* recombinadas melhorar os níveis de tolerância térmica,

reduzir os seus defeitos ao nível da lise celular e aumentar a robustez da fermentação. A extensão do tempo da fermentação em simultâneo com a redução geral da lise celular permitiu às linhagens da *P. pastoris* recombinadas sem o gene PpATT1, aumentar significativamente o rendimento dos produtos sem sacrificar a qualidade do produto.

Como o gene PpATT1 pode ser eliminado de qualquer linhagem de *P. pastoris* estudada, o estudo de Jiang et al. (2014) sugere que as suas descobertas podem ser aplicadas a qualquer linhagem recombinadas de *P. pastoris* para a produção de proteínas terapêuticas, incluindo anticorpos monoclonais, péptidos, hormonas e fatores de crescimento.

Ainda no estudo anterior, os autores sugeriram inicialmente a hipótese de os fenótipos, estarem relacionados com a diminuição da robustez fermentativa e com a sensibilidade ao aumento da temperatura, e foram tentar identificar mutações que apresentassem melhoramento no defeito da sensibilidade à temperatura. Foram utilizar três linhagens geneticamente recombinadas independentes (yGLY17108, yGLY22812, e yGLY22835). A linhagem yGLY17108 demonstrou conseguir modificar proteínas com perfil ligação N-glicosídica, com resíduos com ligações terminais N-galactose.

As três linhagens foram submetidas a mutagénese aleatória por irradiação ultra violeta e posteriormente selecionadas as linhagens mutantes com resistência à temperatura capazes de crescer a temperaturas elevadas. A partir de uma população inicial de aproximadamente 2×10^8 células mutantes, os autores isolaram oito clones mutantes que adquiriram a capacidade de crescer a 35°C. Estes oito clones mutantes resistentes à temperatura derivaram independentemente a partir de três linhagens hospedeiras diferentes. Destes oito, quatro mutantes (yGLY17172, yGLY17173, yGLY17177, e yGLY17178) foram isolados a partir da linhagem hospedeira yGLY17108; um dos mutantes (yGLY17180) foi isolado a partir da linhagem yGLY22812 e os restantes três mutantes (yGLY17158, yGLY17159, e yGLY17160) foram isolados a partir da linhagem yGLY22835.

Os autores optaram por focar o seu estudo nos seis mutantes que apresentavam resistência à temperatura. Destes, quatro mutantes resistentes à temperatura, demonstraram também um aumento na sua robustez fermentativa.

Para avaliar se a seleção da resistência à temperatura levou consequentemente ao aumento da robustez fermentativa, os autores sujeitaram os restantes seis mutantes a um ensaio de fermentação e de acordo com os resultados obtidos, os autores concluíram que as mutações U.V. induzidas tanto nas linhagens yGLY17160 e yGLY17180 falharam

significativamente no aumento dos níveis de robustez em fermentação, ficando assim demonstrado que os fenótipos de tolerância térmica e robustez fermentativa nem sempre estão diretamente relacionados.

Os restantes quatro mutantes demonstraram um comportamento muito diferente dos anteriores durante o processo de cultura a elevadas temperaturas. As quatro linhagens mutantes (yGLY17172, yGLY17177, yGLY17178, e yGLY17159) mantiveram maior viabilidade e robustez por mais tempo por indução do metanol. O resultado mais importante obtido foi que as quatro mutações apresentaram baixos níveis de lise celular, mesmo por períodos longos de indução. Os autores concluíram que as mutações induzidas por U.V. adquiridas pelas quatro linhagens mutantes (yGLY17172, yGLY17177, yGLY17178, e yGLY17159), melhoram dramaticamente os níveis de robustez celular durante a fermentação.

Ainda no estudo de Jiang et al. (2014), os autores, foram investigar a base genética para os melhoramentos na robustez fermentativa, através da sequenciação dos genomas das linhagens mutantes yGLY17172, yGLY17177, yGLY17178, e yGLY17159 assim como dos respectivos parentes não modificados yGLY17108 e yGLY22835. A linhagem mutante yGLY17178 continha uma única mutação num gene não caracterizado, que chamaram de PpATT1 (tolerância térmica adquirida) (Jiang et al., 2014). O papel fisiológico deste gene na *P. pastoris* está associado a outros processos que não no metabolismo da galactose, uma vez que esta levedura é incapaz de metabolizar a galactose (Kurtzman, 2005).

Na investigação de Jiang et al. (2014), os autores decidiram posteriormente confirmar se ATT1 era a mutação responsável pelo melhoramento da tolerância térmica e da robustez fermentativa. Nos resultados obtidos, os autores conseguiram observar que existiam constantes mutações no gene ATT1 associadas a melhoramentos na robustez fermentativa nas linhagens mutantes que apontavam diretamente para uma relação entre o gene ATT1 e o fenótipo da robustez fermentativa.

Na produção de anticorpos monoclonais (MAb), os resultados obtidos também demonstraram que a deleção do gene ATTP1 não teve impacto negativo na produtividade durante a fermentação do anticorpo monoclonal específico, HER2. A deleção do ATTP1 aumentou a produção do produto anti-HER2 mantendo na mesma a qualidade da proteína.

Este estudo representa um avanço significativo para a aplicação desta levedura na produção comercial de proteínas terapêuticas, uma vez que a inativação genética do

gene PpATT1 permite aplicação efetiva e alargada das linhagens de *P. pastoris* recombinadas. O gene PpATT1 pode ser facilmente deletado de qualquer proteína heteróloga expressa por um hospedeiro *P. pastoris* quando o objetivo de produção incluir o aumento da robustez das linhagens e a viabilidade durante a fermentação, bem como o aumento do rendimento na produção, ou baixa degradação proteolítica do produto recombinante. A inativação do gene PpATT1 permitirá aos hospedeiros *P. pastoris* tornarem-se ainda mais compatíveis com condições rigorosas de crescimento em processos de fermentação em alta escala industrial, podendo ser significativamente ampliada a sua utilização na produção comercial de proteínas terapêuticas (Jiang et al., 2014).

5. *P. pastoris* como sistema de expressão de biofármacos utilizados na indústria farmacêutica

A produção de proteínas recombinantes tornou-se um negócio multimilionário, sendo que 25% dos produtos farmacêuticos comercializados são biofármacos. O objetivo da indústria farmacêutica é atingir processos de produção competitivos, ou seja, processos altamente produtivos, eficientes e económicos. A levedura *P. pastoris* com um processo de glicosilação totalmente modificado, passou a ser utilizada frequentemente, na produção não só de várias enzimas e proteínas humanas como também de biofármacos, em várias áreas da indústria farmacêutica (Vogl et al., 2013).

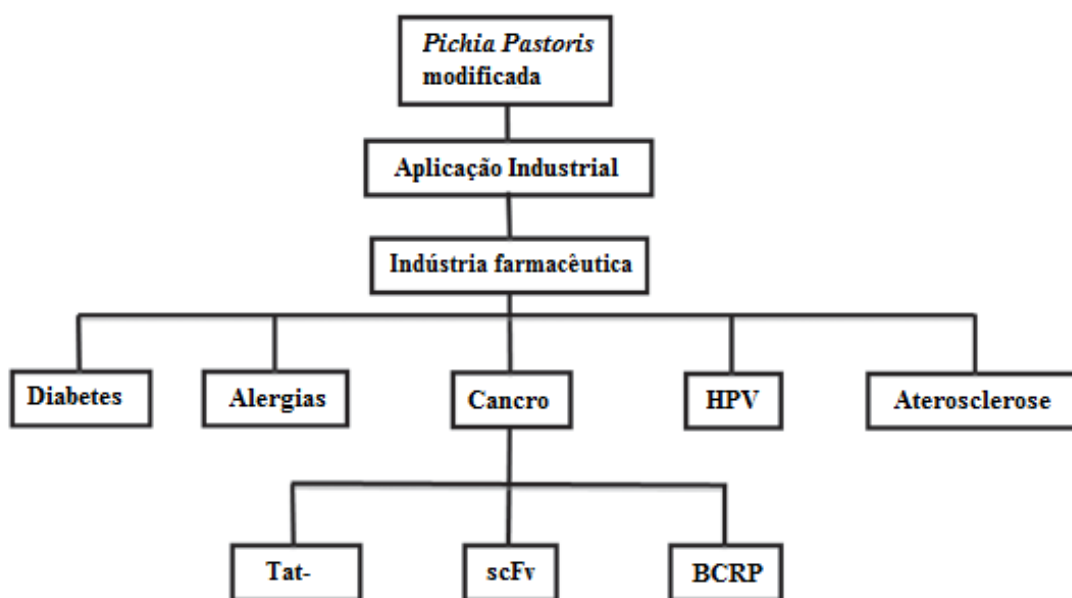


Figura 3 - Linhas de investigação dos sistemas de expressão da levedura recombinante, *P. pastoris*. Adaptado de (Weinacker et al. 2013).

Algumas das principais áreas de investigação e aplicação da levedura *P. pastoris*, são, diabetes, alergias, cancro, papiloma vírus humano e a aterosclerose, como esquematizado na Figura 3.

5.1. Diabetes

A Diabetes mellitus é atualmente uma das maiores causas de morte a nível mundial (Baeshen et al., 2016).

Segundo a World Health Organization (2016) o número de diabéticos quadruplicou desde 1980, e os níveis de glucose começam a ter um forte impacto na morbidade e mortalidade, mesmo com um diagnóstico precoce da diabetes. A associação de diabetes com elevados níveis de glucose no sangue, é responsável por mais de 3,7 milhões de mortes, sendo que a maioria destas podiam ter sido prevenidas. A tendência a nível mundial bem como em todas as regiões definidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é de um aumento da prevalência da diabetes nas últimas três décadas, tal como é possível visualizar na Figura 4 (World Health Organization, 2016).

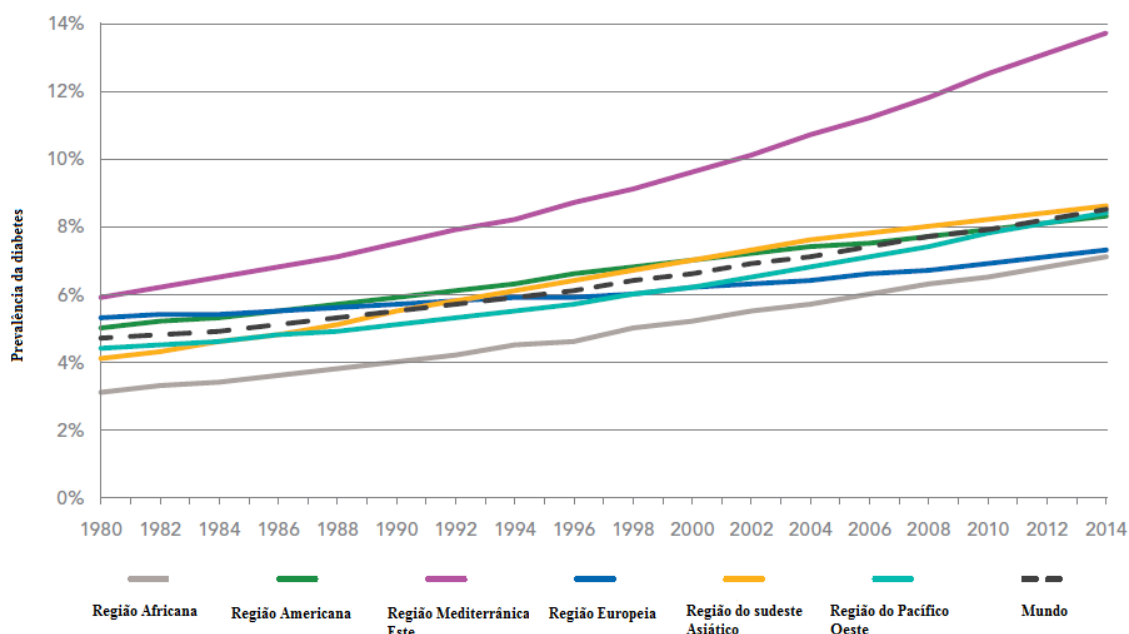


Figura 4 - Tendências da prevalência da diabetes nas regiões da OMS, entre 1980 e 2014. Adaptado de (World Health Organization, 2016).

No estudo desenvolvido por Wild, Roglic, Green, Sicree & King (2004), baseado nas alterações demográficas, os autores concluíram que o número de mortes causadas por esta doença no mundo inteiro foi de 171 milhões na passagem deste século e será mais do dobro em 2030.

A diabetes é uma desordem metabólica na qual está envolvida uma elevação dos níveis de glucose no sangue (hiperglicemia) devido a baixo nível ou a uma deficiência completa da hormona, insulina. No caso da Diabetes tipo 1 existe défice de insulina,

enquanto no caso da diabetes tipo 2, esta patologia é causada pela resistência da insulina associada à insuficiência de secreção de insulina (Baeshen et al., 2016).

A persistência de valores elevados de glucose no sangue está associada a complicações vasculares, nomeadamente em casos envolvendo órgãos como os olhos, rins, coração, vasos sanguíneos e nervos (Baeshen et al., 2016).

A insulina é uma hormona sintetizada no pâncreas mais especificamente nos ilhéus de Langerhans, pelas células β . Esta hormona representa um importante papel na modelação dos níveis sanguíneos da glucose (Baeshen et al., 2016).

A produção de insulina é realizada através de uma proteína recombinante, usando para tal duas vias diferentes. Uma das vias utilizadas, envolve um precursor da insulina na forma de corpúsculo de inclusão, usando como hospedeiro a bactéria *E. coli*. Esta via torna-se desvantajosa, pois exige processos subsequentes para formação da estrutura tridimensional da proteína produzida. A outra via envolve a utilização de sistemas de expressão de leveduras, que produzem um precursor solúvel de insulina para o sobrenadante da cultura. Estas duas vias são economicamente viáveis mas a levedura metilotrófica *P. pastoris* emergiu como um hospedeiro mais vantajoso.

Através da integração no genoma da *P. pastoris* da linhagem clonada X-33, obtida a partir de um sinal secretório fator α da levedura *S. cerevisiae*, obteve-se um codão otimizado FD (Ferridoxinas - proteínas ferro-enxofre). A nova linhagem cresceu segundo vários lotes, cada um deles, com elevada densidade celular, usando meios de cultura definidos com baixos níveis de sal e elevadas concentrações de glicerol.

Em Gurramkonda et al. 2010 foi utilizada uma estratégia de alimentação da cultura, que permitiu obter secreções de aproximadamente 3 gL^{-1} do codão FD no caldo da cultura, que corresponde a 4 gL^{-1} de codão FD de células livres no sobrenadante. Na fase de purificação os autores recorreram a uma técnica inovadora de cromatografia de imobilização por afinidade metal-iões (IMAC) e obtiveram 95% do produto secretado com uma pureza de 96% a partir do sobrenadante. O codão FD purificado obtido foi uma tripsina digestiva, transpeptidada, desprotegida e posteriormente purificada de onde se obteve cerca de $1,5 \text{ gL}^{-1}$ de 99% de insulina humana pura recombinada.

Os autores com esta abordagem conseguiram aumentar a eficiência da produção de insulina humana usada para o tratamento da diabetes (Gurramkonda et al., 2010).

Recentemente, num estudo desenvolvido por Baeshen et al. (2016), foi verificada a eficácia da insulina recombinante a baixar os níveis séricos de glucose nos ratos diabéticos. Os autores, baseados em estudos que foram desenvolvidos na última década

sobre a importância do péptido C no tratamento de complicações na diabetes como a debilitação nervosa e das funções renais, utilizaram uma insulina humana recombinante com um péptido C intacto, ao contrário das insulinas disponíveis no mercado, que não o possuem.

Estudos recentes sugerem que da incorporação de péptido C na insulina advêm melhorias nas complicações do tratamento de diabéticos a longo prazo.

O péptido C é obtido após clivagem da pró-insulina em insulina e péptido C, e ao contrário do que se pensava inicialmente, este atua independentemente da insulina por ativação da proteína G, que ativa o influxo de Ca^{2+} intracelular abrindo os canais de Ca^{2+} , ativando assim a enzima óxido nítrico sintetase (NOS), Na^+,K^+ -ATPase e a cascata de Proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAP quinase) (Baeshen et al., 2016). A ativação da adenosina trifosfatase sódio-potássio (Na^+,K^+ -ATPase) é importante para a restauração da função renal nos doentes diabéticos (Rebsomen, Khammar, Raccah & Tsimaratos, 2008) e a atividade desta com a NOS é essencial para a função nervosa (Wahren et al., 2007).

Baeshen e seus colaboradores (2016) utilizaram um clone de ADN complementar (ADNc) de insulina a partir do vetor pPICZ- α da levedura *P. pastoris*. Este clone foi posteriormente transformado na linhagem *P. pastoris SuperMan5*. Os resultados obtidos neste estudo revelaram eficácia da atividade da insulina recombinante em ratinhos diabéticos induzidos por estreptozotocina (indutor da diabetes). Os autores deste estudo afirmaram estar em processo de encapsular a insulina recombinante em nanopartículas para desenvolver a insulina oral Baeshen et al. (2016).

5.2. Alergias

As plantas polinizadas através do vento desenvolveram a sua capacidade de polinização através da evolução dos seus grãos de pólen. Alguns destes grãos pequenos e desidratados com características aerodinâmicas que conseguem disseminar-se por centenas de quilómetros, contêm no seu interior proteínas alergénicas, que durante o seu processo de reidratação são libertadas para a superfície dos grãos de pólen (Asam, Hofer, Wolf, Aglas & Wallner, 2015).

A sensibilização através do pólen está normalmente restrita a plantas anemófilas, plantas estas que correspondem a cerca de 10 a 18% da totalidade de plantas com flor.

Em relação às árvores associadas a alergénios, as que possuem os mais potentes alergénios pertencem às ordens Lamiales, Proteales e Pinales (Figura 5).

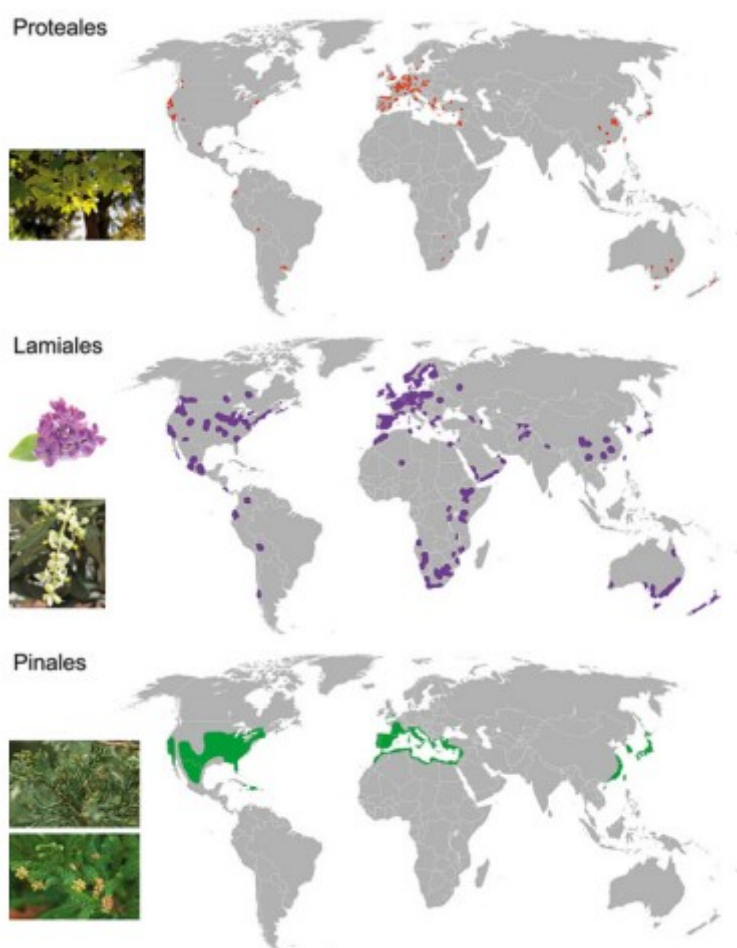


Figura 5 - Distribuição geográfica mundial dos alergénios das ordens Proteales, Lamiales e Pinales. Adaptado de (Asam et al., 2015).

Na ordem das Proteales, segundo um estudo de revisão redigido por Asam et al, (2015), as únicas espécies reconhecidas pela OMS e pela União Internacional de Sociedades de

Imunologia (IUIS), classificadas como árvores alergénicas são as das espécies *Platanus acerifolia* e as *Platanus orientalis*. As *Platanus acerifolia* são uma espécie híbrida com origem na espécie *Platanus occidentalis* que pode ser encontrada na América do Norte, Austrália, Nova Zelândia, África do Sul e Europa. No período de florescimento esta espécie liberta o seu pólen em elevadas quantidades, correspondendo a cerca de 14% do pólen total em algumas áreas da Espanha, e cujos principais alergénios desta espécie são o Pla a1, Pla a2 e Pla a3.

As *Platanus orientalis* estão presentes no sudoeste da Ásia, sudeste da Europa e em países árabes como o Irão. Durante o seu período de florescimento as concentrações de pólen atingem valores na ordem dos 15% do total de pólen presentes. Num estudo realizado com 19 indivíduos Iranianos com sensibilização aos alergénios desta espécie, revelou que existem grandes semelhanças dos seus três principais alergénios com os três principais alergénios da *Platanus acerifolia*.

Em relação à ordem das Lamiales apenas a família das Oleaceae apresenta espécies alergénicas. Esta espécie é endémica da Europa mas também existe por toda a América do Norte, África, Ásia e Austrália. Apenas quatro espécies desta família são reconhecidas pela OMS/IUIS como sendo árvores alergénicas, sendo elas a *Fraxinus excelsior*, *Ligustrum vulgare*, *Olea europea* e *Syringa vulgaris*.

Destas espécies, a que apresenta o alergénio mais prevalente por toda a região mediterrânica é a *Olea europea*, com o antigénio do pólen Ole e1. Este antigénio representa o maior componente de ligação antigénio-imunoglobulina E (IgE) do pólen de oliveira, com uma prevalência de sensibilização de mais de 80% em doentes com alergia ao pólen de oliveira, o qual se deve provavelmente ao fato de este antigénio representar aproximadamente cerca de 20% do total de proteína no extrato de pólen.

O antigénio Ole e1 apresenta reatividade cruzada não só com proteínas Ole e1 semelhantes de alergénios da espécie Oleaceae, como também, em percentagem menor, com outros membros da ordem Lamiales (por exemplo, *Plantago lanceolata*, *Caryophyllales*, *Chenopodium Album* e *Lolium perenne*). Esta reatividade cruzada do Ole e1 pode ser explicada pelas semelhanças que existem nos padrões de dobramento e de glicosilação proteica.

As doenças alérgicas passaram, ao longo o século passado, de condição rara a uma pandemia, que, a nível mundial, provoca em cerca de 500 milhões de indivíduos situações de rinite alérgica. Os alergénios do pólen são considerados um fator de risco maior para rinite alérgica sazonal e asma (Asam et al., 2015).

Recentemente foi desenvolvido um estudo por Scala et al. (2016), onde os autores procuraram relacionar os alergénios do pólen da Oliveira (Ole e1, Ole e7 e Ole e9) com diferentes grupos de indivíduos com diferentes patologias alérgicas. Os autores conseguiram correlacionar o alergénio Ole e1, com a população em estudo que tinha sintomas respiratórios, grupo este com possível necessidade de imunoterapia específica. Os outros dois alergénios em estudo, Ole e7 e Ole e9, demonstraram estar correlacionados com a ocorrência de sintomas locais e reações sistémicas com a comida (Scala et al., 2016).

Um estudo realizado em Espanha por Marazuela et al. (2012), os autores foram investigar a possível existência de derivados hipoalergénicos do Ole e1, utilizando o sistema de expressão proteico da levedura *P. pastoris*. Os autores do estudo identificaram o alergénio do pólen de bétula, BB18 como o homólogo do Ole e1. O clone de BB18 tem propriedades não alérgicas e foi utilizado para gerar uma variante genética do Ole e1, o OB₅₅₋₅₈, obtido por mutagénese sítio-específica a partir de quatro resíduos (E55V56G57Y58) de um epítipo IgE/IgG correspondente ao do BB18 (Marazuela et al., 2012).

Os resultados obtidos por estes autores, apoiam a utilidade do clone BB18 para o epítipo mapeado do Ole e1 e para os derivados hipoalergénicos alterados por engenharia genética deste alergénio, como por exemplo o mutante OB₅₅₋₅₈, que apresenta todos os requisitos de uma molécula hipoalergénica adequada (Weinacker et al., 2013).

Foram também estudados alergénios modificados e as suas capacidades em imunoterapia utilizando a levedura *P. pastoris* como organismo de expressão proteica (Pomés et al. 2015). Pomés e colaboradores (2015) relacionaram mutações simples e múltiplas nos resíduos implicados na ligação monoclonal de anticorpos com a redução de reatividade IgE porém não conseguiram provar que houvesse relação entre estas mutações e as ligações moleculares nativas.

Pomés e colaboradores (2016), recorreram novamente à levedura *P. pastoris* com o intuito de expressar um fragmento variável de cadeia única (scFv) em quantidade para análise por cristalografia. O objetivo deste estudo foi analisar os determinantes antigénicos IgE do grupo 1 de alergénios dos ácaros do pó, de modo a desenvolver alergénios modificados com baixa reatividade IgE mas com imunogenicidade, para possível uso em imunoterapia, visto possuírem potencial para diminuir os efeitos colaterais da ligação cruzada ao IgE. Os autores consideraram com base nos resultados

obtidos que os IgE recombinantes são ferramentas úteis de análise de determinantes antigénicos no desenvolvimento de um repertório de IgE para desenvolvimento em imunoterapia (Pomés et al., 2016).

A levedura *P. pastoris*, foi também utilizada em Kan et al. (2015), para expressão de uma proteína recombinante MGL_1304 (P-rMGL_1304) para o estudo das suas capacidades para aplicação em indivíduos com dermatite atópica que desenvolvem alergia ao suor. A antigenicidade da P-rMGL_1304 foi comparada com a proteína recombinante MGL_1304 (TFrMGL_1304) produzida pela *E. coli* e com a proteína MGL_1304 nativa. Os autores deste estudo consideraram com base nos seus resultados que a estrutura conformacional e antigenicidade da P-rMGL_1304 era bastante similar à MGL_1304 nativa e afirmaram que esta proteína recombinante não só melhora o diagnóstico da alergia ao suor, como também facilita o desenvolvimento de novas terapias de dessensibilização contra a MGL_1304 no futuro (Kan et al., 2015, p. 270).

5.3. Tratamentos anticancerígenos e o sistema de expressão proteico da *P. pastoris*

Existem anualmente cerca de 8 milhões de casos mortais relacionados com tumores e mais de 14 milhões de novos casos de cancro todos os anos. Os médicos recorrem a métodos cirúrgicos, radio ou quimioterapêuticos, disponíveis para combater esta doença. Porém ainda não é possível diminuir os efeitos adversos associados a estas terapêuticas. Para tal, o alvo dos estudos atualmente centra-se nos agentes antitumorais de modo a evitar que estes atinjam os tecidos saudáveis diminuindo por sua vez a dor e os efeitos adversos indesejáveis.

As terapias ADEPT (Antibody-Directed Enzyme-Prodrug Therapy) e GDEPT (Gene-Directed Enzyme-Prodrug Therapy) vieram permitir a libertação seletiva dos agentes citotóxicos dos pró-fármacos não tóxicos, diretamente no local do tumor.

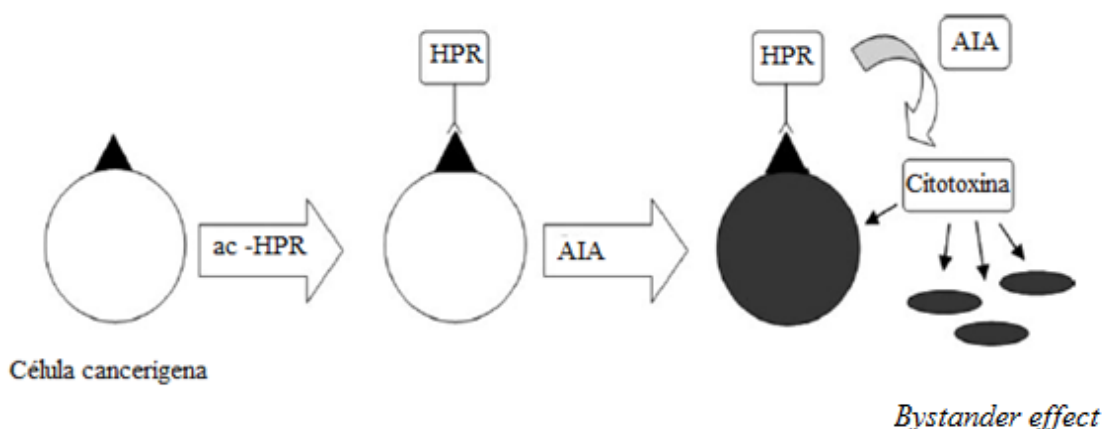


Figura 6 – Terapia ADEPT com recurso a anticorpos humanizados monoclonais para direcionamento celular. Adaptado de (Bonifer et al. 2015).

Na Figura 6, a peroxidase de rábano ou peróxido de hidrogénio óxido-redutase (*Horseradish peroxidase* - HRP) é conjugada a um anticorpo específico, que promove o direcionamento da enzima às células tumorais. O ácido indolacético (AIA) é injetado posteriormente oxidado pela HRP originando uma citotoxina. As células tumorais são mortas não só por esta via como também pela difusão dos componentes tóxicos – *Bystander effect* (Bonifer, Folkes, Gmeiner, Dachs & Spadiut, 2015).

Um pró-fármaco não deve ter atividade farmacológica, contudo os seus metabolitos devem apresentar atividade farmacológica desejada contra um alvo fisiológico definido. Na realidade, o que acontece é que os principais metabolitos do pró fármaco têm atividade farmacológica superior aos pró-fármacos e a sua utilização serve para aumentar a biodisponibilidade, a farmacocinética do fármaco, diminuir a toxicidade,

facilitar a administração ou a distribuição do fármaco a células ou tecidos específicos (Ortiz de Montellano, 2013).

O pró-fármaco AIA, mais conhecido por auxina, hormona de crescimento vegetal, é também funcional em células eucariotas e de leveduras. O AIA em combinação com a HRP, apresentam efeito citotóxico nas células humanas cancerígenas. Um estudo realizado por Folkes et al. (1998) confirmou que a utilização de AIA e HRP em separado não causa toxicidade celular e que apenas a sua combinação, AIA/HRP, produz toxicidade celular. O AIA toma a sua forma ativa após descarboxilação oxidativa pela HPR. Por outro lado, no mesmo estudo, os autores verificaram que para ocorrer oxidação de AIA não é necessário H_2O_2 e que este não sofre oxidação pelas peroxidases das células eucariotas, podendo assim, serem utilizados juntos nas terapias direcionadas anticancerígenas (Bonifer et al., 2015). Bonifer e colaboradores (2015) descrevem também resultados de um estudo em que a combinação AIA/HRP consegue induzir a apoptose celular de células de melanoma humano G361.

No estudo realizado por Bonifer et al. (2015) os autores utilizaram o sistema de expressão proteico da levedura *P. pastoris* para produzir duas isoenzimas simples HPR, a C1A e a A2C. Para evitarem a hiperglicosilação proteica recombinante que normalmente ocorre nas leveduras foi utilizada uma linhagem onde a ação da enzima OCH1 estava bloqueada, a linhagem $\Delta och1$. Os autores do estudo referido conseguiram produzir e caracterizar quatro enzimas diferentes. Destas quatro, selecionaram três enzimas para analisar não só a sua eficácia na oxidação de AIA como também a combinação destas com AIA em células T24 do carcinoma da bexiga e nas células *in vitro*, MDA-MB-231 do carcinoma da mama (Bonifer et al., 2015).

Os resultados obtidos por Bonifer e colaboradores (2015) demonstraram a utilidade da isoenzima HPR recombinada, C1A em combinação com a AIA, no tratamento anticancerígeno direcionado.

As proteínas REG (regenerating islet-derived protein), pertencem à família das lectinas tipo C e subdividem-se em quatro subgrupos, sendo uma delas a proteína REG3 que apresenta atividade anti-apoptose, anti-inflamatória e regenerativa. A sua atividade regenerativa é significativa em lesões teciduais contínuas, nomeadamente na mucosa, em casos de falha hepática, insuficiência das células epiteliais e de células de Paneth e em danos ocorridos nas células β pancreáticas (Fan et al., 2015).

Tanto as células REG3 α humanas como as REG3g mostram atividade antibacteriana por destruição da parede celular bacteriana. A primeira apresenta evidências na participação

em câncros gástricos primários em humanos e em câncros hepatocelulares primários (Fan et al., 2015).

O estudo de Fan et al. (2015), recorreu ao sistema de expressão da *P. pastoris* para desenvolver técnicas mais eficientes na expressão das proteínas REG3 α , mais especificamente, REG3 α de murino, através do vetor de expressão pwPICZalpha. Os autores conseguiram expressar e purificar as REG3 α , com atividade antibacteriana contra bactérias *in vitro*, gram positivas e gram negativas (Fan et al., 2015).

Fan e colaboradores (2015) conseguiram mostrar nos seus resultados a forte atividade da proteína REG3 α contra as células do carcinoma hepatocelular (linhagens SMMC-7721).

Na terapêutica do cancro, o gene supressor tumoral P53 é alvo de estudo de muitas terapêuticas anticancerígenas devido ao seu importante papel na regulação do ciclo celular e apoptose. O P53 é responsável pelo reconhecimento e reparação do ADN danificado, pela inibição da proliferação das células malignas e pela transformação das células durante o crescimento celular.

Na terapia anticancerígena o P53 sofre transdução para as células cancerígenas porém a sua transmissão para a membrana celular está limitada à quantidade disponível de ligando P53 nas membranas e à sua curta semivida (Weinacker et al., 2013).

Para ultrapassar estas desvantagens uma das abordagens de alguns estudos, foi promover a ligação de proteínas ou de ADN a uma Tat com um domínio de transdução que favorece se a penetração no tecido e na membrana celular, funcionando como proteína de transdução (Weinacker et al., 2013). Foram realizados vários estudos com a *E. coli* mas nenhum deles conseguiu obter rendimentos ideais de proteínas com esta funcionalidade.

Em 2012, um estudo de Yan et al. (2012) conseguiu obter pela primeira vez elevados níveis de expressão de Tat-p53 e foi evidente a ocorrência de apoptose celular. Com a transdução da proteína de fusão Tat-p53 para as células tumorais ocorreu inibição o crescimento celular (Weinacker et al., 2013).

5.4. Fragmentos de anticorpos scFv como potenciais marcadores

Os scFv são derivados de anticorpos modificados geneticamente, cujas cadeias pesadas e leves das suas regiões variáveis estão ligadas a um peptídeo ligante (Marty et al., 2001).

Os scFv foram inicialmente produzidos com sucesso através do sistema de expressão da *P. pastoris* no estudo realizado por Marty et al. (2001), que tinha como objetivo atuar contra os domínios ED-B da isoforma B da fibronectina encontrada nos vasos sanguíneos formados durante a angiogênese tumoral. Os autores clonaram uma sequência de fragmentos de anticorpos scFv com domínio ED-B e para tal utilizaram o vetor da levedura *P. pastoris*, pPICZA, que continha uma sequência péptica sinal, para promover a secreção proteica. Para além do vetor precisaram também de um gene de resistência à zeocina e uma sequência *flag-tag* para a deteção proteica.

Os scFv foram então reconhecidos como uma ferramenta de grande utilidade não só para o direcionamento de fármacos, como para o acoplamento de lipossomas e para o diagnóstico e terapêutica de patologias. Por exemplo, no estudo de Marty et al. (2001), os scFv, foram utilizados para o reconhecimento dos domínios ED-B da isoforma B da fibronectina. A capacidade demonstrada pelos scFv neste estudo mostrou o seu grande potencial como marcadores na angiogênese em tumores sólidos em crescimento.

O potencial marcador demonstrado por estes fragmentos foi de extrema importância pois o domínio oncofetal ED-B da isoforma B da fibronectina inserido por *splicing* apenas está presente no estroma fetal e nos tecidos neoplásicos. Nos indivíduos adultos este marcador apenas está presente nos vasos sanguíneos neoplásicos durante a angiogênese (Marty et al., 2001).

Mais recentemente em Wei et al. (2015), os autores utilizaram um fragmento divalente A33scFv-Fc contra a glicoproteína codificante A33 (GPA33), preparado a partir da fusão entre A33scFv e um fragmento da fração constante (Fc) do anticorpo hIgG1. Os autores constataram que os fragmentos divalentes obtidos pela *P. pastoris* ligaram-se positivamente, *in vitro*, às GPA33 tumorais e negativamente às GPA não tumorais.

Utilizando uma técnica de imunofluorescência (Figura 7), os autores de Wei et al. (2015), conseguiram avaliar a especificidade dos fragmentos divalentes A33scFv-Fc. Verificaram que estes fragmentos distribuem-se rapidamente nos xenotransplantes GPA33 tumorais positivos, e com elevados níveis de persistência nestes locais, funcionando como um forte indicador destas células.

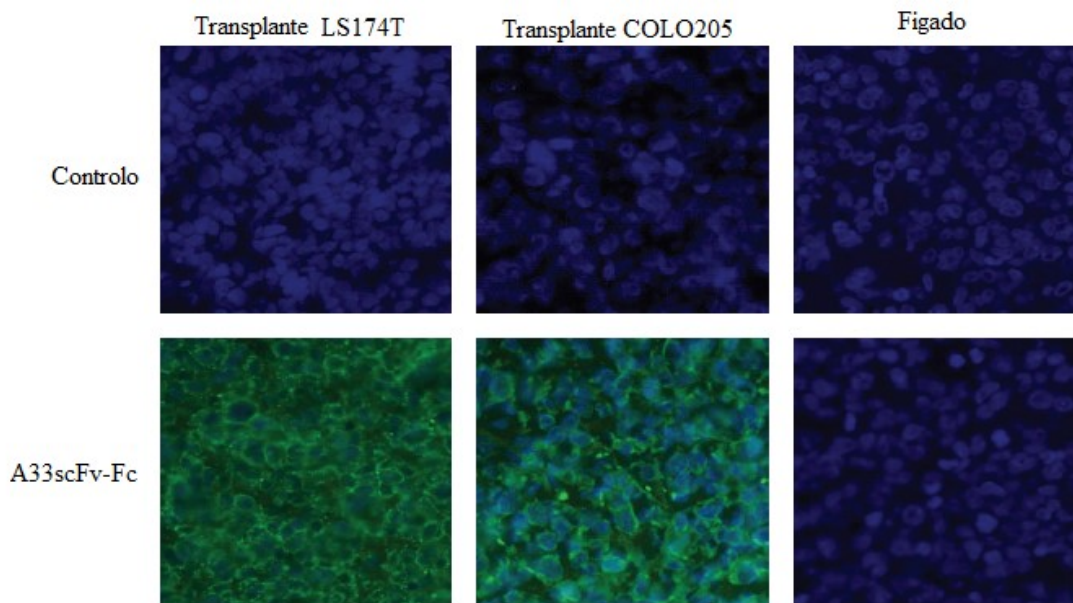


Figura 7 – Ensaio químico de imunofluorescência com tecidos tumorais LS174T, COLO205 e tecidos do fígado. Adaptado de (Wei et al. 2015).

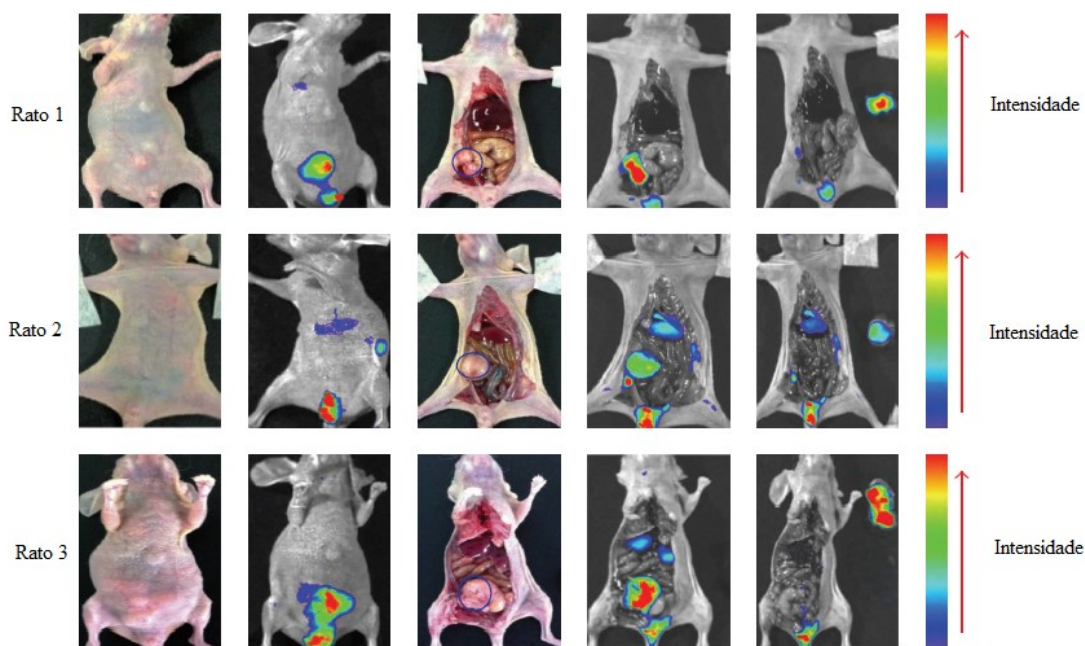


Figura 8 – Imagens de dissecação de tecidos tumorais ortotópicos utilizando CF750-A33scFv-Fc., em três ratos diferentes. Adaptado de Wei et al. (2015).

Ainda no mesmo estudo, os autores, procuraram ainda avaliar a capacidade de direcionamento do indicador CF750-A33scFv-Fc em tumores ortotópicos transplantados nos ratos, recorrendo primeiro a um sistema de imagem ótica sem recurso a laparotomia (**Figura 8**). Nos três ratos foram visíveis os transplantes tumorais,

mas apenas eram palpáveis em dois deles. Após a realização da laparotomia, os tecidos tumorais foram identificados através do indicador CF750-A33scFv-Fc, cujo sinal de fluorescência detetado foi predominante nos tecidos tumorais, fígado e para além disso foi ainda possível distinguir o tecido tumoral supérfluo do tecido saudável do cólon através do sistema de contraste ótico.

Wei e seus colaboradores (2015) conseguiram demonstrar que é possível dissecar um tecido tumoral recorrendo a um sistema de contraste ótico utilizando o agente de contraste CF750-A33scFv-Fc, que pode facilitar a remoção cirúrgica de cancro colorectal mantendo tanto o paciente como o cirurgião livre da radiação.

Determinaram também que a afinidade de A33scFv-Fc nos xenoenxertos celulares de adenocarcinoma humano, LS174T foi superior ao longo das 48 horas de observação relativamente a A33scFv e que apesar de ter uma fraca afinidade também se consegue ligar. Os autores perante estes resultados sugerem que o fragmento divalente A33scFv-Fc é mais apropriado como agente marcador no cancro colorectal.

Contudo os fragmentos Fc estão referidos como potenciais causadores de efeitos colaterais nomeadamente citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC) e citotoxicidade mediada por células dependente de complemento (CDC). Visto existir este efeito adverso, Wei e seus colaboradores (2015) consideram que será mais seguro no futuro utilizar um fragmento divalente ou monovalente sem o fragmento Fc como agente marcador.

Os fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGF) nas células tumorais LS174T apresentaram um nível de expressão superior às COLO205. Estes resultados levam a crer que a utilidade de CF750-A33scFv-Fc poderá estar limitada ao cancro colorectal visto os resultados terem demonstrado diferenças significativas nos xenotransplantes ricos em vasos sanguíneos. Estas diferenças de vascularização poderão estar associadas a diferenças de distribuição de A33scFv-Fc (Wei et al., 2015).

5.5. Expressão da proteína de resistência do cancro da mama utilizando a *P. pastoris*

A levedura da *P. pastoris* foi utilizada como sistema de expressão da proteína de resistência do cancro da mama (BCRP), em 2004, por Mao e colaboradores (2004). Esta proteína é o segundo membro da subfamília G da *ATP-binding cassette* (ABC) (superfamília de transporte) podendo ser também designada por ABCG2 e desempenha funções ao nível da resistência a agentes quimioterapêuticos. Foi identificada em 1998 numa linhagem de células cancerígenas multirresistente a fármacos contra o cancro da mama, MCF-7/AdrVp que não expressam outros transportadores de efluxo como a glicoproteína-P (gp-P) ou a proteína de multi resistente a fármacos 1 (MRP1) (Ni, Bikadi, Rosenberg & Mao, 2010).

O sistema de expressão da *P. pastoris* utilizado por Mao et al. (2004) produziu BCRP com características funcionais muito semelhantes às proteínas expressas nas células eucariotas. Os autores construíram um vetor pHIL-BCRP-His10 contendo um ADNc BCRP para transformar a linhagem KM71 da *P. pastoris*. Para facilitar a purificação proteica, o marcador His10 foi ligado ao terminal -COOH da BCRP (Weinacker et al., 2013).

Os resultados obtidos em Mao et al. (2004) sugerem que a BCRP expressa no sistema de expressão da *P. pastoris* constitui uma alternativa eficaz e de baixo custo para a sua produção e purificação em elevadas quantidades.

5.6. *P. pastoris* como sistema de expressão para desenvolvimento de vacinas contra o papiloma vírus humano

À data do estudo de Zhao et al. (2014) o cancro cervical era considerado a segunda maior causa de morte por cancro nas mulheres, sendo o papiloma vírus humano (HPV) o agente etiológico principal do cancro cervical. Existem duas vacinas profiláticas do HPV, com elevada tolerância e imunogenicidade, porém, o elevado custo a elas associado torna-as ainda inacessíveis a uma grande parte de mulheres em algumas regiões do mundo, em especial em regiões mais empobrecidas (Coimbra et al. 2011).

Nos últimos anos têm sido realizados testes clínicos utilizando partículas semelhantes ao vírus HPV (VLPs) nas vacinas profiláticas que demonstraram bons resultados ao nível da resposta imunitária contra a infeção por HPV. Em Zhao et al. (2014) vem descrito que o desenvolvimento da segurança e eficácia da vacinação contra o HPV poderá reduzir a incidência do cancro cervical em 70% nas pré-adolescentes. No mesmo estudo, os autores determinaram também a melhor estratégia fermentativa para a produção de VLPs do vírus HPV, com o objetivo de baixar os custos de produção desta vacina. A diminuição dos custos de produção poderão trazer vantagens significativas na prevenção do cancro cervical em países em desenvolvimento (Zhao et al., 2014).

Segundo Coimbra et al. (2011) as vacinas baseadas em VLPs, elaboradas com proteínas L1 do cápside do HPV mostraram se mais efetivas perante a infeção viral, uma vez que são capazes de induzir elevada neutralização por parte dos anticorpos a epítipo conformacionais das proteínas L1 HPV que correspondem a cerca 90% do cápside do HPV.

As VLPs podem ser expressas em sistemas de expressão heterólogos de células eucariotas, plantas, bactérias, insetos e leveduras (Coimbra et al., 2011). Segundo o estudo anterior, a levedura *P. pastoris* havia sido utilizada para produzir a proteína L1 HPV-16, associando um vetor episomal a um gene L1 otimizado, porém o recurso a vetores episomais em larga escala não se torna vantajoso pois a levedura recombinada corre o risco de perder os seus vetores após mitoses sucessivas acabando por não serem integrados no genoma.

Para que a produção de vacinas a nível industrial seja rentável, precisa que se produzam linhagens estáveis que expressem o gene L1, e tal só é possível com vetores integrantes. A utilização destes vetores favorece a integração de mais cópias de genes heterólogos, podendo aumentar por sua vez a produção proteica (Coimbra et al., 2011). Os vetores integrados no genoma de *P. pastoris* promoveram a transcrição do gene L1 e a produção

de proteínas, tanto intracelular como extracelular, contudo os rendimentos obtidos foram baixos, sendo necessário otimizar o processo de produção de vacinas baseadas em VLP (Coimbra et al., 2011).

A Lp-PLA2 modificada através da *P. pastoris* poder ser purificada facilmente recorrendo a uma técnica de cromatografia com um agente quelante de níquel. A proteína Lp-PLA2 recombinante foi desenhada para incorporar um terminal C com um marcador de 6xHis que promove o processo de purificação por cromatografia de afinidade, esta vantagem é importante visto a manipulação da purificação diminuir atividade enzimática e o rendimento da proteico (Weinacker et al., 2013).

6. Conclusões

O sucesso da utilização da levedura *P. pastoris* deve-se principalmente às suas características vantajosas relativamente a outros potenciais hospedeiros de expressão proteica. Uma das vantagens é a grande variedade de promotores seguros disponíveis para a produção de biofármacos (Gonçalves et al., 2013) (Ahmad et al., 2014) e a sua capacidade de secreção de proteínas recombinantes ativas, resultantes de modificações pós-traducionais semelhantes às células de organismos superiores (Serrano-Rivero et al., 2015).

Sendo considerada uma levedura metilotrófica cujo metabolismo é preferencialmente respiratório, com esta levedura é possível obter densidades celulares elevadas em biorreatores sem diminuição da produtividade devido a toxicidade provocada por produtos da sua metabolização. Por último, esta levedura consegue ainda apresentar uma taxa de crescimento e níveis de produtividade superiores a qualquer outro sistema de expressão, quer seja eucariota ou procariota, em meios de cultura pouco dispendiosos (Serrano-Rivero et al., 2015).

Sendo um dos principais objetivos de qualquer indústria biofarmacêutica melhorar o rendimento dos seus produtos e diminuir os seus custos de produção, a utilização desta levedura constitui um passo importante para os objetivos de produção biofarmacêutica. Por outro lado, com os recentes avanços no melhoramento do sistema de expressão heterólogo da levedura *P. pastoris*, tornou-se possível nos últimos anos produzir milhares de diferentes proteínas heterólogas com potencial uso em diferentes áreas da saúde.

Um dos principais avanços foi conseguido por Jiang e seus colaboradores (2014) cujos resultados obtidos com a inativação do gene PpATT1 mostraram conseguir aumentar a robustez das linhagens clonadas e por conseguinte aumentar o rendimento do processo de produção.

Outro avanço importante foi o desenvolvimento de linhagens com padrões de glicosilação semelhantes às produzidas pelas células eucariotas sem risco de reações imunológicas (Gonçalves et al., 2013). Foram desenvolvidas alternativas seguras para a expressão proteica nomeadamente com o kit de expressão *PichiaPink*TM (Ahmad et al., 2014), e com os sistemas *GlicoSwitch* e *GlicoFi* (Gonçalves et al., 2013).

As proteínas já obtidas pelo sistema de expressão *P. pastoris* geralmente têm um efeito direto sobre algumas patologias ou atuam secundariamente como auxiliares de outras

proteínas cujas características as impedem de exercer a sua ação farmacológica (Weinacker et al., 2013).

Tal como exposto ao longo desta monografia, vários estudos foram recentemente divulgados onde a utilização da *P. pastoris* foi aplicada em diferentes áreas da saúde.

Na patologia da diabetes mellitus, a levedura *P. pastoris* foi recentemente utilizada com sucesso por Baeshen e seus colaboradores (2016). O estudo teve como objetivo determinar a eficácia de uma insulina recombinante a baixar os níveis séricos de glucose em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, eficácia que foi comprovada neste estudo segundo os resultados obtidos. Os autores afirmaram que estão em processo de desenvolvimento do encapsulamento da insulina recombinante em questão em nanopartículas no sentido de desenvolver no futuro insulina oral (Baeshen et al. (2016).

Na área da alergologia e imunoterapia, a *P. pastoris* tem vindo já a ser utilizada para vários estudos, como no estudo de Marazuela e seus colaboradores (2012) onde determinaram a existência de um derivado hipoalergénico do Ole e1, utilizando o sistema de expressão proteico da levedura *P. pastoris*, o BB18.

Recentemente, Pomés e colaboradores (2016), utilizaram a levedura *P. pastoris* como sistema de expressão de um scFv, para o desenvolvimento de alérgenos modificados com baixa reatividade IgE mas com manutenção de imunogenicidade. Com base nos resultados obtidos, os autores concluíram que os IgE recombinantes constituem ferramentas importantes de análise de determinantes antigénicos no desenvolvimento de um repertório de IgE para desenvolvimento em imunoterapia (Pomés et al., 2016).

No estudo de Kan e seus colaboradores (2015), por sua vez a levedura foi utilizada para expressão de uma proteína recombinante MGL_1304 (P-rMGL_1304) para o estudo das suas capacidades para aplicação em indivíduos com dermatite atópica.

Em Bonifer e seus colaboradores (2015) o sistema de expressão proteico da levedura *P. pastoris* foi utilizado para produzir duas isoenzimas simples HRP, a C1A e a A2C. O estudo procurava determinar a eficácia de enzimas recombinantes na oxidação de AIA e a sua combinação com AIA em células T24 do carcinoma da bexiga e nas células *in vitro*, MDA-MB-231, do carcinoma da mama.

Outra área de utilização da *P. pastoris* é na integração de vetores no genoma de *P. pastoris* para promoção da transcrição de genes. Fan e seus colaboradores (2015), recorreram ao sistema de expressão da *P. pastoris* para desenvolver técnicas mais eficientes na expressão das proteínas REG3 α através do vetor de expressão pwPICZalpha. Fan e colaboradores (2015) conseguiram mostrar nos seus resultados a

forte atividade da proteína REG3 α contra as células do carcinoma hepatocelular (linhagens SMMC-7721).

Na investigação realizada por Coimbra e seus colaboradores (2011) foram também utilizados vetores integrantes para a expressão de genes heterólogos que aumentaram a produção proteica para a produção industrial de vacinas. Contudo os rendimentos obtidos neste estudo foram relativamente baixos sendo ainda necessário otimizar este processo de produção de vacinas baseadas em VLPs.

O sistema de expressão da *P. pastoris* foi também utilizado na produção de scFv, para utilização como marcadores na angiogênese em tumores sólidos em crescimento (Marty et. al., 2001). Um estudo mais recente de Wei e seus colaboradores (2015), recorreu a fragmentos divalentes obtidos pela *P. pastoris* (A33scFv-Fc) para avaliar não só a sua especificidade para células tumorais como a sua utilização, juntamente com a ligação a um indicador de fluorescência, como potenciais indicadores deste tipo de células e a sua funcionalidade na remoção cirúrgica de cancro colorectal em ratos.

As aplicações atuais da *P. pastoris* são vastas, porém, com base no conhecimento biológico atual desta levedura e com as novas ferramentas atuais de engenharia genética, é ainda necessário otimizar os processos de produção para aumentar o rendimento de produtos biofarmacêuticos, assim como aumentar e melhorar a sua aplicação na área da saúde.

7. Bibliografia

Afshar-Kharghan, V., Li, C. Q., Khoshnevis-Asl, M. & López, J. A. (2016). Kozak Sequence Polymorphism of the Glycoprotein (GP) Ib α Gene Is a Major Determinant of the Plasma Membrane Levels of the Platelet GP Ib-IX-V Complex. *Blood*, 94, 186-191.

Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H. & Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98 (12), 5301 – 5317.

Asam, C., Hofer, H., Wolf, M., Aglas, L. & Wallner, M. (2015). Tree pollen allergens - an update from a molecular perspective. *Allergy*, 70, 1201 – 1211.

Baeshen, M. N., Bouback, T. A. F., Alzubaidi, M. A., Bora, R. S., Alotaibi, M. A. T., Alabbas, O. T. O. & Baeshen, N. A. (2016). Expression and Purification of C-Peptide Containing Insulin Using *Pichia pastoris* Expression System. *BioMed Research International*, 2016.

Bonifer, G., Folkes, L., Gmeiner, C., Dachs, G. & Spadiut, O. (2015). Recombinant horseradish peroxidase variants for targeted cancer treatment. *Cancer Medicine*, 5 (6):1194– 1203.

Coimbra, E.C., Gomes, F.B., Campos, J.F., D'arc, M., Carvalho, J.C., Mariz, F.C., Jesus, A.L.S., Stocco, R.C., Beçak, W., & Freitas, A.C.. (2011). Production of L1 protein from different types of HPV in *Pichia pastoris* using an integrative vector. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 44 (12), 1209-1214.

Cos, O., Ramón, R., Montesinos, J. L. & Valero, F. (2006). Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters. *Microbial Cell Factories*, 5 (17), 1-20.

Cregg, J. M., Barringer, K. J., Hessler, A.Y. & Maddenet, K. R. (1985). *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Molecular and Cellular Biology*, 5, 3376 – 3385.

Dai, M., Yu, C., Fang, T., Fu, L., Wang, J., Zhang, J. & Chen, W. (2015) Identification and Functional Characterization of Glycosylation of Recombinant Human Platelet-Derived Growth Factor-BB in *Pichia pastoris*. *PLoS ONE*, 10 (12).

Douglas, H., Michaelides, K., Gorog, D, A., Durante-Mangoni, E., Ahmed, N., Davies, G. J. & Tuddenham, E. G. D. (2002). Platelet membrane glycoprotein Ib α gene

-5T/C Kozak sequence polymorphism as an independent risk factor for the occurrence of coronary thrombosis. *Heart*, 87, 70-74.

Fan, K., Jiang, J., Wang, Z., Yin, W., Sun, Y. & Li, H. (2015). Expression and purification of the recombinant murine REG3a protein in *Pichia pastoris* and characterization of its antimicrobial and antitumour efficacy. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29 (4), 740745.

Ferrer-Miralles, N., Domingo-Espín, J., Corchero, J. L., Vázquez, E. & Villaverde, A. (2009). Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories*, 8, 17.

Fickers, P. (2014). *Pichia pastoris*: a workhorse for recombinant protein production. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 2 (3), 354-363.

Gmeiner, C., Saadati, A., Maresch, D., Krasteva, S., Frank, M., Altmann, F. & Spadlut, O. (2015). Development of a fed-batch process for a recombinant *Pichia pastoris* Δoch1 strain expressing a plant peroxidase. *Microbial Cell Factories*, 14 (1), 1-10.

Gonçalves, A. M., Pedro, A. Q., Maia, C., Sousa, F., Queiroz, J. A. & Passarinha, L. A. (2013). *Pichia pastoris*: A Recombinant Microfactory for Antibodies and Human Membrane Proteins. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23 (5), 587 – 601.

Gurramkonda, C., Polez, S., Skoko, N., Adnan, A., Gäbel, T., Chugh, D. & Rinas, U. (2010). Application of simple fed-batch technique to high-level secretory production of insulin precursor using *Pichia pastoris* with subsequent purification and conversion to human insulin. *Microbial Cell Factories*, 9, 31.

Hamilton, S. R., Cook, W. J., Gomathinayagam, S., Burnina, I., Bukowski, J., Hopkins, D. & Nett, J. H. (2013). Production of sialylated O-linked glycans in *Pichia pastoris*. *Glycobiology*, 23 (10), 1192-1203.

Jiang, B., Argyros, R., Bukowski, J., Nelson, S., Sharkey, N., Kim, S. & Stadheim, T.A. (2014). Inactivation of a GAL4-like transcription factor improves cell fitness and product yield in glycoengineered *Pichia pastoris* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 260 – 271.

Kan, T., Hiragun, T., Ishii, K., Hiragun, M., Yanase, Y., Tanaka, A. & Hide, M. (2015). Evaluation of recombinant MGL_1304 produced by *Pichia pastoris* for clinical application to sweat allergy. *Allergology International*, 64 (3), 266-271.

Kozak, M. (1986). Point Mutations Define a Sequence Flanking the AUG Initiator Codon That Modulates Translation by Eukaryotic Ribosomes. *Cell*, 44, 283-292.

Kurtzman, C.P. (2005). Description of *Komagataella phaffii* sp. nov. and the transfer of *Pichia pseudopastoris* to the methylotrophic yeast genus *Komagataella*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55, 973 – 976.

Lunn, M., & Banta, E. (2011). Ecallantide for the treatment of hereditary angiodema in adults. *Clinical Medicine Insights. Cardiology*, 5, 49 – 54.

Lynch, S.A & Gill, R.T. (2012). Synthetic biology: new strategies for directing design. *Metabolic Engineering*, 14, 205-211.

Mao, Q., Conseil, G., Gupta, A., Cole, S. P. C. & Unadkat, J. D. (2004). Functional expression of the human breast cancer resistance protein in *Pichia pastoris*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320, 730 – 737.

Marazuela, E.G., Hajek, R., Villalba, M., Barber, D., Breiteneder, H., Rodríguez, R. & Batanero, E. (2012). A non-allergenic Ole e 1-like protein from birch pollen as a tool to design hypoallergenic vaccine candidates. *Molecular Immunology* 50:83-90.

Marty, C., Scheidegger, P., Ballmer-Hofer, K., Klemenz, R. & Schwendener, R. (2001). Production of functionalized single-chain Fv antibody fragments binding to the ED-B domain of the B-isoform of fibronectin in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 21 (1), 156-164.

Mello, A.P.Q., Silva, I. T., Abdalla, D. S.P. & Damasceno, N. R. T. (2011). Electronegative low-density lipoprotein: Origin and impact on health and disease. *Atherosclerosis*, 215, 257 – 265.

Ni, Z., Bikadi, Z., Rosenberg, M. F., & Mao, Q. (2010). Structure and Function of the Human Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2). *Current Drug Metabolism*, 11 (7), 603 – 617.

Ortiz de Montellano, P. R.. (2013). Cytochrome P450-activated prodrugs. *Future Medicinal Chemistry*, 5 (2): 213– 228.

Pomés, A., Glesner, J., Woodfolk, J. A., Wright, P., Kepley, C. L., Li, M. & Chapman, M. H. (2015). Bla g 2 hypoallergens retaining the native fold and capacity to modulate T cell reactivity provide candidates for cockroach immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135 (2).

Pomés, A., Glesner, J., Godzwon, M., Levin, M., Chapman, M. D. & Ohlin, M. (2016). Recombinante human IgE antibodies to analyze antigenic determinants in group 1 mite allergens for the design of immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137 (2).

Prielhofer, R., Maurer, M., Klein, J., Wenger, J., Kiziak, C., Gasser, B. & Gasser, B. (2013). Induction without methanol: novel regulated promoters enable high-level expression in *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 12 (5), 1-10.

Raspi, G. (1996). Kallikrein and kallikrein-like proteinases: purification and determination by chromatographic and electrophoretic methods. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 684 (1-2), 265 – 87.

Rebsomen, L., Khammar, A., Raccah, D. & Tsimaratos, M. (2008). C Peptide effects on renal physiology and diabetes. *Experimental diabetes research*, 2008.

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

Scala, E., Abeni, D., Pomponi, D., Paganelli, R., Locanto, M., Giani, M., Cecchi, L., & Asero, R. (2016). Ole e 1, Ole e 7, and Ole e 9: Identifying distinct clinical subsets of olive tree-allergic patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137 (2), 629-631.

Sears, I. B., O'Connor, J., Rossanese, O. W. & Glick, B. S. (1998), A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. *Yeast*, 14, 783 – 790.

Serrano-Rivero, Y., Marrero-Domínguez, K. & Fando-Calzada, R.. (2015). *Pichia pastoris*: una plataforma para la producción de proteínas heterólogas. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 47 (2), 67-77.

Traven, A., Jelcic, B. & Sopta, M.. (2006). Yeast GAL4: a transcriptional paradigm revisited. *EMBO Reports*, 7, 496 – 499.

Vanz, A. L., Lünsdorf, H., Adnan, A., Nimtz, M., Gurramkonda, C., Khanna, N. & Rinas, U. (2012). Physiological response of *Pichia pastoris* GS115 to methanol-induced high level production of the Hepatitis B surface antigen: catabolic adaptation, stress responses, and autophagic processes. *Microbial Cell Factories*, 11 (103), 1-11.

Vogl, T., Harner, F. S. & Glieder, A. (2013). New opportunities by synthetic biology for biopharmaceutical production in *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology*, 24, 1094 – 1101.

Wahren, J., Ekberg, K. & Jörnvall, H. (2007). C-peptide is a bioactive peptide. *Diabetologia*, 50, 503 – 509.

Wei, D., Fan, Q., Cai, H., Yang, H., Wan, L., Li, L. & Lu, X. (2015). CF750-A33scFv-Fc-Based Optical Imaging of Subcutaneous and Orthotopic Xenografts of GPA33-Positive Colorectal Cancer in Mice. *BioMed Research International*, 2015.

Weinacker, D., Rabert, C., Zepeda, A. B., Figueroa, C. A., Pessoa, A. & Farias, J.G.. (2013). Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44 (4), 1043-1048.

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R. & King, H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27 (5), 1047 – 1053.

World Health Organization. (2016). Global report on diabetes.

Zhao, J., Wang, Z.J., Hang, H.F., Guo, M.J., Zhuang, Y.P., Chu, J. & Lou, J.. (2014). Human Papillomavirus 16 L1 Protein Expression and Self-Assembly in Recombinant *Pichia pastoris*. *Global Journal of Technology and Optimization*, 6, 168.