

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta dissertação
será disponibilizado somente a partir
de 28/02/2024.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)
(Mestrado)

**Produção e purificação da proteína recombinante humana
SLPI a partir da microalga *Chlamydomonas reinhardtii***

Bárbara Luísa Chagas da Silva

Rio Claro – SP
2023



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)
(Mestrado)

**Produção e purificação da proteína recombinante humana
SLPI a partir da microalga *Chlamydomonas reinhardtii***

Bárbara Luísa Chagas da Silva

Orientador: Prof. Dr. Augusto Ducati Luchessi

Dissertação apresentada ao Instituto de Biotecnologia do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia).

Rio Claro – SP
2023

S586p Silva, Bárbara Luísa Chagas da
Produção e purificação da proteína recombinante humana SLPI a partir da microalga *Chlamydomonas reinhardtii* / Bárbara Luísa Chagas da Silva. -- Rio Claro, 2023
77 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Augusto Ducati Luchessi

1. Biotecnologia. 2. Microalga. 3. Proteína recombinantes. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Produção e purificação da proteína recombinante humana SLPI a partir da microalga *Chlamydomonas reinhardtii*

AUTORA: BÁRBARA LUÍSA CHAGAS DA SILVA

ORIENTADOR: AUGUSTO DUCATI LUCHESSI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Biológicas, área: Estrutura, Função e Produção de Biomoléculas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. AUGUSTO DUCATI LUCHESSI (Participação Virtual)
Faculdade de Ciências Aplicadas / Universidade Estadual de Campinas

Documento assinado digitalmente
govbr AUGUSTO DUCATI LUCHESSI
Data: 06/03/2023 16:07:28-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. FERNANDO MOREIRA SIMABUCO (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica / Universidade Federal de São Paulo



Prof. Dr. IGOR LUCHINI BAPTISTA (Participação Virtual)
Faculdade de Ciências Aplicadas / Universidade Estadual de Campinas

Documento assinado digitalmente
govbr IGOR LUCHINI BAPTISTA
Data: 07/03/2023 07:58:18-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Rio Claro, 28 de fevereiro de 2023

Dedico esta conquista ao meus pais, Marli e Miguel, que foram meu porto seguro durante essa trajetória, e que com muito amor e compreensão, não pouparam esforços para que eu concluísse mais um ciclo em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a Deus, por me conceder a vida e a oportunidade de buscar o conhecimento, capaz de transformar a realidade e tornar o mundo melhor.

À minha família, que sempre me apoiou e incentivou, e acreditou em mim quando eu mesma, muitas vezes, duvidei. Obrigada por ser meu porto seguro, por me escutar e aconselhar em momentos de incertezas, frustrações e insatisfação. Serei eternamente grata a todo amor, carinho e compreensão dedicados, que foram a base para esta conquista.

À minha namorada, Polyanna Godoi, por me apoiar em todas as minhas escolhas, mesmo isso significando ficar quase 1000 km distantes uma da outra. Obrigada pelo incentivo, amor, carinho e compreensão, por conversar e me acalmar nos momentos difíceis. Obrigada pela confiança, companheirismo e por me dar forças para seguir em frente.

Aos meus amigos da Biotecnologia, que se tornaram minha família. À Camila Suguiura e Vitória Balestrini, por terem sido as melhores amigas que eu poderia ter e crescerem comigo ao longo de tantos anos. À Heloísa Antoniella, por toda ternura, lealdade e carinho infidável. Um agradecimento especial à Jade Ribeiro e Alessandro Zanard, pelo companheirismo, amizade e momentos de carinho e distração em meio à turbulência do mestrado.

Ao meu orientador, Prof^o Dr. Augusto Ducati Luchessi, pela confiança depositada em meu trabalho, pelos ensinamentos, orientação e incentivo ao longo desses anos.

Às minhas companheiras de laboratório: Karina Pereira, obrigada por todo conhecimento compartilhado, confiança e consideração. Sua ajuda foi muito importante para a conclusão desta etapa em minha vida. À Letícia Fudimori, pela cumplicidade e parceria. Agradeço em especial, a Letícia Tamborlin e Jéssica Araújo, por serem além de companheiras de trabalho, minhas amigas. Obrigada pelo acolhimento, pelas risadas e bons momentos dentro e fora do laboratório. Obrigada pela paciência em ensinar, pelos conselhos, pela amizade que vou levar para a vida, pelo companheirismo e apoio que me ajudou a continuar e acreditar.

Agradeço à Universidade Estadual Paulista (UNESP) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia) a oportunidade de realização do mestrado.

Agradeço a Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA-UNICAMP) e todo corpo docente, bem como a estrutura cedida pela universidade e a todos os funcionários, que possibilitaram a execução deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2019/06951-3.

Enfim, a todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho assim como para meu crescimento profissional e pessoal. Essa longa trajetória não teria sido a mesma sem todo o apoio de vocês. Meu eterno agradecimento.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas,
mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra
alma humana.”

(Carl Jung)

RESUMO

O inibidor de protease secretado por leucócitos (SLPI) foi primeiramente descrito em 1986. Desde então, é alvo de diversos estudos devido às suas variadas funções. A proteína SLPI desempenha diversos papéis no organismo humano, sendo que a principal é sua ação inibidora de serina – proteases. Devido à essa função, a SLPI têm um importante papel na manutenção da homeostase entre proteases e antiproteases no trato respiratório humano e na pele, agindo principalmente em respostas anti-inflamatórias contra agentes danosos ao tecido. Adicionalmente, a proteína SLPI também já foi caracterizada em mecanismos de cicatrização, metabolismo ósseo, câncer e apresenta propriedades antimicrobianas, antifúngicas e antivirais. Por ser uma proteína multifuncional, o potencial terapêutico da SLPI é bastante explorado por pesquisadores e vem sendo testado em diferentes campos da ciência, como doenças respiratórias, neuroregeneração, cicatrização de feridas, e cardioproteção em situações de isquemia/reperfusão. Devido ao crescente interesse em pesquisas biotecnológicas visando a proteína SLPI como um bioproduto, diversas empresas passaram a produzir e comercializar a proteína em diferentes sistemas de expressão e produção. Porém, a SLPI ainda é vendida somente para fins de pesquisa científica à um custo muito alto. O mercado biotecnológico de produção e expressão de proteínas recombinantes têm avançado bastante nos últimos anos, e diversas plataformas estão sendo desenvolvidas, como plantas, animais transgênicos, células humanas e microalgas. As microalgas vem sendo muito utilizadas em pesquisas para biorremediação, desenvolvimento de ração e suplemento alimentar, e não há muito tempo, ganharam notável evidência como promissoras plataformas para produção de proteínas recombinantes. Esses organismos apresentam grande potencial como plataformas biotecnológicas para desenvolvimento de bioprodutos, pois são seres eucariotos, unicelulares, de rápido crescimento e com baixo custo de meio de cultura. À vista disso, o presente projeto teve como objetivo a produção e purificação da proteína recombinante humana SLPI a partir da microalga *Chlamydomonas reinhardtii*.

Palavras – chave: SLPI; purificação; *Chlamydomonas reinhardtii*; proteína recombinante.

ABSTRACT

The secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) was first described in 1986. Since then, it has been the subject of several studies due to its varied functions. The SLPI protein plays several roles in the human body, the main one being its inhibitory action on serine-proteases. Due to this function, SLPI play an important role in maintaining homeostasis between proteases and antiproteases in the human respiratory tract and in the skin, acting mainly in anti-inflammatory responses against tissue-damaging agents. Additionally, the SLPI protein has also been characterized in healing mechanisms, bone metabolism, cancer and has antimicrobial, antifungal and antiviral properties. As it is a multifunctional protein, the therapeutic potential of SLPI is widely explored by researchers and has been tested in different fields of science, such as respiratory diseases, neuroregeneration, wound healing, and cardioprotection in situations of ischemia/reperfusion. Due to the growing interest in biotechnological research, targeting the SLPI protein as a by-product, several companies started to produce and commercialize the protein in different expression and production systems. However, SLPI is still only sold for scientific research purposes at a very high cost. The biotechnological market for the production and expression of recombinant proteins has advanced a lot in recent years, and several platforms are being developed, such as plants, transgenic animals, human cells and microalgae. Microalgae have been widely used in research for bioremediation, feed development and food supplement, and not long ago, they gained the spotlight as promising platforms for the production of recombinant proteins. These organisms have great potential as biotechnological platforms for the development of bioproducts, as they are eukaryotic, unicellular, fast-growing beings with low cost of culture medium. In view of this, the present project aimed at the production and purification of the recombinant human protein SLPI from the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*.

Keywords: SLPI; purification; *Chlamydomonas reinhardtii*; recombinant protein.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVO	14
2.1	Objetivos específicos:	14
3	CAPÍTULO 1: ARTIGO DE REVISÃO	15
3.1	Metodologia.....	15
3.1.1	Artigo de revisão	15
3.2	Resultados	16
3.2.1	Manuscrito de revisão intitulado “SLPI: functions, applications, and production”	16
4	CAPÍTULO 2: PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE HUMANA SLPI A PARTIR DA MICROALGA CHLAMYDOMONAS REINHARDTII	52
4.1	Metodologia.....	52
4.1.1	Construção dos plasmídeos e transformação da microalga <i>C. reinhardtii</i>	52
4.1.2	Linhagens de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> e condições de cultivo 55	
4.1.3	Purificação da proteína rhSLPI por cromatografia de troca iônica 55	
4.1.4	Immunoblotting	55
4.1.5	SDS-PAGE e coloração com prata	56
4.1.6	Precipitação de proteínas do sobrenadante com Sulfato de Amônio 57	
4.1.7	Precipitação de proteínas do sobrenadante com acetona	57
4.1.8	Diálise	57
4.2	Resultados	58
4.2.1	Clones produtores de rhSLPI	58
4.2.2	Primeira cromatografia	61
4.2.3	Segunda cromatografia	63
4.2.4	Terceira cromatografia	65
4.2.5	Quarta cromatografia	66
5	DISCUSSÃO	68
6	CONCLUSÃO	71

1 INTRODUÇÃO

O inibidor de protease secretado por leucócitos (SLPI), é uma proteína catiônica não glicosilada com ação contra serina proteases, servindo para controlar a liberação excessiva de proteases secretadas. Os inibidores de proteases podem ser divididos em dois grupos: inibidores "sistêmicos" e inibidores de "alarme". Os inibidores "sistêmicos" são sintetizados principalmente no fígado e incluem o inibidor da α 1-proteinase e a antiqumiotripsina. Já os inibidores de "alarme" são sintetizados e secretados localmente no local da lesão e são produzidos em resposta às citocinas primárias, como a interleucina (IL) -1 β e o fator de necrose tumoral (TNF) (SALLENAVE, 2000). A SLPI atua em ambos os grupos de inibidores, sendo considerada uma proteína multifacetada.

A SLPI é um polipeptídeo formado por 107 aminoácidos e possui um peso molecular de 11.726 kDa. A estrutura terciária da SLPI lembra um "boomerang", em que cada braço representa um domínio (C-terminal e N-terminal). Os domínios homólogos são denominados domínios *whey acidic protein* (WAP) e são caracterizados por oito resíduos de cisteína que formam quatro ligações dissulfeto intramoleculares. Em 1988 Grutter et al publicaram a estrutura do domínio WAP II (C-terminal) da proteína SLPI acoplada com a α -quimiotripsina bovina (GRÜTTER et al., 1988). Posteriormente, Koizumi et al. (2008) e Fukushima et al. (2013) também elucidaram, em alta definição, a estrutura do domínio WAP II da proteína em complexo com a elastase de neutrófilo humana e tripsina, respectivamente. Estes estudos confirmaram estudos anteriores que descreveram que o domínio WAP II é o responsável pela ação inibitória da SLPI contra serina proteases e que o sítio de inibição está localizado entre os resíduos 67 e 74 (EISENBERG et al., 1990a; FUKUSHIMA; KAMIMURA; TAKIMOTO-KAMIMURA, 2013; KOIZUMI et al., 2008; KRAMPS et al., 1990).

Além de sua atividade antiprotease, a SLPI demonstrou propriedades antibacterianas, antivirais, antifúngicas e anti-inflamatórias, além de participar de respostas imunes inatas e adaptativas. A proteína SLPI é produzida por células epiteliais humanas (NUGTEREN; SAMSOM, 2021), células traqueais, alveolares brônquicas e bronquiolares, e em células mielóides, como macrófagos, granulócitos,

células dendríticas e plaquetas, em neurônios e astrócitos e também em células musculares esqueléticas (JIN et al., 1997; LILO et al., 2013; NUGTEREN; SAMSOM, 2021; ODAKA et al., 2003; SCHULZE et al., 2004; WANG et al., 2003). Além disso, foi relatado que SLPI é expressa em adipócitos e tecido adiposo, onde poderia desempenhar função moduladora relevante na resolução da inflamação (ADAPALA; BUHMAN; AJUWON, 2011). Está presente em altas concentrações em diversas secreções, incluindo secreções salivares e nasais, bronquiais, além de muco cervical e intestinal (NUGTEREN; SAMSOM, 2021).

Já foi demonstrado atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral da proteína SLPI. A atividade antibacteriana foi primeiramente descrita em 1980 e em 1996 Hiemstra et al. (1996) demonstrou a atividade contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Wiedow et al. (1998) testou a atividade antibacteriana da SLPI contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, e *Staphylococcus epidermidis*, microorganismos altamente presentes na pele humana, e atestou que a SLPI promove uma barreira antimicrobiana. A atividade antiviral da SLPI foi observada contra o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1). (HIEMSTRA et al., 1996; WIEDOW et al., 1998).

Alto nível de SLPI na saliva de bebês de 1 mês de idade foi associado à reduzido nível de infecção por HIV-1, quando expostos ao vírus por meio do leite materno, assim como a presença de SLPI no fluido vaginal mostrou inibição da infecção de bebês pelo vírus HIV-1 quando nascidos através de parto normal (FARQUHAR et al., 2002; PILLAY et al., 2001b). A expressão de SLPI em glândulas salivares foi relacionada à baixa taxa de transmissão viral entre indivíduos, mais especificamente do vírus HIV-1 (WAHL et al., 1997). Ademais, a atividade anti-HIV-1 da SLPI presente na saliva já foi demonstrada *in vitro* (MCNEELY et al., [s.d.]). A atividade da proteína SLPI contra o vírus do papiloma humano (HPV) também já foi reportada. Woodham et al (2012) mostrou que a incubação da SLPI com células epiteliais diminui a infecção dessas células com o vírus HPV através da ligação da SLPI à Anexina A2 (HOFFMANN et al., 2013; WOODHAM et al., 2012). A atividade antifúngica do inibidor de protease leucocitária secretora (SLPI) foi avaliada contra os patógenos *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans*. Em *Candida albicans* foi mostrado que a SLPI pode modular diferentes fatores de virulência como atividade

proteolítica, hidrofobicidade, adesão a epitélio e expressão de manoproteínas (CURVELO et al., 2014).

A produção heteróloga de SLPI recombinante em *E. Coli* é disponível comercialmente e vem sendo utilizada em estudos de função estrutural bem como em estudos de aplicações terapêuticas, como por exemplo, no tratamento de inflamação pulmonar, lesão isquêmica, reperfusão em transplante cardíaco e em tuberculose (FAKIOGLU et al., 2008; GIBBONS et al., 2009; GOMEZ et al., 2009; NERNPERMPISOOTH; PROMPUNT; KUMPHUNE, 2017; PROMPUNT et al., 2018a, 2018b; TOMEE et al., 1998). No entanto, a produção da proteína SLPI humana em bactérias implica em limitações para sua aplicação terapêutica, pois existe a possibilidade de contaminação por endotoxinas, pode ocorrer variação e oxidação da proteína, além de potencialmente afetar a atividade proteolítica da SLPI (KONOPKA et al., 1999). Ademais, o processo de purificação da proteína SLPI contribui para o seu alto custo (cerca de US\$ 355,00 por 100 µg – R&D Systems) (EISENBERG et al., 1990a; HAMAKER et al., 1996; HARCUM; COLLINS; SEELY, 1993).

Assim, as questões associadas com a produção de SLPI recombinante expressa em bactérias indicam a necessidade de um sistema de expressão alternativo que seja capaz de fornecer consistentemente SLPI na sua conformação nativa a um custo mais acessível. Neste contexto, é proposto realizar a expressão de SLPI humana (rhSLPI) na microalga *C. reinhardtii*.

6 CONCLUSÃO

O inibidor de protease leucocitária secretora (SLPI), é uma proteína bastante estudada nos últimos anos. Sua atuação em diversos campos da fisiologia humana chama a atenção de pesquisadores das mais diversas áreas, o que levou ao desenvolvimento de estratégias para a obtenção de SLPI recombinante e sua aplicação.

A biotecnologia de microalgas é um campo de pesquisa promissor para o desenvolvimento de diversos produtos: medicamentos, biocombustíveis, alimentos, fármacos, entre outros. A biotecnologia mudará com o aprimoramento das tecnologias que permitem que as microalgas se tornem um sistema de produção como *E. coli*, *P. pastoris*, células de insetos e de mamíferos. As microalgas como biorreatores têm vantagens consideráveis sobre bactérias, leveduras, plantas e outros sistemas de produção de proteínas recombinantes, como baixo custo, segurança, métodos alternativos de cultura e rápida escalabilidade. Com o atual desenvolvimento de pesquisas, as microalgas emergirão como o sistema de produção de proteína recombinante mais eficiente e de alta recuperação em breve. Pensando nisso, a produção de SLPI em microalgas é um campo promissor para entidades médicas e farmacêuticas.

O presente projeto, tem como objetivo a produção e purificação da SLPI humana recombinante a partir da microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. Foi apresentado que a técnica de purificação por cromatografia de troca iônica é eficiente para a obtenção da proteína SLPI, porém, ainda é necessário muito estudo e aperfeiçoamento para que seja obtida uma proteína pura, livre de contaminantes. Estão sendo feitos diversos estudos e análises para o desenvolvimento de um protocolo de purificação eficaz na obtenção da proteína recombinante humana SLPI pura. Após a padronização do roteiro experimental, poderá ser iniciada a etapa de testes de atividade com a proteína obtida no laboratório, para certificação de que a proteína rhSLPI produzida em microalga é biologicamente ativa.

BIBLIOGRAFIA

- ADAPALA, V. J.; BUHMAN, K. K.; AJUWON, K. M. Novel anti-inflammatory role of SLPI in adipose tissue and its regulation by high fat diet. **Journal of Inflammation**, v. 8, n. 1, p. 5, 2011.
- BAIER, T. et al. Intron-containing algal transgenes mediate efficient recombinant gene expression in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 13, p. 6909–6919, 2018.
- BARANGER, K. et al. Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI) Is, like Its Homologue Trappin-2 (Pre-Elafin), a Transglutaminase Substrate. **PLOS ONE**, v. 6, n. 6, p. e20976, 2011.
- BLABY, I. K. et al. The *Chlamydomonas* genome project: A decade on. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 10, p. 672–680, 1 out. 2014.
- CURVELO, J. A. D. R. et al. Effect of the secretory leucocyte proteinase inhibitor (SLPI) on *Candida albicans* biological processes: A therapeutic alternative? **Archives of Oral Biology**, v. 59, n. 9, p. 928–937, 2014.
- DOVE, A. Uncorking the biomanufacturing bottleneck As biomanufacturing capacity becomes strained , several new methods for producing biologics are being investigated by biotechnology companies . **Nature Biotechnology**, v. 20, p. 777–779, 2002.
- EISENBERG, S. P. et al. Location of the Protease-inhibitory Region of Secretory Leukocyte Protease Inhibitor*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 14, p. 7976–7981, 1990.
- ELLSTRAND, N. C. When transgenes wander, should we worry? **Plant Physiology**, v. 125, n. 4, p. 1543–1545, 2001.
- FAKIOGLU, E. et al. Herpes Simplex Virus Downregulates Secretory Leukocyte Protease Inhibitor: a Novel Immune Evasion Mechanism. **Journal of Virology**, v. 82, n. 19, p. 9337–9344, 2008.
- FARQUHAR, C. et al. Salivary Secretory Leukocyte Protease Inhibitor Is Associated with Reduced Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 through Breast Milk. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 8, p. 1173, 10 out. 2002.
- FRANKLIN, S. E.; MAYFIELD, S. P. Prospects for molecular farming in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 2, p. 159–165, 2004.
- FUKUSHIMA, K.; KAMIMURA, T.; TAKIMOTO-KAMIMURA, M. Structure basis 1/2SLPI and porcine pancreas trypsin interaction. **Journal of Synchrotron Radiation**, v. 20, n. Pt 6, p. 943, 11 nov. 2013.

GIBBONS, A. M. et al. Delivery of rSLPI in a liposomal carrier for inhalation provides protection against cathepsin L degradation. **Journal of Microencapsulation**, v. 26, n. 6, p. 513–522, 2009.

GIMPEL, J. A. et al. **Advances in microalgae engineering and synthetic biology applications for biofuel production. Current Opinion in Chemical Biology**, jun. 2013.

GOMEZ, S. A. et al. Secretory leukocyte protease inhibitor a secreted pattern recognition receptor for mycobacteria. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 179, n. 3, p. 247–253, 2009.

GRAY, L. R.; ALEXANDER, A. L.; SHUGARS, D. C. Construction, non-denaturing affinity purification, and characterization of baculovirally expressed human secretory leukocyte protease inhibitor. **Protein Expression and Purification**, v. 26, n. 1, p. 179–186, 2002.

GRÜTTER, M. G. et al. The 2.5 Å X-ray crystal structure of the acid-stable proteinase inhibitor from human mucous secretions analysed in its complex with bovine alpha-chymotrypsin. **The EMBO Journal**, v. 7, n. 2, p. 345, 1988.

HAMAKER, K. H. et al. Chromatography for rapid buffer exchange and refolding of secretory leukocyte protease inhibitor. **Biotechnology Progress**, v. 12, n. 2, p. 184–189, 1996.

HARCUM, S. W.; COLLINS, F.; SEELY, R. J. Leukocyte bond formation. v. 15, n. 9, p. 943–948, 1993.

HIEMSTRA, P. S. et al. Antibacterial activity of antileukoprotease. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 11, p. 4520–4524, 1996.

HOFFMANN, M. et al. Human papillomavirus infection in head and neck cancer: The role of the secretory leukocyte protease inhibitor. **Oncology Reports**, v. 29, n. 5, p. 1962, maio 2013.

IBUOT, A. et al. Increased metal tolerance and bioaccumulation of zinc and cadmium in *Chlamydomonas reinhardtii* expressing a *AthMA4* C-terminal domain protein. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 117, n. 10, p. 2996–3005, 1 out. 2020.

JAMES, G. O. et al. Temperature modulation of fatty acid profiles for biofuel production in nitrogen deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 441–447, 2013.

JIN, F. Y. et al. Secretory leukocyte protease inhibitor: A macrophage product induced by and antagonistic to bacterial lipopolysaccharide. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 417–426, 1997.

KOIZUMI, M. et al. Complex of human neutrophil elastase with 1/2SLPI. **urn:issn:0909-0495**, v. 15, n. 3, p. 308–311, 18 abr. 2008.

KONOPKA, K. et al. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI): oxidation of SLPI does not explain its variable anti-HIV activity. **Journal of Dental Research**, v. 78, n. 12, p. 1773–1776, 1999.

KRAMPS, J. A. et al. Proteinase inhibitory activities of antileukoprotease are represented by its second COOH-terminal domain. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1038, n. 2, p. 178–185, 19 abr. 1990.

LEÓN-BAÑARES, R. et al. Transgenic microalgae as green cell-factories. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 45–52, 2004.

LI, Z. et al. An improved method for enhanced production and biological activity of human secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in *Pichia pastoris*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 402, n. 3, p. 519–524, 2010.

LILO, E. et al. Characterization of human sporadic ALS biomarkers in the familial ALS transgenic mSOD1g93a mouse model. **Human Molecular Genetics**, v. 22, n. 23, p. 4720–4725, 2013.

LIU, Z. et al. Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

LÓPEZ-PAZ, C. et al. Identification of *Chlamydomonas reinhardtii* endogenous genic flanking sequences for improved transgene expression. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 92, n. 6, p. 1232, 1 dez. 2017.

LUMBRERAS, V.; STEVENS, D. R.; PURTON, S. Efficient foreign gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* mediated by an endogenous intron. **The Plant Journal**, v. 14, n. 4, p. 441–447, 1 maio 1998.

MA, J. K. C. et al. Plant-derived pharmaceuticals--the road forward. **Trends in plant science**, v. 10, n. 12, p. 580–585, dez. 2005.

MANUELL, A. L. et al. Robust expression of a bioactive mammalian protein in *Chlamydomonas chloroplast*. **Plant Biotechnology Journal**, v. 5, n. 3, p. 402–412, 2007.

MASUDA, K. I. et al. Efficient production of the C-terminal domain of secretory leukoprotease inhibitor as a thrombin-cleavable fusion protein in *Escherichia coli*. **Protein Engineering**, v. 9, n. 1, p. 101–106, 1996.

MAYFIELD, S. P.; FRANKLIN, S. E.; LERNER, R. A. Expression and assembly of a fully active antibody in algae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 2, p. 438–442, 2003.

MCNEELY, T. B. et al. Secretory Leukocyte Protease Inhibitor: A Human Saliva Protein Exhibiting Anti-Human Immunodeficiency Virus 1 Activity In Vitro. [s.d.].

MECKELEIN, B. et al. The location of inhibitory specificities in human mucus proteinase inhibitor (MPI): Separate expression of the cooh-terminal domain yields

an active inhibitor of three different proteinases. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 3, n. 3, p. 215–220, 1990.

MUNADZIROH, E. et al. Generation of a soluble and active recombinant human secretory leukocyte protease inhibitor. **Biotechnologia Aplicada**, v. 34, n. 2, p. 1271–1274, 2017.

NERNPERMISOOTH, N.; PROMPUNT, E.; KUMPHUNE, S. An in vitro endothelial cell protective effect of secretory leukocyte protease inhibitor against simulated ischaemia/reperfusion injury. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 14, n. 6, p. 5793–5800, 2017.

NUGTEREN, S.; SAMSOM, J. N. Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI) in mucosal tissues: Protects against inflammation, but promotes cancer. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 59, n. February, p. 22–35, 2021.

ODAKA, C. et al. Murine Macrophages Produce Secretory Leukocyte Protease Inhibitor During Clearance of Apoptotic Cells: Implications for Resolution of the Inflammatory Response. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 3, p. 1507–1514, 2003.

PILLAY, K. et al. Secretory Leukocyte Protease Inhibitor in Vaginal Fluids and Perinatal Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transmission. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 4, p. 653–656, 15 fev. 2001.

PROMPUNT, E. et al. The cardioprotective effects of secretory leukocyte protease inhibitor against myocardial ischemia/reperfusion injury. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 15, n. 6, p. 5231–5242, 2018a.

PROMPUNT, E. et al. The cardioprotective effects of secretory leukocyte protease inhibitor against myocardial ischemia/reperfusion injury. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 15, n. 6, p. 5231–5242, 2018b.

QUIST, D.; CHAPELA, I. H. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. **Nature**, v. 414, n. 6863, p. 541–543, 2001.

RASALA, B. A. et al. Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, n. 6, p. 719–733, 2010.

SALLENAVE, J. M. The role of secretory leukocyte proteinase inhibitor and elafin (elastase-specific inhibitor/skin-derived antileukoprotease) as alarm antiproteinases in inflammatory lung disease. **Respiratory Research**, v. 1, n. 2, p. 87–92, 2000.

SASSO, S. et al. The natural history of model organisms from molecular manipulation of domesticated *Chlamydomonas reinhardtii* to survival in nature. **eLife**, v. 7, 1 nov. 2018.

SCAIFE, M. A. et al. Establishing *Chlamydomonas reinhardtii* as an industrial biotechnology host. **Plant Journal**, v. 82, n. 3, p. 532–546, 1 maio 2015.

- SCHULZE, H. et al. Interactions between the megakaryocyte/platelet-specific β 1 tubulin and the secretory leukocyte protease inhibitor SLPI suggest a role for regulated proteolysis in platelet functions. **Blood**, v. 104, n. 13, p. 3949–3957, 2004.
- SEELY, R. J.; YOUNG, M. D. Large-Scale Refolding of Secretory Leukocyte Protease Inhibitor. p. 206–216, 1991.
- STETLER, G. L. et al. Secretion of Active, Full- and Half-Length Human Secretory Leukocyte Protease Inhibitor by *Saccharomyces Cerevisiae*. **Bio/Technology** **1989** **7:1**, v. 7, n. 1, p. 55–60, 1989.
- SUN, M. et al. Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 13, p. 1087–1092, 2003.
- TOMEE, J. F. C. et al. Secretory leukoprotease inhibitor: A native antimicrobial protein presenting a new therapeutic option? **Thorax**, v. 53, n. 2, p. 114–116, 1998.
- TRAN, M. et al. Production of unique immunotoxin cancer therapeutics in algal chloroplasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 1, 2013.
- VOGELMEIER, C. et al. Aerosolization of recombinant SLPI to augment antineutrophil elastase protection of pulmonary epithelium. <https://doi.org/10.1152/jappl.1990.69.5.1843>, v. 69, n. 5, p. 1843–1848, 1990.
- WAHL, S. M. et al. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in mucosal fluids inhibits HIV-1. **Oral Diseases**, v. 3, n. S1, p. S64–S69, 1 maio 1997.
- WANG, X. et al. Up-regulation of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in the brain after ischemic stroke: Adenoviral expression of SLPI protects brain from ischemic injury. **Molecular Pharmacology**, v. 64, n. 4, p. 833–840, 2003.
- WIEDOW, O. et al. Antileukoprotease in human skin: An antibiotic peptide constitutively produced by keratinocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 248, n. 3, p. 904–909, 1998.
- WITMAN, G. B. et al. The *Chlamydomonas* Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. **Science**, v. 318, n. 5848, p. 245–250, 2007.
- WOODHAM, A. W. et al. The S100A10 Subunit of the Annexin A2 Heterotetramer Facilitates L2-Mediated Human Papillomavirus Infection. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. 43519, 22 ago. 2012.
- YAGI, T. et al. Hydrogen photoproduction in green algae *Chlamydomonas reinhardtii* sustainable over 2 weeks with the original cell culture without supply of fresh cells nor exchange of the whole culture medium. **Journal of Plant Research**, v. 129, n. 4, p. 771–779, 2016.
- ZHANG, M. P.; WANG, M.; WANG, C. Nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*: A review. **Biochimie**, v. 181, p. 1–11, 1 fev. 2021.