

## **TETRAHYMENA: UNA PLATAFORMA BIOTECNOLÓGICA NOVEDOSA PARA LA PRODUCCIÓN DE INGREDIENTES ACTIVOS NATURALES, PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y DETECCIÓN DE TÓXICOS AMBIENTALES**

**Alejandro D. NUSBLAT, María L. SÁNCHEZ GRANEL, María G. MONTES, Nicolás G. CID & Clara B. NUDEL\***

Universidad de Buenos Aires. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Instituto de Nanobiotecnología (NANOBIOTEC). Facultad de Farmacia y Bioquímica, Junín, 956 (C1113AAD), Buenos Aires, Argentina.

\*E-mail:cnudel@ffyba.uba.ar

RESUMEN .....	16
SUMMARY .....	17
INTRODUCCIÓN .....	17
Producción de metabolitos bioactivos naturales: PUFA's, provitamina D3 y enzimas. ....	20
Producción de proteínas homólogas y heterólogas .....	22
Proteínas recombinantes de uso farmacéutico .....	23
Proteínas recombinantes para uso veterinario .....	24
Aplicaciones relacionadas con el medio ambiente y la biorremediación.....	25
Diseño de sistemas para el cultivo masivo y la expresión génica.....	25
CONCLUSIONES .....	26
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
Agradecimientos.....	31

### **RESUMEN**

*Tetrahymena* es el eucariota unicelular ciliado no patógeno más estudiado y empleado a nivel biotecnológico, pues combina la complejidad de procesos celulares típicos presentes en eucariotas con una gran facilidad de manipulación genética y de cultivo en todos los sistemas y escalas. *Tetrahymena* produce ingredientes activos naturales de interés, como los ácidos grasos poli-insaturados (PUFA's), la provitamina D<sub>3</sub> y numerosas enzimas (lipasas, diversas fosfolipasas, proteasas, glicosidasas) de aplicación médica y/o industrial. *Tetrahymena* se presenta como un huésped ideal para la expresión de proteínas recombinantes complejas, principalmente proteínas que requieren modificaciones post- traduccionales para su actividad, como la N-glicosilación, pues el ciliado realiza este procesamiento de modo eficaz y uniforme. También resulta de especial interés en la expresión de proteínas y péptidos con localización en membranas, por su correcto direccionamiento y anclaje, empleándose en el diseño de vacunas a subunidades, tanto humanas como veterinarias. *Tetrahymena* se emplea extensamente en sistemas de detección de tóxicos ambientales debido a su extrema sensibilidad, existiendo varios kits comerciales disponibles. El conocimiento genético-molecular y las herramientas de biología molecular disponibles, así como la experiencia en el escalamiento de los cultivos en biorreactores, permiten prever una intensificación de su uso, especialmente en la exploración de metabolitos de gran demanda, enzimas y medicinas novedosas.

**PALABRAS CLAVE:** Biotecnología, Nuevos desarrollos, *Tetrahymena*

## SUMMARY

### **TETRAHYMENA: A NOVEL BIOTECHNOLOGICAL PLATFORM FOR PRODUCTION OF NATURAL ACTIVE INGREDIENTS, RECOMBINANT PROTEINS AND THE DETECTION OF ENVIRONMENTAL TOXICS.**

*Tetrahymena* is the unicellular non-pathogenic ciliate most thoroughly studied and exploited at the biotech level, since it combines the typical complexity of cellular processes displayed in eukaryotes with easiness in genetic manipulation and straightforward culture systems at all scales. *Tetrahymena* produces natural active ingredients of interest, such as polyunsaturated fatty acids (PUFA's), provitamin D<sub>3</sub> and numerous enzymes (lipases, various phospholipases, proteases, glycosidases) of medical and/or industrial application. It is an ideal host for the expression of complex recombinant proteins, especially proteins that require post-translational modifications for their activity, such as N-glycosylation, since this is a process that the ciliate performs efficiently and uniformly. Moreover, *Tetrahymena* is of special interest for the expression of membrane proteins and peptides, due to the correct processing and anchoring of these proteins, being currently proposed for the design of human and veterinary vaccines, especially from the subunit type. Due to its sensitiveness *Tetrahymena* is widely used as a system for the detection of environmental toxics, and several commercial kits are already in the market. The extensive genetic knowledge and molecular biology tools available, as well as the experience in the scale-up of cultures in bioreactors, predict an intensification of its use, especially in the exploration of high-demand metabolites, novel enzymes and medicines.

KEY WORDS: Biotechnology, New developments, *Tetrahymena*

## INTRODUCCIÓN

Los microorganismos y las plantas han servido como fuentes primarias tradicionales para la selección de compuestos con actividades biológicas de utilidad en la alimentación, las industrias farmacéutica y química, la remediación del medio ambiente, el mejoramiento agrícola y la salud en general, tanto humana como animal. Los productos desarrollados a partir de estos descubrimientos incluyeron enzimas, vitaminas, solventes, biopolímeros, antibióticos, amino-ácidos, vacunas, fármacos y otras biomoléculas de gran importancia comercial. Su explotación permitió un conocimiento exhaustivo de microorganismos modelo, como *E. coli*, *S. cerevisiae*, *Aspergillus*, *Streptomyces*, y numerosas especies vegetales, aunque actualmente el potencial para el descubrimiento de nuevos compuestos y actividades biológicas en estos organismos se considera prácticamente agotado.

La exploración de nuevos hábitats y la introducción de técnicas moleculares multiplicaron el conocimiento y las posibilidades de utilización de una gran diversidad de sistemas biológicos. Dentro del grupo de organismos sub-explotados o ignorados en cuanto a su potencial biotecnológico se encuentran los protozoos (antigua denominación de los eucariotas unicelulares móviles y heterotróficos). Actualmente con más de 65 mil especies descritas, los protozoos se distribuyen en nuevos grupos taxonómicos del reino Eukarya, identificados por análisis filogenético, como ser el supergrupo SAR (Stramenopiles, Alveolados, Rhizaria), Amebozoa, Excavates como también, en menor medida, a los grupos, Opisthokontas y Archeplastides (Adlet *al.* 2007). Dentro de los SAR, los ciliados integran, conjuntamente con los Apicomplexa y Dinoflagelados, el subgrupo de los Alveolados (Fig. 1) que han sido hasta el presente uno de los más extensamente estudiados.

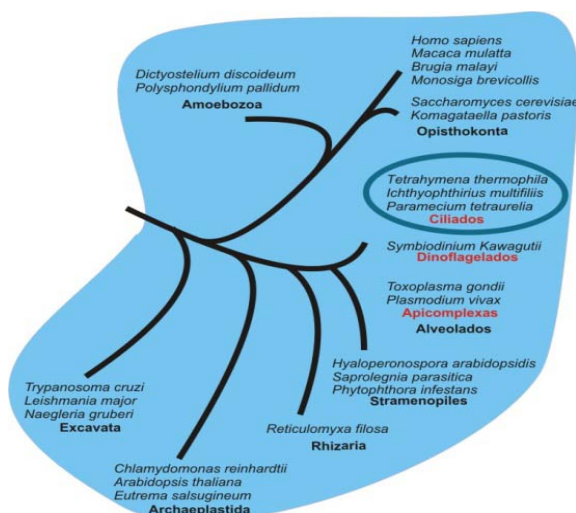


Figura 1: Filogenia del reino Eukarya. (Reproducido de Cid et al., 2017)

En particular los ciliados *Tetrahymena thermophila* y *Paramecium tetraurelia* han servido de modelo para el estudio de procesos celulares básicos de la biología estructural, celular, molecular y del desarrollo. En *Tetrahymena* se descubrieron los telómeros (Blackburn & Gall, 1978) y la telomerasa (Greider y Blackburn, 1985), la variabilidad en el código genético (Caron & Meyer, 1985), los procesos de corte y empalme del RNA (“splicing”) y el RNA catalítico (ribozimas) (Kruger et al, 1982; Mochizuki et al., 2002), la función de los motores de dineína (Gibbons & Rowe, 1965) la regulación de la transcripción por las histonas (Taverna et al., 2002), la regulación epigenética (Nowacki et al., 2008) y el rol de los RNA de bajo peso molecular en el re-arreglo y eliminación del DNA nuclear (Mochizuki & Gorovsky, 2004). Debido a su importancia en la biología, varios de estos descubrimientos han sido distinguidos con premios Nobel.

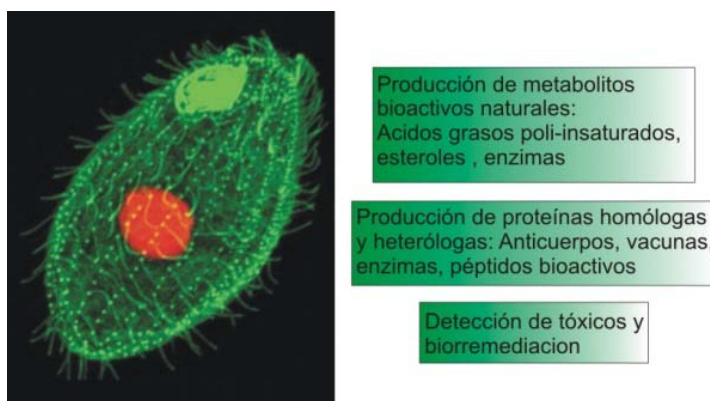
El interés biotecnológico en estos microorganismos radica en que, si bien se trata de organismos eucariotas unicelulares, exhiben una notable complejidad estructural y evolutiva que se caracteriza por tres particularidades: dimorfismo nuclear, presencia de cilias con organización en un citoesqueleto y la reproducción sexual por conjugación. Además presentan una gran diversidad ecológica y metabólica, habiéndose descrito más de 8000 especies, correspondientes a 3 sub-phyla y 14 clases. Ocupan diversos nichos ambientales, siendo en su mayoría acuáticos, de vida libre y no patógenos, aunque existen casos de endosimbiosis con bacterias del rumen (Finlay et al., 1994) y otros que sobreviven como parásitos obligados (Schuster & Visvesvara, 2004). Otro aspecto de suma importancia es la inocuidad de los ciliados para los seres humanos, pues no son infectados por virus humanos y carecen de endotoxinas y lipo-polisacáridos tóxicos, los cuales son frecuentes en bacterias.

El género más explorado hasta el presente, a nivel básico y biotecnológico, ha sido *Tetrahymena*, que presenta las siguientes ventajas para su uso industrial:

- Alcanza velocidades de crecimiento comparables a las de las levaduras, con tiempos de duplicación de 1,5 a 3 h, y altas densidades celulares ( $1-2 \times 10^7$  cel/mL).
- Puede cultivarse en diversos sistemas (placa, Erlenmeyer o biorreactores, de variada geometría) empleando técnicas de cultivo sumergido, con agitación y aireación, alimentación continua o discontinua, como también en cultivo continuo y con diversos métodos de perfusión, con o sin remoción de las células (Hartmann & Breitling, 2014).
- Los cultivos pueden escalarse con facilidad hasta los 1000 litros.

- Pueden emplearse medios de cultivo axénicos, de composición compleja o definida y bajo costo, sin requerimientos especiales.
- Soportan altas velocidades de agitación en biorreactores, pues la pared semi-rígida que rodea a las células les proporciona gran estabilidad a las fuerzas de corte.
- Presentan una gran flexibilidad en sus membranas, lo que favorece el tratamiento posterior de los cultivos y la extracción de productos intracelulares y su purificación.
- Las ciliias incrementan la superficie celular disponible para una mayor expresión de proteínas extracelulares y/o de membrana.
- Es fácilmente manipulable a nivel genético mediante técnicas de mutación y selección, y permite regular los ciclos de reproducción sexual y asexual en laboratorio mediante técnicas sencillas.
- Su genoma están totalmente secuenciado y existen variadas herramientas genético-moleculares para la generación de mutaciones, tanto en el macro como en el micronúcleo (Eisenet *al.*, 2006; Chalker, 2012).
- Están disponibles técnicas muy eficientes para noqueo y (sobre) expresión de genes homólogos y heterólogos, tanto por integración cromosómica como por medio de vectores episomales, así como para el silenciamiento de genes (RNAi) empleando RNA's de bajo peso molecular (25 -35 nucleotidos) (Shang *et al.*, 2002).

### Procesos biotecnológicos desarrollados en *Tetrahymena* (Fig. 2)



**Figura 2.** Una célula de *Tetrahymenathermophila* revelada por inmunofluorescencia resaltando el macronúcleo (rojo), las ciliias (verde oscuro) y el aparato oral (verde claro). A la derecha se detallan las aplicaciones biotecnológicas más importantes del ciliado.

Los procesos biotecnológicos desarrollados en especies del género *Tetrahymena* pueden clasificarse en:

- **Producción de metabolitos bioactivos naturales:** Involucra la producción de moléculas naturalmente presentes en el ciliado y las técnicas desarrolladas para incrementar su rendimiento. En esta categoría se destacan los procesos para la producción de ácidos grasos poli-insaturados (PUFA's), provitamina D3 y diversas enzimas extracelulares, empleando cepas salvajes, mutantes y/o recombinantes

- **Producción de proteínas homólogas y heterólogas:** Se refiere a la producción de biomoléculas recombinantes empleando *Tetrahymena* como huésped. En esta categoría se incluyen la producción de enzimas homólogas, como la Delta 6 desaturasa de ácidos grasos presente naturalmente en el ciliado, y la expresión de enzimas heterólogas, como la quitinasa de insectos y las enzimas humanizadas (DNAsaH, etc). También otros recombinantes como anticuerpos monoclonales para uso humano, antígenos vacunales de protozoos para empleo en diagnóstico y vacunas, de uso en humanos o animales, y los canales iónicos de alto voltaje, como blancos terapéuticos en la búsqueda de nuevas drogas (“drugtarget”).
- **Aplicaciones relacionadas con el medio ambiente y la biorremediación:** Son procesos en los que se emplea *Tetrahymena* como sensor de contaminación ambiental o en el tratamiento de suelos y ambientes contaminados.
- **Diseño de sistemas para el cultivo masivo y la expresión génica.** En esta categoría se incluyen las mejoras introducidas para aumentar la productividad, tanto en lo que concierne a la ingeniería y bioquímica de los sistemas como al desarrollo de herramientas moleculares.

•

### **Producción de metabolitos bioactivos naturales: PUFA's, provitamina D3 y enzimas.**

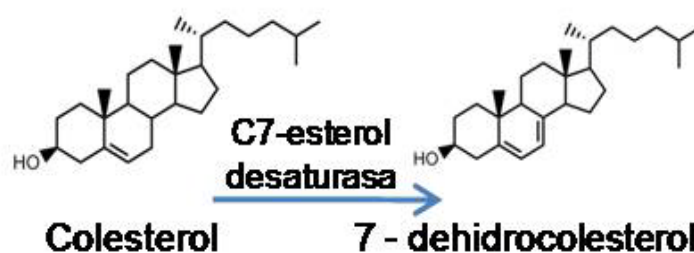
Los ácidos grasos poli-insaturados (PUFA's) tienen un rol vital en el mantenimiento estructural de las membranas celulares de todos los seres vivos. También son intermediarios biosintéticos de otras moléculas activas de interés farmacéutico como los eicosanoides, incluyendo prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, y ciertos hidroxiácidos precursores de los leucotrienos, todos ellos mediadores de importantes procesos biológicos tales como fiebre, inflamación, presión sanguínea y neurotransmisión. Los ciliados, y en particular *Tetrahymena*, constituyen una fuente abundante de PUFA's, en especial del ácido gama linolénico (GLA, *cis*-6,9,12-octadecatrienoico) que es el intermediario fisiológico más requerido, debido a la baja actividad Delta 6 desaturasa en tejidos animales. La producción actual de GLA se realiza por extracción de especies vegetales silvestres y organismos marinos, con las consiguientes limitaciones debido a las necesidades crecientes en la suplementación de alimentos, el aumento de la población mundial y el agotamiento de los recursos naturales.

Procesos fermentativos llevados a cabo con *Tetrahymena* han demostrado la factibilidad de la producción de PUFA's y en particular de GLA, con implicancias no solo en la nutrición humana/animal sino también en el sector farmacéutico. Existen varios procesos industriales desarrollados en *Tetrahymena* para la producción masiva de GLA, incluyendo el empleo de recombinantes para la sobre-expresión de la enzima Delta 6 desaturasa a fin de incrementar la relación ácidos grasos insaturados/saturados presente en el ciliado (2:1) y en particular del GLA, que, con estas técnicas, se incrementa desde el 24 al 32% del total de ácidos grasos insaturados producidos (van Putten et al, 2006; Rusing et al, 2006).

Otro metabolito de interés producido en *Tetrahymena* es la pro-vitamina D<sub>3</sub>. En animales, la pro-vitamina D<sub>3</sub> es solo un intermediario menor de la síntesis del colesterol que se transforma en su forma activa (la vitamina D<sub>3</sub>) en la piel, por irradiación. Está en discusión si la cantidad de pro-vitamina D<sub>3</sub> sintetizada en piel es suficiente para las importantes funciones que desempeña (Chun *et al.*, 2008), particularmente en la actualidad, donde se recomienda limitar la exposición a los rayos solares, para evitar el desarrollo de melanomas y otras afecciones de la piel. Por otra parte, el aporte de vitamina D<sub>3</sub> de los alimentos tampoco es suficiente, dadas las deficiencias de la dieta occidental y la recomendación del empleo de productos desnatados, con la consiguiente eliminación indeseable de las vitaminas liposolubles. En consecuencia, todos

los estudios epidemiológicos realizados recientemente han establecido una tendencia mundial a la insuficiencia nutricional de vitamina D<sub>3</sub> y la necesidad de suplementar alimentos comerciales con la misma (Mithalet *al.*, 2009; Kuchuket *al.*, 2009). En América del Norte y Europa, la vitamina D<sub>3</sub> es suplementada en la leche, quesos y algunos alimentos elaborados. En nuestro país solo algunas empresas suplementan determinadas presentaciones de leche entera y descremada. Aun así, el mercado local consume unos 28000 kilogramos anuales, con diverso grado de purificación, lo que significa un mercado considerable y que se nutre exclusivamente de la importación.

A partir de colesterol exógeno suministrado en el medio de cultivo, *Tetrahymena* es capaz de desaturar la molécula en la posición 7(8) y así acumular el derivado 5,7 insaturado, que es la provitamina D<sub>3</sub> (Fig. 3). En nuestro laboratorio se han diseñado procesos que permitirían disminuir selectivamente el colesterol en alimentos (leche, huevo) enriqueciéndolos en provitamina D<sub>3</sub>, como una mejora significativa respecto de los productos desnatados actuales, que eliminan todos los lípidos presentes. El proceso ha sido evaluado a nivel industrial para la disminución del colesterol de los alimentos y para la producción directa de pro-vitamina D<sub>3</sub> (Valcarceet *al.*, 2001, 2002). El sistema enzimático responsable ha sido identificado (Najleet *al.*, 2013) y se ha evaluado su funcionalidad en otros huéspedes (PoklepovichCarideet *al.*, 2015).



**Figura 3.** Transformación de colesterol (y fitoesteroles) en pro-vitamina D<sub>3</sub> por *Tetrahymena*.

Además de las enzimas que modifican esteroides, *Tetrahymena* ha sido intensamente investigada para la producción de enzimas lisosomales endógenas, particularmente las hidrolasas extracelulares que incluyen lipasas, (cistein) proteasas, glicosidasas y fosfolipasas (Bannoet *al.*, 1982; Blum, 1976; Muller, 1972). El medio de cultivo para la producción de estas enzimas puede ser formulado con componentes simples y económicos (ej. leche descremada + extracto de levadura) alcanzándose altas densidades de biomasa, incluso en cultivo continuo. Una ventaja es que las enzimas se secretan al medio y pueden separarse fácilmente en el sobrenadante de cultivo, que sólo contiene el producto de interés, sin células ni componentes intracelulares, pudiendo separarse en forma continua del fermentador. Mediante un módulo de perfusión, con el aporte continuo de un medio de cultivo simple y económico y la extracción del sobrenadante, las células y el proceso productivo puede mantenerse por periodos prolongados, de modo que es posible purificar las enzimas fácilmente en pocos pasos cromatográficos (Kiyet *al.*, 1996b).

Entre las enzimas que pueden producirse con esta metodología se destacan las glicosidasas, especialmente la manosidasa que puede emplearse para la síntesis estereo-específica de diversos glicanos (Alam *et al.*, 1996; Kiyet *al.*, 1996a; Stacey *et al.*, 2013). También resulta de interés la fosfolipasa A1 (Gubermanet *al.*, 1999; Hartmann *et al.*, 2006) ya que no existe en abundancia de otras fuentes y se emplea en forma creciente en la elaboración de reactivos para diagnóstico.

Las enzimas aisladas en *Tetrahymena* de importancia para su explotación comercial y los títulos aproximados obtenidos en bioreactores de 2 L son: fosfatasa ácida (1000 UI), beta-hexosaminidasa (500 UI) y alfa-glucosidasa (Bannoet *al.*, 1987); beta-glucosidasa, alfa-manosidasa, beta-galactosidasa, , alfa-amilasa(20 UI) y alfa-galactosidasa (Muller, 1972; Kiyet *al.*, 1996<sup>a</sup>. 1996<sup>b</sup>; Stacey *et al.*, 2013), lipasa (ácida) (164 UI) (Guberman *et al.*, 1999), fosfolipasa A1(10UI) (Hartmann *et al.*, 2006; Arai *et al.*, 1986; Hartmann *et al.*, 2000), fosfolipasa C (Arai *et al.*, 1986; Alam *et al.*, 1993), ribonucleasa (Lazarus & Scherbaum, 1968), proteasas (800 UI) (Bannoet *al.*, 1987), fosfolipasa D (Kovacs *et al.*, 1997), L-asparaginasa (Kyriakidis *et al.*, 1990), telomerasa (Greider & Blackburn 1987), Di-isopropil-fluor-fosfatasa (Landis *et al.*, 1986), fosfodiesterasa (Evagorouet *al.*, 2010).

También se han introducido formulaciones de algunas de estas enzimas para el tratamiento de desórdenes gástricos y pancreáticos, en productos que están ya en fase de comercialización con la marca CELANESE (Cilian AG). (Hartmann, 2008; Hartmann & Wolf, 2004).

Otra aplicación de enzimas de *Tetrahymena* es la bioconversión del dinitrato de isosorbide (ISDN) a 5-mononitrato de isosorbide (5-ISMN) y 2 mononitrato de isosorbide (2-ISMN), un proceso que puede realizarse en una única etapa con un rendimiento del 80% y en 72 h (Ropenga *et al.*, 1987). El 5-ISMN es extensamente utilizado en el tratamiento de la angina de pecho y en la actualidad se obtiene por síntesis química con bajo rendimiento.

### Producción de proteínas homólogas y heterólogas

El clonado y la expresión de un gen homólogo con el fin de aumentar el dosaje genético, y con ello la producción de una enzima clave, fue una estrategia exitosa que se aplicó para incrementar el índice de ácidos grasos 6- insaturados en la producción general de PUFA's, y dio origen a varios desarrollos de interés industrial (Rusing *et al.*, 2006; van Putten *et al.*, 2009).

Por otra parte, existen numerosas ventajas que hacen de *Tetrahymena* un huésped ideal para la expresión de proteínas recombinantes complejas, principalmente proteínas que requieren modificaciones post- traduccionales que los sistemas bacterianos son incapaces de realizar y que las levaduras realizan con frecuencia de modo ineficiente (ej. extensa glicosilacion). Dichas modificaciones, incluyendo N-glicosilaciones, O-glicosilaciones y la formación correcta de puentes disulfuro, resultan importantes para la actividad biológica de numerosas proteínas pues influyen en su transporte, solubilidad y estabilidad (resistencia a proteasas). En el caso de las proteínas recombinantes de uso medicinal, la N-glicosilación influencia además las propiedades farmacocinéticas, la inmunogenicidad y la biodisponibilidad de las proteínas expresadas (Solá & Griebenow, 2009, 2010).

Diversas enzimas humanizadas, anticuerpos monoclonales y antígenos, con estructura de glicoproteínas, pueden producirse más rápidamente, en forma segura y con mayor rendimiento que en líneas celulares animales, provistos además de una alta especificidad debida a la escasa heterogeneidad y con una conformación adecuada, atribuible a su correcta expresión (Bockau, 2006; Aldage *et al.*, 2011).

La estructura de los N-glicanos, determinada en enzimas endógenas naturalmente secretadas por *Tetrahymena*, como la fosfatasa ácida y la alfa-glucosidasa, es de tipo Man<sub>2-5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-proteína, con escasa heterogeneidad (Taniguchi *et al.*, 1985; Becker & Rusing, 2003); en consecuencia, los N-glicanos de proteínas secretadas por *Tetrahymena* son relativamente homogéneos, comparados con los N-glicanos de insectos o animales. Por otra parte, la hiper-glicosilación, frecuente en levaduras, o la incorporación de azúcares ramificados, típica de plantas e insectos, no ha sido reportada en *Tetrahymena*, con lo cual es posible prever que se minimizaran posibles efectos inmunogénicos adversos.

En cuanto a la factibilidad de utilizar *Tetrahymena* para la expresión de proteínas de membrana, esta propiedad está determinada por una correcta inserción de los dominios, lo cual también es parcialmente consecuencia del ensamblaje correcto de las (glico)proteínas formadas. Un ejemplo de proteínas de membrana correctamente expresadas en *Tetrahymena* son las proteínas ancladas por un puente glicosil-fosfatidil-inositol (GPI). Estas proteínas se encuentran en todas las células eucariotas, desde protozoarios hasta mamíferos, y se caracterizan por su anclaje a la membrana externa mediante la unión de su carboxilo terminal con el fosfatidilinositol del GPI, localizado en la membrana. La naturaleza anfifílica del anclaje GPI, su compatibilidad con la función del resto de la proteína unida y la capacidad de las proteínas ancladas a GPI para la inserción espontánea y la transferencia entre membranas artificiales les otorga un gran potencial biotecnológico (Müller, 2011).

Otra ventaja no menor en la utilización de *Tetrahymena* como huésped para la expresión de proteínas de interés farmacéutico es su carácter no desmentido de GRAS y su cultivo en medios definidos, con lo cual se elimina la posibilidad de vehicular virus patógenos para mamíferos en el medio de cultivo.

### Proteínas recombinantes de uso farmacéutico

Entre las proteínas recombinantes de uso farmacéutico producidas exitosamente en *Tetrahymena* se destacan una DNasaH (humana), los antígenos vacunales contra la malaria y el virus influenza, ciertos péptidos inhibidores de canales iónicos y anticuerpos monoclonales.

La DNasaH es una glicoproteína de 29.3 kDa con dos sitios de N-glicosilación y dos sitios de unión a calcio, que requiere además la formación de puentes disulfuro intracatenarios indispensables para su actividad biológica (Napirei et al., 2004). La enzima es producida en forma comercial en células CHO (Pulmozyme<sup>®</sup>, Roche) para su administración por inhalación en pacientes con fibrosis quística, con el objeto de reducir la viscosidad de las secreciones y así mejorar el funcionamiento pulmonar. En la estrategia de producción empleando *Tetrahymena*, el gen sintético de la DNasaH, optimizado al código y frecuencia de uso de codones del ciliado, se expresa y la proteína se secreta al medio de cultivo. Los casetes de expresión emplean parte del gen precursor de la fosfolipasa A1 (el fragmento 5' que garantiza la señal de exportación, PLA1) unido a la forma madura de la DNasaH que se clona en un vector de expresión de *Tetrahymena* (pH4T2) portador de un origen correspondiente a un RNA ribosomal y resistencia a neomicina (neoR) (Weide et al., 2006). Tanto el gen neoR como la construcción híbrida PLA1-DNasa H(sintética) están bajo

control de un promotor de histona **H4-1** y el terminador de beta tubulina 2 **BTU2**. Las células de *Tetrahymena* en estadio de conjugación se transforman por electroporación con el plásmido y se seleccionan por resistencia a paromomicina (Shang et al., 2002; Gaertig et al., 1994, Gaertig & Gorovsky, 1995). La DNasaH recombinante secretada por *Tetrahymena* está correctamente glicosilada y es probadamente activa. Esta estrategia de expresión ha sido aplicada también, con ligeras variantes, a otras proteínas heterólogas expresadas en *Tetrahymena*, por ejemplo, en la producción de la vacuna a subunidades contra la malaria. Los antígenos candidatos, aislados del parásito *Plasmodium falciparum*, se clonaron y expresaron exitosamente en *Tetrahymena*, en gran parte debido a ciertas similitudes entre ambos protozoos, como ser: el número y tipo de secuencias repetitivas, la similar longitud de los ORF's, los complejos puentes disulfuro requeridos y el alto contenido de AT del ADN del parásito. Para la vacuna sintética se emplearon las regiones N y C terminales de la proteína-1 de la superficie del merozoíto (MSP-1) ensambladas in vitro y se expresó el fragmento quimera en *T. thermophila*. La proteína expresada se secreta al medio de cultivo y se purifica por afinidad con un anticuerpo monoclonal (Cowan et al, 2014; Draper et al, 2015, Peterson et al., 2002).



Otra vacuna a subunidades que se produjo exitosamente en *Tetrahymena* es la vacuna contra el virus influenza, expresando la hemaglutinina viral (H1N1), una glicoproteína presente en la superficie de los virus de la familia Orthomyxoviridae y recomendada como candidato vacunal. El desarrollo clínico de la vacuna está en manos de un consorcio internacional formado por un conjunto de empresas incluyendo Cilian y Lonza, integradas en PROINNOVERA GmbH para el desarrollo de CiFlu®, (Hartmann *et al.*, 2009; Sachse, 2006; Jayaramet *al.*, 2010).

Los anticuerpos terapéuticos se producen mayormente en líneas celulares de mamíferos siendo las más utilizadas las células de mieloma murino NS0, las humanas PER.C6® comerciales y las células de ovario de hámster (CHO). Un ejemplo de los permanentes desarrollos y mejoras que se introducen en el campo de estas proteínas terapéuticas se ejemplifican con los avances experimentados en la producción del anticuerpo monoclonal Rituximab, un anti-CD20 desarrollado inicialmente en células CHO en los años 1990. Ensayos recientes indicaron que la producción en *Tetrahymena* permite la síntesis de un anticuerpo con idéntica especificidad pero mayor citotoxicidad contra las células tumorales debido a las características particulares de la N-glicosilación en el ciliado (Calow *et al.*, 2016; Collins, 2011; Colussi & Taron, 2011). Los análisis cromatográficos y la espectrometría de masa de las glicoproteínas revelaron que se trataría de glicanos sencillos de tipo oligomanosa, carentes de fucosa, que, si bien presentan estructuras isoméricas distintas de las humanas, muestran un estilo de ramificación similar al observado en sus contrapartes humanas. El análisis cristalográfico reveló también la similitud de los complejos azúcares-proteínas formados por *Tetrahymena* con una estructura similar a la glicosilación humana, sugiriéndose por ello que los sistemas de expresión basados en ciliados podrían ofrecer una ruta para la producción en gran escala de anticuerpos monoclonales con superiores actividades que los actuales.

Un desarrollo reciente realizado en *Tetrahymena* ha sido el diseño de una plataforma para la expresión de canales iónicos de membrana para la posterior utilización en la detección de posibles inhibidores. Los inhibidores (algunos con la estructura de anticuerpos monoclonales) se insertan en la membrana y corrigen sus propiedades electro-fisiológicas, modificando su funcionamiento aberrante, que es responsable de un conjunto de desórdenes conocidos como “canalopatías” las cuales incluyen distorsiones de la excitabilidad neuronal (dolor, epilepsia), cardíaca (arritmias) y de la contracción muscular (parálisis) (Hogg *et al.*, 2006; Colusi *et al.*, 2015a). La plataforma de expresión en alta densidad de canales iónicos ha sido desarrollada en *Tetrahymena*, gracias a la capacidad de este ciliado de sobre-expresar de forma activa y abundante estas complejas proteínas de membrana, por la compañía biotecnológica Tetragenetics, quien, como primer logro, presentó un nuevo anticuerpo diseñado contra una enfermedad autoinmune, actualmente en fase preclínica, y también una nueva molécula con efecto analgésico (Colussiet *al.*, 2015b).

### **Proteínas recombinantes para uso veterinario**

Las proteínas ancladas por enlace GPI están presentes abundantemente en las membranas de células eucariotas y se destacan por su antigenicidad, por lo que frecuentemente se seleccionan para el diseño de candidatos vacunales. Numerosos estudios muestran la capacidad de *T. thermophila* de expresar y procesar correctamente proteínas del tipo GPI, con lo cual los antígenos aparecen correctamente plegados y presentados al sistema inmune en sus conformaciones nativas, anclados a la superficie celular, desde donde pueden ser fácilmente extraídos y purificados (Muller, 2011; Clark *et al.*, 2001).

Entre las proteínas GPI desarrolladas como candidatos vacunales contra protozoos parásitos se destaca la ya mencionada proteína MSP-1 de *Plasmodium falciparum* (causante de la malaria maligna en humanos pero también en aves, roedores, etc.) (Gilson *et al.*, 2006) y los i-antígenos de *Ichthyophthirius multifiliis* y *Philasterides dicentrarchi* (causantes de enfermedades en peces) (Xuting & Dickerson, 2002; Gaertig *et al.*, 1999; Leiro Vidal, *et al.* 2008). Un aporte en esta dirección se llevó a cabo recientemente en nuestro laboratorio, donde se obtuvo la expresión heteróloga en *T. thermophila* de los antígenos de superficie GP60 de *Cryptosporidium parvum* (Elguero *et al.*, 2015; Cevallos *et al.*, 2000) y otros de *Babesia bovis*, enfermedad endémica de la Argentina y países vecinos (Montes *et al.*, 2015; Rodríguez *et al.*, 2014), los cuales se encuentran actualmente en fase de caracterización molecular.

### Aplicaciones relacionadas con el medio ambiente y la biorremediación

Las aplicaciones del ciliado *Tetrahymena* en procesos relacionados con el medio ambiente involucran fundamentalmente el ensayo y detección de contaminantes y tóxicos. Sin embargo, teniendo en cuenta que los ciliados participan y residen en diversos ecosistemas acuáticos, tanto de aguas dulces como saladas, incluyendo aguas residuales y plantas de tratamiento de efluentes y residuos, resulta importante conocer las capacidades metabólicas que les permiten sobrevivir en dichos nichos y transformarlos, y en tal sentido es importante la diversidad biológica y metabólica que presentan, plasmada en los numerosos grupos taxonómicos presentes (Fig.1). Esta versatilidad metabólica resulta muy útil en el tratamiento de residuos industriales, en general de composición muy variada. Por ejemplo, en la industria pesquera se emplean a nivel industrial plantas de tratamiento en la que intervienen diversos ciliados en comunidad con otros microorganismos, en procesos desarrollados en biorreactores y que incluyen varias etapas hasta obtener la degradación final de los residuos (Doi, 2016; Jeon *et al.*, 1999; Landis *et al.*, 1987). También existen resultados promisorios que revelan que *Tetrahymena* y otros ciliados pueden emplearse en la biorremediación de efluentes contaminados con metales, dada su capacidad de resistencia, tolerancia, metabolización y detoxificación (Gutiérrez *et al.*, 2015).

Por otra parte, *Tetrahymena* es empleada como bioindicador de toxicidad debido a su gran sensibilidad para la detección de compuestos recalcitrantes y xenobióticos, tales como aldehídos, fenoles, nitrobenzono, narcóticos, ácidos, metales pesados, nanopartículas de ZnO y CuO y pesticidas (Lynn & Gilron, 1992; Bowers *et al.*, 1997). Los ensayos disponibles en la actualidad (PROTOXKIT F, MICROBIOTESTS) se emplean para el análisis en efluentes, sedimentos, aguas superficiales y profundas, habiendo alcanzado un alto grado de aceptación, de estandarización y de correspondencia estructura-actividad (QSAR), contando además con bases de datos disponibles para más de 1500 compuestos (Protoxkit F; Schultz 1997; Cheng *et al.*, 2011). Los métodos de análisis en uso evalúan la inhibición del crecimiento de *T. thermophila* por un cierto tóxico, determinando por espectrofotometría la reducción en la incorporación de un nutriente y permitiendo, además, el cálculo de la EC50. Con algunas variantes, los tests se pueden emplear también en ensayos a campo para el análisis de la toxicidad en suelos (Wei *et al.* 2013; Amaro *et al.*, 2014; Gutiérrez *et al.*, 2015).

### Diseño de sistemas para el cultivo masivo y la expresión génica

Se dispone en la actualidad de medios de cultivo definidos y económicos que hacen posible el escalado de los cultivos hasta biorreactores agitados y aireados de 1500 L, así como los sistemas de perfusión, que permiten la separación del sobrenadante con el producto de interés, manteniendo la biomasa en el reactor (Kiy & Tiedke, 1992; Hartmann & Breitling, 2014). Los desarrollos de cepas modificadas y herramientas de biología molecular disponibles se encuentran abundantemente descritas (Collins, 2012; Ruehle *et al.*, 2016).

## CONCLUSIONES

*Tetrahymena* es un organismo con sus tres genomas, mitocondrial, macro y micronúcleo, totalmente secuenciados, donde solo un pequeño número de los genes están identificados, y de muy pocos se conoce su actividad biológica. En su mayoría, los genes tienen adjudicada solo una función putativa o son desconocidos, lo que ofrece un gran potencial para la búsqueda de nuevas actividades biológicas y biotecnológicas de interés. Por ejemplo, algunos procesos novedosos descritos en la literatura que podrían tener aplicación en el futuro próximo (“pipeline”) podrían ser:

- La producción de catecolaminas (noradrenalina y dopamina) en *Tetrahymena* mediante el agregado de un sistema de nanopartículas, pues se ha comprobado que el agregado de estas partículas estimula su producción en cantidades que justificarían su explotación industrial (Ud-Daula&Schramm, 2015).
- La producción del colorante púrpura denominado “tyrianpurple”, extraído de moluscos y muy apreciado en la industria textil desde tiempos antiguos, además con potencial actividad anticancerígena y antibacteriana. Existe una gran demanda insatisfecha de este colorante que podría suplirse expresando en *Tetrahymena* la arilsulfatasa, enzima clave de su síntesis, que no puede expresarse en mamíferos debido a su incompatibilidad, pero puede hacerse en moluscos y ciliados. Más aun, se han identificado genes ortólogos en *Tetrahymena* que podrían expresarse, correctamente traducidos a los códigos y señales del huésped original, sustentado en consideraciones evolutivas (los ciliados parasitan a los moluscos en varios de sus tejidos y glándulas, por lo cual es posible el intercambio de genes) (Laffy 2011; Laffy et al., 2013). Las arilsulfatasas (A,B,C) son enzimas lisosomales hidrolíticas que actúan sobre esteroides, glucosaminglucano-sulfatos, cerebrosidios (galactosilceramidas), entre otros; participan en el procesamiento de muco-polisacáridos y compuestos sulfatados y se estima que algunas tienen un rol importante en enfermedades humanas poco caracterizadas (distrofias, etc) (Gieselmann et al., 1990).

En el caso de la producción de proteínas biofarmacéuticas (heterólogas) los sistemas de producción y expresión de proteínas basados en *Tetrahymena* ofrecen ventajas competitivas sustentadas en una mejor calidad de producto (eficacia) y una mayor economía, en comparación con las líneas celulares de mamíferos. Existen numerosas enzimas comerciales utilizadas en procesos industriales que presentan anclaje GPI tales como alfa-amilasas, aminopeptidasas de membrana, lipasas, nucleotidasas, hialuronidasas las cuales representan un blanco de aplicación en cuanto a su producción biotecnológica. Con respecto a las hialuronidasas, existen diferentes fuentes de esta enzima: la purificación a partir de testículos de animales (muy escasa), la obtención en células microbianas (*Bacillus sp*) (Guo et al., 2014) o como proteínas recombinantes en células de mamíferos, que es la forma aprobada por las autoridades sanitarias desde 2005, siendo en este caso Hylenex la única marca de PH20 humana reconocida. Dado que la productividad de PH20 producida es muy inferior a la requerida en el mercado, su obtención en *T. thermophila* sería una excelente estrategia a futuro, fundamentada en el alto nivel de expresión de proteínas con anclaje GPI en este huésped y su correcto procesamiento post-traducciona

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adl S.M., B.S. Leander, A.G. Simpson, J.M. Archibald, O.R. Anderson, D. Bass *et al.* Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists (2007) *Systematic Biology* **56**:684-9.
- Alam M-D.S, S. Nakashima, V. Deyashiki, Y. Banno, A. Kara & Y. Nozawa (1996) Molecular Cloning of a Gene Encoding Acid  $\alpha$ -Glucosidase from *Tetrahymena pyriformis*. *J. Euk. Microbiol.* **43**: 295–303.
- Alam S., Y. Banno & Y. Nozawa (1993) Purification and characterization of phospholipase C preferentially hydrolyzing phosphatidylcholine in *Tetrahymena* membranes. *J. Eukaryot. Microbiol.* **40**: 775–81.
- Aldag I., U. Bockau, J. Rossdorf, S. Laarmann, W. Raaben, L. Herrmann *et al.* Expression, secretion and surface display of a human alkaline phosphatase by the ciliate *Tetrahymena thermophila* (2011) *BMC Biotechnology* **11**:11.
- Amaro F., A.P. Turkewitz, A. Martin-Gonzalez & J. C. Gutiérrez (2014) Functional GFP-metallothionein fusion protein from *Tetrahymena thermophila*: A potential whole-cell biosensor for monitoring heavy metal pollution and a cell model to study metallothionein overproduction effects. *BioMetals* **27**: 195–205.
- Arai H., K. Inoue, K. Nishikawa, Y. Banno, Y. Nozawa & S. Nojima (1986) Properties of acid phospholipases in lysosome and extracellular medium of *Tetrahymena pyriformis*. *J. Biochem.* **99**:125–33.
- Banno Y., K. Yano & Y. Nozawa (1982) Biochemical characterization of secreted proteases during growth in *Tetrahymena pyriformis* WH-14: Comparison of extracellular with intracellular proteases. *J. Protozool.* **29**: 91–8.
- Banno Y., N. Sasaki & Y. Nozawa (1987) Secretion heterogeneity of lysosomal enzymes in *Tetrahymena pyriformis*. *Exp. Cell Research* **170**:259-68.
- Becker B. & M. Rusing (2003) Structure of N-glycosidic carbohydrates of secretory proteins of *Tetrahymena thermophila*. *J. Eukaryot Microbiol* **50**: 235-9.
- Blackburn E.H. & J.G. Gall (1978) A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J. Mol. Biol.* **120**: 33-53.
- Blum J.J. (1976) Lysosomal hydrolase secretion in *Tetrahymena*: a comparison of several intra-lysosomal enzymes with the isoenzymes released into the medium. *J. Cell. Physiol.* **89**: 457–72.
- Bockau, U. (2006) *Tetrahymena thermophila*: Ein neues Expressionssystem zur Produktion humaner Proteine. Tesis Doctoral.
- Bowers N., J.R. Pratt, D. Beeson & M. Lewis (1997) Comparative evaluation of soil toxicity using lettuce seeds and soil ciliates. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**:207–13.
- Calow J., A-J. Behrens, S. Mader, U. Bockau, W.B. Struwe, D.J. Harvey *et al.* Antibody production using a ciliate generates unusual antibody glycoforms displaying enhanced cell-killing activity (2016) *mABS* **8**:1498-511. Epub 2016 Sep 3
- Caron F. & E. Meyer (1985) Does *Paramecium primaurelia* use a different genetic code in its macronucleus? *Nature* **314**: 185–8.
- Cevallos, A. M., X. Zhang, M.K. Waldor, S. Jaison, X. Zhou, S. Tzipori *et al.* Molecular cloning and expression of a gene encoding *Cryptosporidium parvum* glycoproteins gp40 and gp15 (2000) *Infection and Immunity* **68**: 4108-16.
- Chalker D.L. (2012) *Transformation and strain engineering of Tetrahymena*, in: “*Tetrahymena Thermophila*”(K. Collins, ed) *Methods Cell Biol.* **109**:327-45.
- Cheng F., J. Shen, Y. Yu, W. Li, G. Liu, P.W. Lee *et al.* In silico prediction of *Tetrahymena pyriformis* toxicity for diverse industrial chemicals with substructure pattern recognition and machine learning methods (2011) *Chemosphere* **82**:1636–43.
- Chun R.F., J.S. Adams & M. Hewison (2008) Back to the future: a new look at 'old' vitamin D. *J. Endocrinol* **198**:261-9.
- Cid N.G., M.L. Sanchez Granel, M.G. Montes, M.E. Elguero, C.B. Nudel & A.D. Nusblat (2017) Phylogenomic analysis of integral diiron membrane histidine motif-containing enzymes in ciliates provides insights into their function and evolutionary relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **114**: 1-13.

- Clark T.G., Y. Gao, J. Gaertig, X. Wang & G. Cheng (2001) The I-antigens of *Ichthyophthirius multifiliis* are GPI anchored proteins. *J. Eukaryot. Microbiol.* **48**: 332–7.
- Collins K. (2011) Production of aglycosylated monoclonal antibodies in ciliates. Patente WO 2011/116387 A1, Ingresada 19 Marzo 2010; Expedida 22 Septiembre 2011.
- Collins K. (2012) “*Tetrahymena Thermophila*” (K. Collins ed) *Methods in Cell Biology* 109. ISBN: 978-0-12-385967-9.
- Colussi P. & C. Taron (2011) Production of glycoproteins in genetically modified ciliates. Solicitud de Patente USA WO2011119498 A1 (Tetragenetics INC).
- Colussi P., A. Papoyan, Y. Bisharyan, J. Bednenko & T.G. Clark (2015b) Expression of voltage-gated Ion Channels in Ciliates. Solicitud de Patente USA WO2015171643A2 (Tetragenetics INC)
- Colussi P., D. Cassidy-Hanley & T.G. Clark (2015a). Polypeptide expression in Ciliates. Solicitud de Patente USA US20150240248 A1 (Tetragenetics INC) Publicada 4 Marzo 2014
- Cowan G.J.M., U. Bockau, J.E. Muus, I. Aldag, K. Samuel, A.M. Creasey *et al* (2014) A novel vaccine candidate antigen expressed in *Tetrahymena thermophila*. *PLoS One* **9** (1): e87198. doi: 10.1371/journal.pone.0087198.
- Doi H. (2016) Treatment agent for salt-containing organic waste liquid, salt concentration-reducing agent and entrapment immobilization carrier. Patente USA US9440871B2. Publicada 13 setiembre 2016
- Draper S.J., E. Angov, T. Horii, L.H. Miller, P. Srinivasan, M. Theisen *et al*. Recent advances in recombinant protein-based malaria vaccines (2015) *Vaccine* **33**:7433-43. doi:10.1016/j.vaccine.2015.09.093
- Eisen J.A., R.S. Coyne, M. Wu, D. Wu, M. Thiagarajan, J.R. Wortman *et al* (2006) Macronuclear Genome Sequence of the Ciliate *Tetrahymena thermophila*, a Model Eukaryote. *PLoS Biol* **4**(9): e286. (<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040286>).
- Elguero M.E., M.G. Montes, C. Nudel, L. Schnittger & A.D. Nusblat (2015) GP60 from *Cryptosporidium parvum*: heterologous expression in *Tetrahymena thermophila* as a vaccine candidate. *BioCell* **39** (2).
- Evagorou A., D., Anagnostopoulos, E. Farmaki & A. Sifaka-Kapadai (2010) Hydrolysis of 2-arachidonoylglycerol in *Tetrahymena thermophila*. Identification and partial characterization of a monoacylglycerol lipase-like enzyme. *Eur. J. Protistol.* **46**: 289–97.
- Finlay B.J., G. Esteban, K.J. Clarke, A.G. Williams, T.M. Embley & R.P. Hirt (1994) Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiol. Lett.* **117**: 157–61
- Gaertig J., L. Gu, B. Hai & M.A. Gorovsky (1994) High frequency vector-mediated transformation and gene replacement in *Tetrahymena*. *Nucleic Acids Res.* **22**:5391–8.
- Gaertig J., Y. Gao, T. Tishgarten, T.G. Clark & H.W. Dickerson (1999) Surface display of a parasite antigen in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Nat. Biotechnol.* **17**: 462–5.
- Gaertig, J. & M.A. Gorovsky (1995) DNA-mediated transformation in *Tetrahymena*. *Methods Cell Biol.* **47**: 559–69.
- Gibbons I.R. & A.J. Rowe (1965) Dynein: A protein with adenosine triphosphatase activity from cilia. *Science* **149**: 424–6.
- Gieselmann V., A. Polten, J. Kreysing & K. von Figura (1990) Arylsulfatase A pseudodeficiency: loss of a polyadenylation signal and N-glycosylation site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 9436–40.
- Gilson P.R., T. Nebl, D. Vukcevic, R.L. Moritz, T. Sargeant, T.P. Speed *et al*. Identification and stoichiometry of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* (2006) *Molecular & Cellular Proteomics* **5**: 1286–99.
- Greider C.W. & E.H. Blackburn (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* **43**: 405–13.
- Greider C.W. & E.H. Blackburn (1987) The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* **51**: 887–98.
- Guberman A., M. Hartmann, A. Tiedtke, J. Florin-Christensen & M. Florin-Christensen (1999) A method for the preparation of *Tetrahymena thermophila* phospholipase A1 suitable for large-scale production. *J. Appl. Microbiol.* **86**: 236–30.
- Guo X., Y. Shi, J. Sheng & F. Wang (2014) A Novel Hyaluronidase Produced by *Bacillus* sp. A50. *PLoS ONE* **9**(4): e94156.
- Gutiérrez J.C., F. Amaro & A. Martín-González (2015) Heavy metal whole-cell biosensors using eukaryotic microorganisms: an updated critical review. *Front. Microbiol.* **6**, Article 48. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00048>

- Hartmann M. & N. Wolf (2004) DNA sequences of major secreted proteins from the ciliate *Tetrahymena* and use thereof (2003) Solicitud de Patente WO 2003078566 A2 (Cilian AG) Publicada 25 Setiembre 2003.
- Hartmann M. (2008) Medicaments containing enzymes from ciliates for promoting digestion in digestive disorders. Solicitud de Patente USA US20080292610A1 (Cilian AG)
- Hartmann M., M. Grenningloh & A. Tiedtke (2006) DNA sequence of the enzyme phospholipase A1 of ciliate *Tetrahymena*, and the use of the same. Patente USA 7045330B2 (Cilian AG) Publicada 16 Mayo 2006.
- Hartmann M.W.W. & R. Breitling (2014) “*Suspension Culture of Protozoan Organisms*”, in: “Industrial Scale Suspension for Culturing Living Cells” (H-P. Meyer & D. R. Schmidhalter, eds) Wiley Blackwell, pp. 295–346.
- Hartmann M.W.W., C. Sachse, J. Apelt & U. Bockau (2009) System for the heterologous expression of a viral protein in a ciliate host cell. Solicitud de Patente GB2471093. Ingresada 17 Junio 2009; Publicada 22 Diciembre 2010).
- Hartmann, M., A. Guberman, M. Florin-Christensen & A. Tiedtke (2000) Screening for and characterization of phospholipase A1 hypersecretory mutants of *Tetrahymena thermophila*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**: 390–6.
- Hogg D., P. Boden, G. Lawton & R. Kozlowski (2006) Ion channel drug targets-unlocking the potential. *DDW Drug Discovery World* **7(3)**, 83.
- Jayaram J., A. Papoyan, Y. Bisharyan, D. Cassidy-Hanley, X. Zhang, P. Colussiet al. (2010) An alternative platform for rapid production of effective subunit vaccines *BioPharm International*, 6-13.
- Jeong, H.J., J.H. Shim, C.W. Lee, J.S. Kim & S.M. Koh (1999) Growth and grazing rates of the marine planktonic ciliate *Strombidinopsis* sp. on red-tide and toxic Dinoflagellates. *J. Eukaryot. Microbiol.* **46**:69–76.
- Kiy T. & A. Tiedtke (1992) Continuous high-cell-density fermentation of the ciliated protozoon *Tetrahymena* in a perfused bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**:141–6.
- Kiy T., B. Hörsch & R. Marquardt (1996b) Process for the preparation of glycosides using glycosidases from ciliates. Patente Europea EP0725144 A1 (Hoechst AG). Publicada 7 Agosto 1996.
- Kiy T., G. Scheidgen-Kleyboldt & A. Tiedtke (1996a) Production of lysosomal enzymes by continuous high-cell-density fermentation of the ciliated protozoon *Tetrahymena thermophila* in a perfused bioreactor. *Enzyme Microb. Technol.* **18**: 268–74.
- Kovacs P., G. Csaba, S. Nakashima & Y. Nozawa (1997) Phospholipase D activity in the *Tetrahymena pyriformis* GL. *Cell Biochem. Funct.* **15**: 53–60.
- Kruger K., P.J. Grabowski, A.J. Zaug, J. Sands, D.E. Gottschling & T.R. Cech (1982) Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* **31**: 147-57.
- Kuchuk N.O., N.M. van Schoor, S.M. Pluijm, A. Chines & P. Lips (2009) Vitamin D status, parathyroid function, bone turnover, and BMD in postmenopausal women with osteoporosis: global perspective. *J Bone Miner Res* **24**:693–701.
- Kyriakidis D.A., S.A. Tsirka, I.K. Tsavdaritis, S.N. Iliadis & A.H. Kortsaris (1990) Antiproliferative activity of L-asparaginase of *T. pyriformis* on human breast cancer lines. *Mol. Cell. Biochem.* **96**: 137-42.
- Laffy P. (2011) Evolution, gene expression and enzymatic production of Tyrian purple: A molecular study of the Australian muricid *Dicathaisorbita* (Neogastropoda: Muricidae) Tesis de doctorado Universidad de Flinders, Australia.
- Laffy P.W., K. Benkendorff & C.A. Abbott (2013) Suppressive subtractive hybridisation transcriptomics provides a novel insight into the functional role of the hypobranchial gland in a marine mollusc. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D* **8**: 111-22.
- Landis W., D. Haley, M. Haley, D. Johnson, H. Durst & R. Savage (1987) Discovery of multiple organofluorophosphate hydrolyzing activities in the protozoan *Tetrahymena thermophila*. *J. Appl. Toxicol.* **7**: 35–41.
- Landis W.G., M.V. Haley & D.W. Johnson (1986) Kinetics of the DFPase activity in *Tetrahymena thermophila*. *J. Protozool.* **33**: 216–8.
- Lazarus L.H. & O.H. Scherbaum (1968) Activity of ribonuclease, acid phosphatase, and phosphodiesterase in *Tetrahymena pyriformis* during growth. *J. Cell Biol.* **36**: 415–8.
- Leiro Vidal J.M., M.L. Sanmartin Duran, J. Lamas Fernandez, J.L. Barja Perez, M. Vazquez Ruiz de Ocenda & S. Cabaleiro Martinez (2008) Method for the preparation of a Scuticociliatosis vaccine for farmed marine fish. WIPO Solicitud de Patente WO/2008/084125 A2 (Univ. Santiago de Compostela).
- Lynn D.H. & G.L. Gilron (1992) A brief review of approaches using ciliated protists to assess aquatic ecosystem health. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recover* (Formerly *J. Aquat. Ecosyst. Heal.* **1**:263–70).

- Mithal A., D.A. Wahl, J.P. Bonjour, P. Burckhardt, B. Dawson-Hughes, J.A. Eisman et al (2009) IOF Committee of Scientific Advisors (CSA) Nutrition Working Group. *OsteoporosInt***20**:1807–20.
- Mochizuki K. & M.A. Gorovsky (2004) Conjugation-specific small RNAs in *Tetrahymena* have predicted properties of scan (scn) RNAs involved in genome rearrangement. *Genes & Dev.***18**:2068-73.
- Mochizuki K., N.A. Fine, T. Fujisawa & M.A. Gorovsky (2002) Analysis of a piwi-related gene implicates small RNAs in genome rearrangement in *Tetrahymena*. *Cell***110**: 689-99.
- Montes M.G., M.E. Elguero, B.C. Nudel, M. Jacobsen, L. Schnittger & A.D. Nusblat (2015) Heterologous expression of BavesiaBovis vaccine candidate MSA-2C in *Tetrahymena thermophila*. *BIOCELL***39** (2).
- Müller G. (2011) Novel applications for glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in pharmaceutical and industrial biotechnology. *Molecular Membrane Biology***28**: 187-205.
- Muller M. (1972) Secretion of acid hydrolases and its intracellular source in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Cell Biol.***52**: 478–87.
- Najle S.R., A.D. Nusblat, C.B. Nudel & A.D. Uttaro (2013) The sterol-C7 desaturase from the ciliate *Tetrahymena thermophila* is a Rieske oxygenase which is highly conserved in animals. *Mol. Biol. Evol***30**: 1630-43.
- Napirei M., A. Ricken, D. Eulitz, H. Knoop & H. G. Mannherz (2004) Expression pattern of the deoxyribonuclease 1 gene: lessons from the Dnase1 knockout mouse. *Biochem J.* **380**: 929–37.
- Nowacki M., V. Vijayan, Y. Zhou, K. Schotanus, T.G. Doak & L. F. Landweber (2008) RNA-mediated epigenetic programming of a genome-rearrangement pathway. *Nature***451**:153–8.
- Peterson D.S., Y. Gao, K. Asokan & J. Gaertig (2002) The circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* is expressed and localized to the cell surface in the free-living ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Biochem. Parasitol.***122**:119–26.
- PoklepovichCaride T., N. Urtasun, M.V. Miranda, A.D. Nusblat & C.B. Nudel (2015) Expression and functional characterization of a C-7 cholesterol desaturase from *Tetrahymena thermophila* in an insect cell line. *Steroids***96**: 132–9.
- Protoxkit F. Freshwater toxicity test with a ciliate protozoan (1998) Stand. Oper. Proced. Creasel, Deinze, Belgium 18.
- Rodriguez A. E., M. Florin-Christensen, D.A. Flores, I. Echaide, C.E. Suarez & L. Schnittger (2014) The glycosylphosphatidylinositol-anchored protein repertoire of *Babesia bovis* and its significance for erythrocyte invasion. *Ticks and tick-borne diseases***5**: 343-8
- Ropenga JS & M. Lenfant (1987) Bioconversion of isosorbide dinitrate into isosorbide mononitrate by the protozoan *Tetrahymena thermophila*: relationship to glutathione transferase levels. *Appl. Microbiol. Biotechnol***26**:117–9.
- Ruehle M.D., E. Orias & C.G. Pearson (2016) *Tetrahymena* as a unicellular model eukaryote: Genetic and genomic tools. *Genetics***203**: 649–65.
- Rusing M., T. Kiy & A. Dominitzki. (2006) Nucleic acid which is obtained from *Tetrahymena* and which codes for a delta-6-desaturase, the production thereof and use. Patente USA US7,135,623 B1 (Nutrinova GMBH) Publicada 14 Noviembre 2006.
- Sachse C. (2006) *Tetrahymena thermophila*: An expression platform for the production of viral antigens. Tesis de Doctorado, Bergische Universität Wuppertal, Wuppertal, Germany.
- Schultz T.W. (1997) Tetratox: *Tetrahymena pyriformis* population growth impairment endpoint: a surrogate for fish lethality. *Toxicol. Methods***7**:289–309.
- Schuster F.L. & G.S. Visvesvara (2004) Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. *Vet Parasitol.***126**:91-120.
- Shang Y., X. Song, J. Bowen, R. Corstanje, Y. Gao, J. Gaertig et al. A robust inducible-repressible promoter greatly facilitates gene knockouts, conditional expression, and overexpression of homologous and heterologous genes in *Tetrahymena thermophila* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:3734–9.
- Solá R. J. & K. Griebenow (2009) Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. *J Pharm Sci.* **98**:1223-45. doi: 10.1002/jps.21504.
- Solá R. J. & K. Griebenow (2010) Glycosylation of therapeutic proteins: an effective strategy to optimize efficacy. *BioDrugs***24**:9-21. doi: 10.2165/11530550-000000000-00000.
- Stacey G., S.D. Findley & M. Mormile (2013) Protozoan glycosidases and related methods. Solicitud de Patente USA 20130078678 A1. Publicada 28 Marzo 2013.

- Taniguchi, T., T. Mizuochi, Y. Banno, Y. Nozawa & A. Kobata (1985) Carbohydrates of lysosomal enzymes secreted by *Tetrahymena pyriformis*. *J. Biol. Chem.* **260**: 13941–6.
- Taverna S.D., R.S. Coyne & C.D. Allis (2002) Methylation of histone H3 at *lys9* targets programmed DNA elimination in *Tetrahymena*. *Cell* **110**: 701-11.
- Ud-Daulla A. & K-W. Schramm (2015) Nanoparticulate Printex 90 and Titanium dioxide stimulate catecholamine production in ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila*. *Anal Biochem* **4**:4. DOI: 10.4172/2161-1009.1000212.
- Valcarce G, A. Nusblat, J. Florin-Christensen & B.C. Nudel (2002) Bioconversion of egg cholesterol to pro-vitamin D sterols with *Tetrahymena thermophila*. *J. Food Sci.* **67**:2405–9.
- Valcarce G., L. Muñoz, A. Nusblat, C. Nudel & J.F. Christensen. (2001) The improvement of milk by cultivation with ciliates. *J. Dairy Sci.* **84**: 2136-43.
- van Putten A., T. Konig, D. Fabritius, T. Kiy, A. Leske & J. Plote (2006) Method for producing gamma-linolenic acids from a ciliate culture by adding suitable precursor molecules to said culture medium. Patente USA 20060205047A1 (Nutrinova GMBH ). Publicada 14 Setiembre 2006
- van Putten A., T. Konig, D. Fabritius, T. Kiy, A. Leske & J. Plote (2009) Method for producing  $\gamma$ -linolenic acids from a ciliate culture by adding suitable precursor molecules to said culture medium. Patente USA 7,476,522 B2 (Nutrinova GmbH) Publicada 13 Enero 2009.
- Wei W., Z. Pengxing, X. Jing & L. Aihua (2013) *Tetrahymena* cell line containing luciferase gene, construction method and applications thereof. Solicitud de Patente China CN201210185777. Publicada 13 Febrero 2013.
- Weide T., L. Herrmann, U. Bockau, N. Niebur, I. Aldag, W. Laroyet *al.* Secretion of functional human enzymes by *Tetrahymena thermophila* (2006) *BMC Biotechnology* **6**:19. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-6-19>.
- Xuting W. & H.W. Dickerson (2002) Surface immobilization antigen of the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* elicits protective immunity in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**: 176-81.

## AGRADECIMIENTOS

ML Sánchez Granel, N Cid y MG Montes son becarios doctorales de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (ANPCYT) y Conicet.

Los autores agradecen el aporte de la Universidad de Buenos Aires (UBACYT 680BA), Conicet (PIP 0213) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 0701).