



**Pró-Reitoria Acadêmica
Escola de Saúde
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências
Genômicas e Biotecnologia**

**ESTRATÉGIAS BIOTECNOLÓGICAS BASEADAS EM
ENGENHARIA GENÉTICA DE PLANTAS PARA A PRODUÇÃO
DE MOLÉCULAS COM GRANDE POTENCIAL DE APLICAÇÃO
EM AGRICULTURA E SAÚDE HUMANA**

**Autor: Guilherme Souza Prado
Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Fátima Grossi de Sá**

**Brasília - DF
2018**

GUILHERME SOUZA PRADO

**ESTRATÉGIAS BIOTECNOLÓGICAS BASEADAS EM ENGENHARIA
GENÉTICA DE PLANTAS PARA A PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS
COM GRANDE POTENCIAL DE APLICAÇÃO EM
AGRICULTURA E SAÚDE HUMANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Ciências Genômicas e
Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília
como requisito parcial para obtenção do Título de
Doutor em Ciências Genômicas e Biotecnologia.

Orientadora: Dr^a Maria Fátima Grossi de Sá

Brasília-DF

2018

P896e Prado, Guilherme Souza.

Estratégias biotecnológicas baseadas em engenharia genética de plantas para a produção de moléculas com grande potencial de aplicação em agricultura e saúde humana / Guilherme Souza Prado – 2018.

151 f.: il. ; 30 cm

Tese (Doutorado) – Universidade Católica de Brasília, 2018.

Orientação: Profa. Dra. Maria Fátima Grossi de Sá

1. Agroinfiltração. 2. Anticorpo recombinante. 3. Atividade biológica. 4. Biotecnologia. 5. Produto biotecnológico. I. Sá, Maria Fátima Grossi de, orient. II. Título.

CDU 606



Tese de autoria de *Guilherme Souza Prado*, intitulada “ESTRATÉGIAS BIOTECNOLÓGICAS BASEADAS EM ENGENHARIA GENÉTICA DE PLANTAS PARA A PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS COM GRANDE POTENCIAL DE APLICAÇÃO EM AGRICULTURA E SAÚDE HUMANA”, apresentada como requisito parcial para obtenção de grau de Doutor em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, em 26 de Fevereiro de 2018, defendida e aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:

Prof.ª Dr.ª Maria Fátima Grossi de Sá – UCB
Orientadora

(Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Genômicas e Biotecnologia- UCB)

Prof.ª Dr.ª Rosângela Vieira de Andrade– UCB
Examinadora Interna

(Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Genômicas e Biotecnologia- UCB)

Prof. Dr. Nicolau Brito da Cunha– UCB
Examinador Interno

(Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Genômicas e Biotecnologia - UCB)

Prof.ª Dr.ª Maria Cristina Mattar da Silva– Embrapa
Examinadora Externa
(Embrapa Cenargen)

Prof. Dr. Leonardo Lima Pepino de Macedo – Embrapa
Examinador Externo
(Embrapa Cenargen)

Prof. Dr. Thales Lima Rocha – Embrapa
Suplente
(Embrapa Cenargen)

A Deus, por ser a própria Verdade e o Ser supremo que governa e harmoniza todos os fenômenos naturais, os quais permitiram a nossa existência e nos possibilitam, como cientistas, estudá-los para que, admirados com sua complexidade, possamos compreender que nada neste Universo seria possível sem a existência de uma mente inteligente e mediadora que mantém o absoluto na mais perfeita ordem. Com isso, dou minha retribuição: o reconhecimento e a gratidão eterna.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por me dar a capacidade, vontade e força para a realização deste trabalho.

À minha família (Silviane, Henrique, Osair, Márcia, Giovanni, Marly), pelo amor e carinho oferecidos, e pela compreensão e paciência em lidar comigo durante todo esse tempo.

Ao Danilo e sua família (Mel, Mesilene, Joyce, Wilma, Niceia, Valdete, Eliete, Davy, Arthur, Daniel), que me proporcionaram uma segunda família durante minha estadia em Brasília.

À Universidade Católica de Brasília, pela oportunidade dada a mim para cursar um bom Doutorado, cuja grade curricular não poderia ser mais compatível com minha formação desejada, dentre as possíveis opções.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela oportunidade de realização da pesquisa, na qual pude desenvolver meu trabalho de tese de Doutorado.

À CAPES, FAP-DF e Fundação Agrópolis pela concessão de bolsas e apoios financeiros aos projetos.

À Dr^a Maria Fátima Grossi de Sá, por se disponibilizar a me orientar, permitindo que eu conhecesse e obtivesse maior experiência em Biotecnologia Vegetal, bem como por ter me conduzido em meu último grau de formação.

À Dr^a Maria Cristina Mattar da Silva, por me orientar nos experimentos relativos ao inibidor de α -amilase.

Ao Dr. Leonardo Lima Pepino de Macedo, pelos ensinamentos acerca dos experimentos e pelo apoio moral durante todo o meu Doutorado.

À Dr^a Séverine Lacombe, por me orientar em Montpellier (França) durante meu Doutorado Sanduíche e me ensinar com mais profundidade sobre as técnicas de biologia molecular e engenharia genética vegetal.

Ao Dr. Jean-Paul Brizard, pela paciência, disponibilidade e carisma ao me orientar sobre as técnicas proteômicas no IRD, durante minha estadia na França.

Ao Dr. Christophe Brugidou, por chefiar o grupo de pesquisa francês com excelência, do qual tive orgulho de fazer parte.

Ao célebre professor e filósofo Olavo de Carvalho, meu mentor intelectual e grande inspiração que resgatou e impulsionou grande parte de minha inteligência, despertando em mim uma forma plena de amar e defender a Verdade.

A todos os cientistas e filósofos que, de alguma forma, com suas obras e outros legados, já me marcaram, inspiraram e influenciaram: Platão, Aristóteles, Santo Agostinho, Santo Alberto Magno, São Tomás de Aquino, Leibniz, Gregor Mendel, Francis Collins, Carlos Nougé, Marcos Eberlin, dentre outros.

Aos meus eternos professores (Cristina, Mônica, Síndya, Rachel Prado, Giane Rodrigues, Madalena Darcy, Laura Faria, Vanuse Batista, Cláudia Peres, Tâmara Rodrigues, Gethsemani, Sândra Emília, Sirlene Duarte, Elianni Bueno, Karla Bourelly, Zainy, Sueli, Regina Tristão,

Evandro Ribeiro, Mara Rúbia, Caridad Noda, Gláucia Alcântara, Ana Paula Kipnis, Cristiana Toscano, Armando García, José Clecildo, Sérgio Sibov e tantos outros), por acompanharem e contribuírem com meu processo de formação ao longo da vida e, com isso, me darem a oportunidade de alcançar e concluir o último e mais aprofundado estágio da vida estudantil.

Às minhas amigas Fabíola, Danielen, Danielle, Kelliane, Loyanne, Heloísa e Ananésia pelos momentos de distração, desabafos e apoio, contribuindo sempre para melhorar meu humor.

À minha amiga venezuelana Carolina Margot Flores Marquez, que, com seu constante carinho, me mostrou que verdadeiras amizades são mantidas a qualquer que seja a distância.

Às minhas colegas que conviveram comigo em Montpellier (Luana, Jamine, Maíra, Renata, Bear, Sandrine, Tacka e Vívian).

Às minhas colegas Reneida, Vanessa, Daiane, Cristiane, Thuanne, Elínea e Isis, pelo companheirismo e auxílios dentro do laboratório, e Leane, pela cumplicidade e constantes desabafos recíprocos.

Aos meus colegas da UCB Joaquim Lucas e Thaís Baraviera, pela afinidade e boas risadas.

Aos meus orientadores anteriores, Prof^a Dr^a Karina Simões, Prof^a Dr^a Thannya Soares, Dr^a Rosana Vianello e Dr. Josias Corrêa de Faria, pelas experiências científicas adquiridas e direcionamento à experiência atual.

À Universidade Federal de Goiás, por me proporcionar uma formação sólida em Biotecnologia, de modo que eu pudesse estar bem qualificado e preparado para cursar o Doutorado.

Ao Prof. Dr. André Corrêa Amaral, pela carta de recomendação elaborada ao final de minha Graduação, a qual possibilitou que eu cursasse o Doutorado Direto.

Ao Prof. Dr. Everaldo Gonçalves de Barros, por me admitir ao Doutorado Direto na entrevista de seleção e confiar em minha capacidade para cursá-lo.

Ao Prof. Dr. Sérgio Amorim de Alencar e Prof^a Patrícia Limeira, pela supervisão em disciplinas de Atividades Didáticas, permitindo minha experiência com ensino de Genética e Bioquímica, respectivamente.

Ao Dr. Marcelo Porto Bemquerer, pela exímia cordialidade, grande altruísmo e excelente orientação nos experimentos de caracterização estrutural do inibidor de α -amilase por espectrometria de massas.

À Dr^a Diana Fernandez e à Dr^a Anne-Sophie Petitot, por me ajudarem em alguns momentos enquanto estive no IRD.

Ao Dr. François-Xavier Gillet, pela contribuição científica na purificação do inibidor de α -amilase.

Ao Dr. Muhammad Faheem, pela orientação e colaboração nas etapas de purificação do anticorpo recombinante.

Ao MSc. Joel Antônio Cordeiro de Abreu, ex-orientando de iniciação científica, por ter me dado a oportunidade de orientá-lo e por ele contribuir cientificamente com este trabalho, ajudando a realizar a purificação do inibidor de α -amilase.

“A busca da verdade é difícil e é fácil, já que ninguém poderá desvendá-la por completo ou ignorá-la inteiramente. Contudo, cada um de nós poderá acrescentar um pouco do nosso conhecimento sobre a natureza e, disto, uma grandeza emergirá.”

Aristóteles

“Dê-me, Senhor, agudeza para entender, capacidade para reter, método e faculdade para aprender, sutileza para interpretar, graça e abundância para falar, acerto ao começar, direção ao progredir e perfeição ao concluir.”

Santo Tomás de Aquino

“Entendo por razão não a faculdade de raciocinar, que pode ser bem ou mal utilizada, mas o encadeamento das verdades, que só pode produzir verdades, e uma verdade não pode ser contrária a outra.”

Gottfried Wilhelm Leibniz

“Sem inteligência, até as virtudes mais excelsas se tornam apenas caricaturas de si mesmas.”

Olavo de Carvalho

RESUMO

Prado, Guilherme Souza. Estratégias biotecnológicas baseadas em engenharia genética de plantas para a produção de moléculas com grande potencial de aplicação em Agricultura e Saúde Humana. Tese (Doutorado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) – Universidade Católica de Brasília, 2018.

A Biotecnologia Moderna se caracteriza pelo uso da engenharia genética para a obtenção de produtos biotecnológicos com viabilidade mercadológica, podendo ser aplicada às áreas de Agropecuária e Saúde Humana. No setor de Agropecuária, o Brasil destaca-se em âmbito mundial, embora fatores ambientais nocivos ao cultivo de algumas espécies de grande importância econômica na Agricultura, como o algodão, sejam obstáculos à sua produtividade, afetando os lucros financeiros por aumentarem o custo de produção. Dentre os fatores ambientais bióticos que prejudicam a cotonicultura, o bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*) possui grande impacto econômico por ser um dos principais insetos-praga do algodoeiro (*Gossypium* spp.). Como não há variedades GM dessa cultura que sejam resistentes a este inseto, um inibidor de α -amilase – α -AIC3 – foi recentemente desenvolvido por evolução molecular *in vitro* e apresentou especificidade e atividade inibitória significativa contra a AGA. Apesar de ser um candidato promissor para o desenvolvimento de plantas transgênicas de algodão resistentes a *A. grandis*, a α -AIC3 não havia sido caracterizada estruturalmente e funcionalmente quanto à sua biossegurança. Por outro lado, no setor de Saúde Humana, o Brasil encontra-se em desvantagem na produção de biofármacos, sendo a expiração de patentes uma oportunidade para o desenvolvimento de biossimilares nacionais que eliminem gastos pelo SUS e ajudem a promover uma recuperação e um avanço econômicos por tornar o país um exportador de medicamentos biotecnológicos, simultaneamente suprimindo a demanda interna por estes produtos de forma que se tornem mais acessíveis aos pacientes, uma vez que estes medicamentos são de alto custo. Destes, o infliximabe, um anticorpo monoclonal quimérico anti-TNF- α utilizado no tratamento de diversas doenças autoimunes, é um dos medicamentos mais caros do mundo. Como em engenharia genética as plantas constituem sistemas de expressão heteróloga vantajosos na produção de biomoléculas de diferentes naturezas e com diferentes aplicações, o estabelecimento de um sistema vegetal robusto e com acurácia em modificações pós-traducionais para a produção de α -AIC3 e do infliximabe recombinante na estrutura correta e funcionalmente ativos é cientificamente estratégico. Portanto, neste trabalho foi realizada a expressão heteróloga transiente destas moléculas utilizando *Nicotiana benthamiana* como sistema de expressão. Ambas foram produzidas com base na agroinfiltração de folhas via *Agrobacterium tumefaciens* utilizando uma combinação de três supressores virais de silenciamento gênico: P0, P1Tz3 e P19. As duas proteínas de interesse foram detectadas nos extratos de proteínas solúveis e purificadas, com sucesso, por diferentes métodos. Foi possível confirmar o processamento correto das proteínas e analisar seus níveis de expressão, sendo de 44% TSP ou 156 mg/kg de folha para α -AIC3 e de 7% a 11% TSP ou 30 a 60 mg/kg de folha para o anticorpo recombinante. Adicionalmente, o inibidor α -AIC3 foi caracterizado estruturalmente por MS/MS MALDI-TOF, confirmando a identidade de sua sequência primária, e funcionalmente por análises bioquímicas, indicando que a proteína manteve atividade biológica específica quando produzida neste sistema e demonstrou ausência de atividade contra α -amilases de insetos não-alvo. Neste trabalho, foi possível estabelecer estratégias de produção para duas moléculas a partir de um sistema vegetal versátil. Pela primeira vez, utilizou-se a espécie *N. benthamiana* para produzir um inibidor de α -amilase, também sendo o primeiro relato do uso de plantas como sistema heterólogo para produção de infliximabe visando à obtenção de um produto biotecnológico biologicamente seguro e com

viabilidade comercial. Uma nova estratégia biotecnológica baseada na agroinfecção de *N. benthamiana* com genoma desconstruído de RYMV também foi estabelecida, com a detecção de amplificação viral nas células do hospedeiro, garantindo-se alternativas promissoras para a obtenção de produtos biotecnológicos via expressão transiente em plantas.

Palavras-chave: agroinfiltração, anticorpo recombinante, atividade biológica, Biotecnologia, expressão heteróloga, inibidor de α -amilase, produto biotecnológico, supressor de silenciamento gênico.

ABSTRACT

Modern Biotechnology is featured by the use of genetic engineering for obtaining biotechnological products with market feasibility, and that can be applied to Farming and Human Health sectors. In the Farming sector, Brazil stands out worldwide, although environmental factors which are harmful to the culture of some economically important species in Agriculture, such as cotton, are obstacles to their productivity by affecting financial profits due to the increase of production cost. Among biotic environmental factors which harm cotton culture, the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) has a great impact in economy, since it is one of the most important insect pests of cotton (*Gossypium* spp.). Once there are no GM varieties of this culture that are resistant to this insect, an α -amylase inhibitor – α -AIC3 – was recently developed through *in vitro* molecular evolution and displayed specificity and significant inhibitory activity against AGA. Despite of being a promising candidate for the development of *A. grandis*-resistant cotton transgenic plants, α -AIC3 had not been structurally and functionally characterized concerning its biosafety. On the other hand, in the Human Health sector, Brazil remains under disadvantage in biopharmaceutical production, and the expiry of patents becomes an opportunity for the development of national biosimilars which support the economical recovering and advance by turning Brazil into an exporter of biotechnological medicines, simultaneously supplying the domestic demand for these products by turning them more affordable to patients, since these medicines have a high cost. Among them, infliximab, an anti-TNF- α chimeric monoclonal antibody used in the treatment of autoimmune diseases, is one of the most expensive medicines in the world. As in genetic engineering plants are advantageous heterologous expression systems in the production of biomolecules with different qualities and for different applications, setting a robust plant system with accurate post-translational modifications for the production of α -AIC3 and recombinant infliximab in their correct structures and functionally active is scientifically strategical. Hence, in this work it was performed the transient heterologous expression of these molecules using *Nicotiana benthamiana* as expression system. Both of them were produced based on leaf agroinfiltration via *Agrobacterium tumefaciens* using a combination of three gene silencing viral suppressors: P0, P1Tz3 and P19. Both proteins of interest were detected in soluble protein extracts and successfully purified by different methods. It was possible to confirm the correct protein processing and analyze their expression levels, which were of 44% TSP of 156 mg/kg of leaves for α -AIC3 and of 7% to 11% TSP or 30 to 60 mg/kg of leaves for the recombinant antibody. Additionally, the α -AIC3 inhibitor was structurally characterized through MALDI-TOF MS/MS, confirming its primary sequence identity, and functionally characterized through biochemical analysis, indicating that the protein preserved its specific biological activity when produced in this system and showed absence of activity against α -amylase of non-target insects. In this work, it was possible to establish production strategies for two molecules from a versatile plant system. For the first time, the species *N. benthamiana* was used for producing an α -amylase inhibitor, also being the first report on the use of plants as heterologous system to produce infliximab aiming to obtain a biologically safe and commercially feasible biotechnological product. A new biotechnological strategy based on *N. benthamiana* agroinfection was also established using a deconstructed genome from RYMV, whose amplicons were detected in the host cells, ensuring promising alternatives for obtaining biotechnological products through transient expression in plants.

Keywords: agroinfiltration, recombinant antibody, biological activity, Biotechnology, heterologous expression, α -amylase inhibitor, biotechnological product, gene silencing suppressor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fases do ciclo de vida do bicudo-do-algodoeiro (<i>Anthonomus grandis</i>).....	26
Figura 2. Desenvolvimento do inibidor α -AIC3 por evolução molecular <i>in vitro</i>	31
Figura 3. Estrutura primária e processamento proteolítico da proteína α -AIC3.....	31
Figura 4. Estrutura tridimensional do complexo α -AIC3-AGA.....	32
Figura 5. Classes de biofármacos de acordo com sua natureza bioquímica.....	34
Figura 6. Exemplos dos primeiros biofármacos aprovados para comercialização no mundo..	35
Figura 7. 20 medicamentos de maior custo no mundo, nos últimos anos.....	36
Figura 8. Estrutura geral de uma IgG.....	38
Figura 9. Configurações estruturais de anticorpos recombinantes.....	39
Figura 10. Estrutura cristalográfica do TNF- α	40
Figura 11. Mecanismos de sinalização celular mediados por TNF- α	41
Figura 12. Processos celulares e fisiológicos desencadeados pelo estímulo por TNF- α	41
Figura 13. Mecanismo de ação das proteínas anti-TNF- α	42
Figura 14. Padrões de N-glicosilação em diferentes sistemas de expressão.....	47
Figura 15. Mecanismo de transformação genética mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ..	51
Figura 16. Atuação de supressores virais nas vias de silenciamento gênico.....	52
Figura 17. Procedimento de agroinfecção.....	54
Figura 18. <i>Codon usage</i> de <i>Nicotiana benthamiana</i>	59
Figura 19. Estruturas dos insertos para os genes <i>aic3</i> , <i>igg1c</i> e <i>igg1c</i>	59
Figura 20. Obtenção do vetor pBin61 a partir dos vetores pJIT61 e pBin19.....	62
Figura 21. Vetores de expressão para supressores virais de silenciamento gênico.....	67
Figura 22. Clones bacterianos e coquetéis de agroinfiltração.....	69
Figura 23. Genoma desconstruído do RYMV (Δ P1 Δ CP).....	80
Figura 24. Tradução reversa e otimização de códons para os genes sintéticos.....	84
Figura 25. Mapas de restrição dos insertos para α -AIC3 e IgG.....	85
Figura 26. <i>Open Reading Frames</i> para os genes <i>aic3</i> , <i>igg1c</i> e <i>igg1c</i>	86
Figura 27. Predição de peptídeos-sinal para α -AIC3 e para as cadeias leve e pesada de IgG..	87
Figura 28. Eletroforese em gel de agarose para checagem da digestão enzimática de pBin61 e pUC18: α -AIC3.....	88
Figura 29. Eletroforese em gel de agarose para checagem da digestão enzimática de pBin61 e pUC18:IgG.....	89

Figura 30. Vetores de clonagem e de expressão para α -AIC3 e IgG.....	90
Figura 31. Eletroforese em gel de agarose para checagem da amplificação de vetores de expressão.....	91
Figura 32. Eletroferograma para o sequenciamento do vetor pBin61: α -AIC3.....	91
Figura 33. Eletroferograma para o sequenciamento do vetor pBin61:IgG.....	92
Figura 34. Halos cloróticos de infiltração em folha de <i>N. benthamiana</i>	93
Figura 35. SDS-PAGE e Western blot para análise da proteína α -AIC3.....	95
Figura 36. SDS-PAGE e Western blot para análise da proteína α -AIC3 após diálise.....	96
Figura 37. SDS-PAGE para análise da proteína IgG.....	98
Figura 38. Revelação com Ponceau S e Western blot para análise da proteína IgG.....	99
Figura 39. Curva-padrão de absorbância para a proteína α -AIC3.....	100
Figura 40. Curva-padrão de absorbância para a proteína IgG.....	101
Figura 41. ELISA: nível de expressão das proteínas de interesse α -AIC3 e IgG.....	102
Figura 42. Cromatograma para a purificação da proteína α -AIC3.....	104
Figura 43. Análise e confirmação da purificação da proteína α -AIC3.....	105
Figura 44. Gel de preparação para excisão de <i>spots</i> das bandas da proteína α -AIC3.....	105
Figura 45. Cromatograma para a purificação da proteína IgG.....	106
Figura 46. Análise e confirmação da purificação da proteína IgG.....	107
Figura 47. Espectros de fragmentação e sequenciamento do peptídeo 1 de α -AIC3 para a subunidade α	108
Figura 48. Espectros de fragmentação e sequenciamento do peptídeo 1 de α -AIC3 para a subunidade β	109
Figura 49. Espectros de fragmentação e sequenciamento do peptídeo 2 de α -AIC3 para a subunidade β	109
Figura 50. Espectros de fragmentação e sequenciamento do peptídeo 3 de α -AIC3 para a subunidade β	110
Figura 51. Espectros de fragmentação e sequenciamento do peptídeo 4 de α -AIC3 para a subunidade β	110
Figura 52. Espectros de fragmentação e sequenciamento do peptídeo 5 de α -AIC3 para a subunidade β	111
Figura 53. Cobertura de sequenciamento MS/MS MALDI-TOF para a proteína α -AIC3.....	111
Figura 54. Nível de atividade inibitória da proteína α -AIC3 para enzimas-alvo e não alvo..	112
Figura 55. Replicação do vírus RYMV em <i>N. benthamiana</i>	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grandezas físicas relativas aos materiais biológicos de agroinfiltração para produção das proteínas de interesse α -AIC3 e IgG.....	94
Tabela 2. Rendimentos relativos às proteínas de interesse α -AIC3 e IgG, em %TSP e mg/kg de folha.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C.....	Graus Celsius
α -AIC3.....	α -amylase inhibitor C3
AbMV.....	<i>Abutilon mosaic virus</i>
ACN.....	Acetonitrila
ACTH.....	Hormônio adenocorticotrófico
ADNS.....	Ácido 3,5-dinitrossalicílico
AGA.....	<i>Anthonomus grandis amylase</i>
AMA.....	<i>Apis mellifera amylase</i>
AP.....	Fosfatase alcalina
BSA.....	Soroalbumina bovina
BWYV.....	<i>Beet western yellow virus</i>
CaMV 35S.....	<i>Cauliflower mosaic virus 35S</i>
CAV.....	<i>Cotton anthocyanosis virus</i>
cDNA.....	DNA complementar
CDR.....	Região determinante de complementariedade
CDS.....	Sequência codante
CLRDV.....	<i>Cotton leafroll dwarf virus</i>
CP.....	<i>Coat protein</i>
CymRSV.....	<i>Cymbidium ringspot virus</i>
Da.....	Daltons
DNA.....	Ácido desoxirribonucleico
Dpi.....	Dias pós-infiltração
dsRNA.....	RNA de fita-dupla
DTT.....	Ditiotreitol
EDTA.....	Ácido etilenodiaminotetracético

EGTA.....	Ácido etilenoglicoltetracético
ELISA.....	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EtBr.....	Brometo de etídio
EUA.....	Estados Unidos da América
g.....	Grama
GFP.....	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GM.....	Geneticamente modificado
HRP.....	<i>Horseradish peroxidase</i>
IgG.....	Imunoglobulina <i>gamma</i>
Kb.....	Quilobases
kDa.....	Quilodaltons
LB.....	Luria-Bertani
M.....	Molar
MALDI-TOF.....	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight</i>
mAb.....	Anticorpo monoclonal
mAU.....	Miliunidade de absorvância
mg.....	Miligrama
mL.....	Mililitro
mm.....	Milimetro
mM.....	Milimolar
MS.....	<i>Mass spectrometry</i>
<i>NbEIF1-α</i>	Fator eucariótico 1- α de iniciação da tradução em <i>Nicotiana benthamiana</i>
ng.....	Nanograma
OCDE.....	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OD.....	Densidade óptica
ORF.....	<i>Open Reading Frame</i>
P&D.....	Pesquisa & Desenvolvimento

pb.....	Pares de base
PCR.....	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDB.....	<i>Protein Data Bank</i>
pH.....	Potencial hidrogeniônico
PIB.....	Produto Interno Bruto
PMSF.....	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
pNPP.....	p-Nitrofenil fosfato
PopMV.....	<i>Poplar mosaic virus</i>
PPP.....	Parcerias Público-Privadas
PTGS.....	Silenciamento gênico pós-transcricional
PVX.....	<i>Potato virus X</i>
RER.....	Retículo endoplasmático rugoso
RNAi.....	RNA interferente
RNAm.....	RNA mensageiro
rpm.....	Rotações por minuto
RYMV.....	<i>Rice yellow mottle virus</i>
SFA.....	<i>Spodoptera frugiperda amylase</i>
siRNA.....	Pequeno RNA de interferência
ssRNA.....	RNA de fita-simples
SUS.....	Sistema Único de Saúde
TBSV.....	<i>Tomato bushy stunt virus</i>
TEV.....	<i>Tobacco etch virus</i>
TFA.....	Ácido trifluoracético
TMB.....	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TMV.....	<i>Tobacco mosaic virus</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
TSP.....	Total de proteínas solúveis

U.....	Unidade
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μM	Micromolar
UR.....	Umidade relativa
UV.....	Ultravioleta
V.....	Volts

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. BIOTECNOLOGIA: CONTEXTO E ASPECTOS GERAIS.....	21
1.2. BIOTECNOLOGIA APLICADA À AGRICULTURA.....	23
1.2.1. Agricultura e cotonicultura: aspectos socioeconômicos e industriais.....	23
1.2.2. Fatores nocivos à cotonicultura: estresses abióticos e bióticos.....	24
1.2.3. <i>Anthonomus grandis</i> (bicudo-do-algodoeiro).....	25
1.2.4. Estratégias de controle de <i>A. grandis</i>	27
1.2.5. Inibidores de α -amilase.....	29
1.3. BIOTECNOLOGIA APLICADA À SAÚDE HUMANA.....	32
1.3.1. Medicamentos biotecnológicos: biofármacos e biossimilares.....	32
1.3.2. Anticorpos recombinantes e engenharia de anticorpos.....	37
1.3.3. Doenças autoimunes e o papel das proteínas anti-TNF- α	39
1.3.4. Infliximabe.....	43
1.4. ENGENHARIA GENÉTICA E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS.....	44
1.5. EXPRESSÃO HETERÓLOGA.....	45
1.5.1. Expressão estável e expressão transiente.....	45
1.5.2. Sistemas de expressão heteróloga.....	45
1.5.3. Expressão de proteínas recombinantes em plantas.....	48
1.5.4. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	49
1.6. AGROINFILTRAÇÃO.....	51
2. JUSTIFICATIVA.....	55
3. OBJETIVOS.....	57
Objetivo geral.....	57
Objetivos específicos.....	57
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	58
4.1. DESENHO E SÍNTESE DOS GENES DE INTERESSE.....	58
4.1.1. Bioinformática e análises <i>in silico</i>	58

4.1.2. Delineamento e checagem dos insertos.....	59
4.1.3. Vetor de expressão, vetores de clonagem e síntese química de insertos.....	61
4.2. PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES.....	62
4.2.1. <i>Escherichia coli</i>	63
4.2.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	63
4.3. CLONAGEM GÊNICA E SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	63
4.3.1. Transformação bacteriana com vetor de clonagem.....	63
4.3.2. Cultivo bacteriano (<i>E. coli</i>) e extração e quantificação de DNA plasmidial.....	64
4.3.3. Digestão enzimática, excisão do inserto e ligação gênica.....	64
4.3.4. Transformação de <i>E. coli</i> com vetores de expressão e sequenciamento de DNA.....	65
4.3.5. Transformação e cultivo de <i>A. tumefaciens</i>	66
4.4. SUPRESSORES VIRAIS DE SILENCIAMENTO.....	66
4.5. AGROINFILTRAÇÃO.....	67
4.5.1. Preparo de coquetéis bacterianos de agroinfiltração.....	67
4.5.2. Infiltração de folhas de <i>Nicotiana benthamiana</i> , cultivo e coleta.....	69
4.6. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS.....	70
4.7. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE BRADFORD.....	70
4.8. DETECÇÃO DAS PROTEÍNAS DE INTERESSE: SDS-PAGE E WESTERN BLOT..	71
4.9. DIÁLISE.....	73
4.10. ANÁLISE DO NÍVEL DE EXPRESSÃO E CÁLCULO DE RENDIMENTO:ELISA.	74
4.11. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE INTERESSE.....	75
4.11.1. Cromatografias: exclusão molecular e bioafinidade.....	75
4.12.2. Confirmação da purificação.....	76
4.12. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL: ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	77
4.12.1. Tripsinização de amostras: digestão <i>in gel</i>	77
4.12.2. Preparo de amostras para ionização/dessorção.....	77

4.12.3. Aquisição de espectros e fragmentação de íons.....	78
4.12.4. Análise comparativa: digestão trípica teórica.....	78
4.13. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL: ENSAIO DE ATIVIDADE INIBITÓRIA.....	78
4.13.1. Validação da atividade biológica de α -AIC3: enzima-alvo.....	78
4.13.2. Análise de especificidade e biossegurança: enzimas-não alvo.....	79
4.14. AGROINFECÇÃO.....	80
5. RESULTADOS.....	83
5.1. ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	83
5.2. DIGESTÃO ENZIMÁTICA, SUBCLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DE DNA...88	88
5.3. AGROINFILTRAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS.....	92
5.4. SDS-PAGE E WESTERN BLOT.....	94
5.5. ANÁLISE DE RENDIMENTO DAS PROTEÍNAS DE INTERESSE.....	100
5.6. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE INTERESSE.....	103
5.7. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE α -AIC3.....	107
5.8. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE α -AIC3.....	111
5.9. ESTABELECIMENTO DO SISTEMA DE REPLICON VIRAL (RYMV).....	113
6. DISCUSSÃO.....	116
7. CONCLUSÃO.....	124
8. PERSPECTIVAS.....	126
REFERÊNCIAS.....	128
APÊNDICES.....	140
Apêndice A.....	140
Apêndice B.....	144
Apêndice C.....	145
ANEXOS.....	146
Anexo A.....	146
Anexo B.....	150
Anexo C.....	151

1. INTRODUÇÃO

1.1. BIOTECNOLOGIA: CONTEXTO E ASPECTOS GERAIS

A Biotecnologia pode ser definida como o uso de seres vivos ou seus componentes (moléculas, organelas, células, tecidos, órgãos) para a obtenção de produtos economicamente viáveis e que cheguem ao mercado, garantindo benefícios à qualidade de vida humana. A Biotecnologia Moderna, mais especificamente, difere da Biotecnologia Tradicional por cumprir este papel utilizando a tecnologia do DNA recombinante, também denominada “engenharia genética”, que consiste na manipulação do material genético de diversos seres vivos, utilizando ferramentas moleculares e com variadas finalidades. De forma geral, a Biotecnologia pode ser aplicada às seguintes grandes áreas: Saúde Humana e Animal, Agropecuária, Industrial e Ambiental. Em todas elas, a engenharia genética tem sido a ferramenta-chave na obtenção de produtos biotecnológicos.

No que se refere à pesquisa voltada à inovação biotecnológica, a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) definiu os países que se encontram no topo do *ranking* de investimento em Biotecnologia, o que leva em conta o número de companhias ativas de biotecnologia, depósitos de patente e aprovação de produtos biotecnológicos para o mercado. Nesse sentido, considerando investimentos em Pesquisa & Desenvolvimento (P&D), em geral, os Estados Unidos da América (EUA) lideram o *ranking*, seguidos pela França, Suíça, Coreia do Sul, Japão, Alemanha e Dinamarca, nesta ordem, com cada um investindo, anualmente, mais de 1 bilhão de dólares. Quando se considera apenas o número de companhias de biotecnologia, o Reino Unido, México, Nova Zelândia e Bélgica também se incluem entre os países do topo do *ranking* (OCDE, 2015).

Entretanto, embora a China não esteja entre os líderes do *ranking* mundial, a OCDE estima que até 2019 ela seja o país a liderar o *ranking* de P&D em Biotecnologia, tendo em vista sua crescente taxa de investimentos no setor desde 2008. Além disso, outros países ainda não-membros da Organização, o que inclui o Brasil, Índia, África do Sul e Singapura, conforme relatórios acerca de Ciência e Tecnologia da OCDE, têm revelado um quadro industrial relativamente mais avançado em Biotecnologia nos últimos anos (ERNST; YOUNG, 2017).

No que se refere ao Brasil, os atrasos nos investimentos em Biotecnologia, fortemente acentuados por fatores políticos envolvendo a centralização econômica e consequentes obstáculos à atração de investimentos e parceiros externos, o que é reforçado por políticas

progressivamente estatizantes que levam ao inevitável e concomitante declínio da economia, bem como o direcionamento da pesquisa sem grande visão de mercado e com fins prioritariamente acadêmicos, durante décadas ocasionaram a inserção do país em condições desvantajosas no âmbito da competitividade industrial em nível internacional. Isso, portanto, exigiu e ainda exige uma compensação com a adoção de políticas economicamente liberais, seguindo o modelo econômico dos países líderes em Biotecnologia no mundo – o que reforça a correlação entre o modelo econômico de um país e sua capacidade de realizar avanços científicos e tecnológicos em geral (ROTHBARD, 2017) –, de forma a reposicionar o Brasil neste espaço internacional, aproveitando seu potencial como grande competidor e parceiro industrial, dada sua extensa biodiversidade e consequente capacidade de desenvolvimento econômico a partir do aproveitamento de seus recursos naturais.

Com base nesse contexto, o Decreto 6.041, de 8 de fevereiro de 2007, instituiu a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia, com o objetivo de “estabelecer ambiente adequado para o desenvolvimento de produtos e processos biotecnológicos inovadores, o estímulo à maior eficiência da estrutura produtiva nacional, o aumento da capacidade de inovação das empresas brasileiras, a absorção de tecnologias, a geração de negócios e a expansão das exportações” (BRASIL, 2007). A referida Política de Desenvolvimento ainda define as áreas setoriais priorizadas, dentre elas as áreas de Agropecuária e Saúde Humana.

Quanto à Agropecuária, dentre os alvos estratégicos estão o desenvolvimento de plantas resistentes a fatores bióticos e tolerantes a fatores abióticos, bem como o uso de plantas e animais como biofábricas para a produção de biomoléculas – em um processo denominado *molecular farming* (*pharming*). Em relação à Saúde Humana, constituem alguns dos alvos estratégicos os novos métodos e processos de produção de proteínas recombinantes, como novas biomoléculas e fármacos, a exemplos de vacinas, hemoderivados e imunobiológicos obtidos por rotas biotecnológicas. Em ambos os casos, a Política instituída também prevê plataformas para a absorção e transferência de tecnologias, estimulando o estabelecimento de cooperações entre governo, setor acadêmico e indústria, de forma que o desenvolvimento e cumprimento dos objetivos sejam consolidados pela indústria privada, por exemplo, por meio das Parcerias Público-Privadas (PPP) (BRASIL, 2007).

Sendo assim, uma vez que se possui o arcabouço político, jurídico e moral para a implementação dos investimentos em Biotecnologia, torna-se importante que as empresas de pesquisa, conjuntamente à academia, demonstrem recursos técnicos, projetos viáveis no

âmbito mercadológico e conhecimento suficiente para o proveito e consolidação prática da Política prevista no Decreto 6.041.

1.2. BIOTECNOLOGIA APLICADA À AGRICULTURA

1.2.1. Agricultura e cotonicultura: aspectos socioeconômicos e industriais

O Agronegócio no Brasil possui grande importância socioeconômica, sendo o setor de maior impacto na economia nacional. A Agricultura brasileira, unicamente, representou aproximadamente 23,5% do PIB do país em 2017, sendo responsável por gerar aproximadamente 33% do total de empregos, direta ou indiretamente, e aproximadamente 45% das exportações (MAPA, 2017), o que justifica o fato de o Brasil ocupar uma posição notável na produção agroindustrial mundial.

A vocação do Brasil para a Agricultura reside principalmente em sua elevada biodiversidade e suas condições geográficas, como abundância de água e de solos cultiváveis, clima favorável, relevo, luminosidade e disponibilidade de terras, destacando-se o potencial de expansão agrícola sem a necessidade de gerar desequilíbrios ambientais. Este setor também é responsável por ter mantido a balança comercial favorável durante anos, em muitos dos quais esta permaneceu crescente (CONAB, 2016).

Em relação às cultivares, o Brasil destaca-se como produtor mundial de soja, café, arroz, cana-de-açúcar, milho, feijão e algodão (IBGE, 2017). O algodoeiro, por sua vez, é uma planta pertencente ao gênero *Gossypium*, sendo a espécie *Gossypium hirsutum* L. a mais cultivada em âmbito mundial e estando entre as principais cultivares da Agricultura brasileira, dada sua importância como matéria-prima na indústria têxtil, sobretudo, e de biocombustíveis a partir de seus subprodutos, tendo, portanto, participação significativa na economia, tanto nacional quanto internacionalmente. Com isso, em 2017 o Brasil se tornou o quinto maior produtor de algodão no mundo, o terceiro maior exportador e o nono maior consumidor, também se destacando os EUA, China, Paquistão e Índia no *ranking* de cultivo de algodão (ABRAPA, 2017).

A cotonicultura brasileira tem como os principais estados, em produção, o Mato Grosso (56%), Bahia (27,9%) e Goiás (5,6%), considerando-se os últimos 10 anos, havendo um avanço recente considerável nas áreas destinadas ao plantio e cultivo de algodão, a partir de 2013, com grande destaque para o Cerrado brasileiro (ABRAPA, 2017).

1.2.2. Fatores nocivos à cotonicultura: estresses abióticos e bióticos

Embora haja uma expansão consistente da cotonicultura no Brasil, o cultivo do algodoeiro pode sofrer interferência de fatores ambientais que sejam prejudiciais à sua produtividade, por interrupção do acúmulo de biomassa, e que conseqüentemente afetem a capacidade de fornecimento dos subprodutos aos consumidores externos, o que ocasiona grandes prejuízos à economia brasileira devido ao aumento do custo de produção e, necessariamente, redução dos lucros. Estes fatores são representados pelos estresses abióticos e bióticos (FREIRE, 2011; ECHER, 2014).

Os estresses abióticos mais comuns no algodoeiro consistem nos estresses térmico, salino, hídrico, luminoso e nutricional. Variações na temperatura, por exemplo, podem induzir à diminuição da taxa fotossintética, afetando a qualidade da fibra do algodão, reduzindo a área foliar e a produção de matéria seca. Por sua vez, variações na salinidade e na disponibilidade de água, tanto por escassez quanto por excesso, afetam a turgescência de órgãos da planta e a expansão celular, bem como o desenvolvimento da planta em geral por conta de deficiências na biossíntese de macromoléculas. O estresse luminoso afeta diretamente a eficiência fotossintética, conseqüentemente afetando a produtividade e a qualidade da fibra. Por fim, o estresse nutricional de macro ou micronutrientes afeta diretamente a produção e a qualidade de biomassa, interferindo no desenvolvimento de todos os órgãos da planta (ECHER, 2014).

Os estresses bióticos são majoritariamente representados pelos insetos-praga, além de doenças causadas por vírus, bactérias, fungos e nematoides. Dentre os nematoides que atacam o algodoeiro, destaca-se o nematoide-das-galhas (*Meloidogyne incognita*). Dentre as doenças bacterianas do algodoeiro, a de maior importância econômica é a mancha angular (ou crestamento bacteriano), causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. Das principais viroses do algodoeiro, destacam-se o mosaico-comum, causado por um vírus da família Geminiviridae e do gênero *Begomovirus*, sendo possivelmente o AbMV (*Abutilon mosaic virus*); o mosaico-das-nervuras (ou doença azul do algodoeiro), causada pelo CLRDV (*Cotton leafroll dwarf virus*); e o vermelhão, causado pelo CAV (*Cotton anthocyanosis virus*). Vários fungos também parasitam o algodoeiro, sendo alguns dos principais e as respectivas doenças por eles causadas: a mancha-branca (ou mancha-de-ramulária, ou ainda “ramulária”), causada por *Ramularia areola*; a mancha-de-alternária, causada pelos fungos *Alternaria macrospora* e *A. alternata*; a antracnose e a ramulose, causadas por *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*; a ferrugem tropical, causada por *Phakopsora gossypii*; a murcha-de-

fusarium (ou fusariose) causada pelo fungo de solo *Fusarium oxysporum*; e o mofo-branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum* (ARAÚJO; SUASSUNA, 2003).

Em relação aos insetos-praga do algodoeiro, são de considerável destaque a lagarta-rosada (*Pectinophora gossypiella*), a lagarta-do-cartucho-do-milho (*Spodoptera frugiperda*), a lagarta-da-maçã (*Heliothis virescens*), a lagarta-do-tomate (*Helicoverpa armigera*), o pulgão-do-algodão (*Aphis gossypii*), a mosca-branca (*Bemisia tabaci*) e a broca-da-raiz (*Eutinobothrus brasiliensis*). Contudo, uma das pragas de maior importância para a cotonicultura é o bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*), devido à amplitude da devastação causada por este inseto nas culturas de algodão em vários países do continente americano (FREIRE, 2011).

1.2.3. *Anthonomus grandis* (bicudo-do-algodoeiro)

O bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843) é um inseto da ordem Coleoptera, família Curculionidae e subfamília Anthonominae. Este besouro (Figura 1) possui cerca de 6 mm de comprimento, uma coloração que varia do pardo-acinzentado ao preto e um rosto bem desenvolvido, com o qual ele perfura e se alimenta preferencialmente dos botões florais, flores e maçãs jovens do algodoeiro, locais onde comumente são encontrados os adultos do inseto. Nos botões florais, as fêmeas do inseto também realizam a oviposição, em que os ovos depositados são elípticos e de coloração branca, dos quais após três a cinco dias eclodem as larvas, que são ápodas, de coloração branca e cabeça marrom-clara. As larvas possuem três ínstar e se desenvolvem em pupas igualmente brancas, e em seguida em adultos, completando o ciclo biológico, o qual é significativamente afetado pela temperatura (AZAMBUJA; DEGRANDE, 2015).

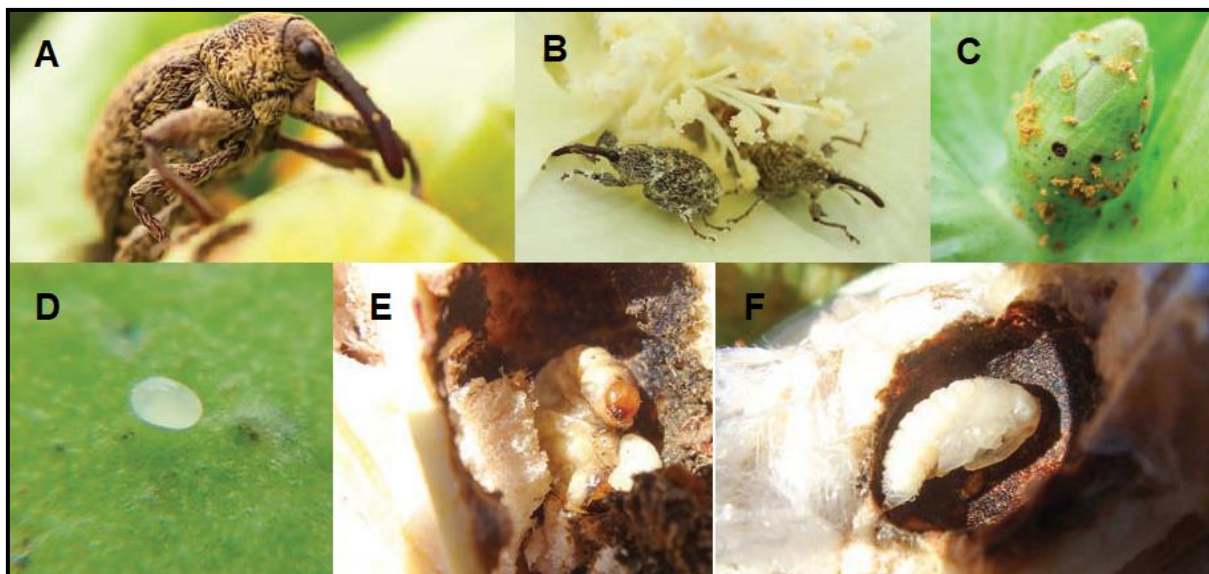


Figura 1. Fases do ciclo de vida do bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*). A e B) Insetos adultos se alimentando do botão floral de algodoeiro; C) Botão floral contendo perfurações de alimentação e oviposição; D) Ovo do bicudo-do-algodoeiro; E) Larva do bicudo-do-algodoeiro; F) Pupa do bicudo-do-algodoeiro. Fonte: adaptado de Azambuja & Degrande (2015).

Este coleóptero foi descrito pela primeira vez no México, em 1843, tendo invadido o estado do Texas (EUA) em 1892, se dispersando pelo Sul dos EUA e, em seguida, pela América Latina, com ocorrências reportadas pela primeira vez em 1949, na Venezuela, e em 1950, na Colômbia. Porém apenas em 1983 foi registrada a primeira ocorrência de *A. grandis* no Brasil, no estado de São Paulo. A partir do Brasil, o bicudo-do-algodoeiro se dispersou para o Paraguai, em 1991, e para a Argentina, em 1993 (SUJII; PIRES, 2015).

A partir destes períodos, o *A. grandis* passou a ser endêmico no continente americano, sendo sempre considerado uma das principais pragas da cotonicultura, uma vez que se concentra em regiões reprodutivas do algodoeiro, as quais, devido à alimentação dos adultos e ao desenvolvimento das fases larvais e da pupa, são abortadas e inviabilizadas para manter o ciclo da planta, especialmente quanto à produção da fibra de algodão. Isso faz com que, conjuntamente a outras pragas, o *A. grandis* seja responsável por até 31% do custo de produção pela necessidade de aplicações de inseticidas voltados ao controle deste inseto-praga, podendo esta finalidade corresponder, em alguns países, a até 40% das aplicações de inseticidas no algodoeiro (SUJII; PIRES, 2015).

1.2.4. Estratégias de controle de *A. grandis*

As estratégias de controle do bicudo-do-algodoeiro consistem, em geral, no controle cultural, semeadura concentrada, manejo integrado de pragas, armadilhas de feromônios, destruição de restos culturais de algodão, controle biológico – utilizando fungos, ácaros e insetos como formigas, porém sem programas de controle com grande abrangência e sucesso – e, majoritariamente, no controle químico, pela aplicação de inseticidas como organofosforados e piretroides. Por outro lado, embora este último constitua a principal medida convencional de controle, não possui o alcance necessário para um combate efetivo, além de gerar preocupações sobre a saúde animal e humana, bem como riscos ambientais e ecológicos (SANTOS, 2015), o que faz com que o *A. grandis* se mantenha sem uma medida suficiente de controle e permaneça causando grande impacto na cotonicultura.

Dessa forma, uma alternativa aos métodos convencionais tem sido a obtenção de variedades de plantas com resistência genética, por meio de técnicas de melhoramento genético (LOMBARDO et al., 2016). O melhoramento genético clássico no algodoeiro, entretanto, se limita ao desenvolvimento de cultivares com ciclo de vida curto e maturação acelerada (MACEDO, 2012), uma vez que não há variedades de algodoeiro apresentando características fisiológicas e bioquímicas que levem ao combate das larvas e/ou do inseto adulto.

No entanto, no contexto biotecnológico, é importante lembrar que a Agricultura pode ser beneficiada com o desenvolvimento de novos produtos e processos que mantenham o *status* brasileiro de produtor mundial. Levando isso em consideração, estas características genéticas e bioquímicas podem ser exploradas rompendo-se as barreiras genéticas naturais e, por meio da engenharia genética, variedades de diferentes espécies podem ser desenvolvidas e melhoradas geneticamente para contornar problemas de origem ambiental como os insetos-praga (FIRMINO, 2012). Neste caso, o uso da transgenia para a produção de plantas geneticamente modificadas (GM) torna-se uma alternativa bastante viável e promissora (AHMAD et al., 2012) para a obtenção de eventos GM de algodoeiro contendo genes de resistência ao *A. grandis*.

Diversas variedades de *G. hirsutum* já foram desenvolvidas por engenharia genética com diferentes finalidades, como o melhoramento da qualidade do óleo de sementes e da fibra de algodão, tolerância a estresses abióticos, resistência a fungos e vírus, tolerância a herbicidas e resistência a alguns insetos-praga, sendo que os dois últimos tipos de variedades

predominam em aprovação e comercialização (CHAKRAVARTY et al., 2012). Entretanto, ainda não há plantas de algodoeiro no mercado que sejam resistentes ao *A. grandis*. Recentemente, foi desenvolvida uma variedade de algodão GM (RIBEIRO et al., 2017) expressando a variante Cry10Aa de uma toxina Bt, da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis israelensis*, e que demonstrou pela primeira vez, em casas de vegetação, resistência a até 100% de insetos da espécie *A. grandis* criados em laboratório.

O mecanismo de ação das toxinas Cry é baseado na solubilização da proteína inseticida no sistema digestivo do inseto, tornando-se ativa e se ligando a receptores que promovem a formação de poros que lisam as células, levando o inseto à morte (VACHON et al., 2012). Estas proteínas são tóxicas aos insetos e alguns nematoides, porém não a outros animais e humanos e, apesar do reduzido espectro de organismos-alvo e baixos níveis de acumulação em plantas transgênicas, a aquisição de resistência mediada por toxinas Cry é a tecnologia mais comum dentre as moléculas bioinseticidas utilizadas, tendo sido também aplicada a outras espécies vegetais em todo o mundo, como milho e soja (JAMES, 2017). Embora seja uma tecnologia amplamente utilizada, os baixos níveis de expressão de toxinas Cry em plantas GM podem desencadear uma pressão seletiva em insetos-alvo, contribuindo para o surgimento de mutantes com resistência aos efeitos tóxicos da molécula via mecanismos moleculares de adaptação (GASSMANN et al., 2014).

Dessa forma, estratégias de engenharia genética utilizando outras moléculas bioinseticidas também tem sido utilizadas como alternativa. A tecnologia do RNA interferente (RNAi) é outro método amplamente utilizado no combate a diversas doenças e pragas em plantas, consistindo no silenciamento gênico de moléculas de RNA mensageiro (RNAm) do patógeno cruciais no processo de infecção ou de etapas centrais do metabolismo por meio da expressão de moléculas de RNA de fita-dupla (dsRNA) no hospedeiro (CASACUBERTA et al., 2015). Porém esta tecnologia enfrenta diversas barreiras robustas no caso de insetos-praga, como a estabilidade e absorção do dsRNA ao longo do trato gastrointestinal, bem como o contato efetivo do RNA de fita-simples (ssRNA), derivado do dsRNA, com o RNAm de forma que um efeito inseticida considerável seja desencadeado (JOGA et al., 2016).

Apesar disso, sabe-se que as plantas são equipadas com sistemas de defesa contra insetos-praga, como proteínas que agem como antimetabólitos, induzindo a alterações no sistema digestivo dos insetos. Com isso, os genes que codificam proteínas inibidoras de proteinases, a exemplo dos inibidores de tripsina, podem ser transferidos de uma espécie

vegetal para outra visando ao desenvolvimento de resistência a insetos (QUILIS et al., 2013; SMIGOCKI et al., 2013; CHEN et al., 2014; MA et al., 2017). Enzimas como as quitinasas também podem ser expressas em plantas com o mesmo objetivo, obtendo-se eventos transgênicos resistentes (WANG et al., 2005; McCAFFERTY et al., 2006). Por fim, as lectinas são uma família de proteínas vegetais que se ligam a carboidratos e apresentam alta toxicidade a insetos fitófagos, sendo também comumente utilizadas para esta finalidade (VANDENBORRE et al., 2011).

1.2.5. Inibidores de α -amilase

Os inibidores de α -amilase (α -AI) são outras proteínas bioinseticidas vegetais cujas propriedades os tornam candidatos altamente promissores para o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a insetos. Isso porque, considerando-se os obstáculos existentes principalmente nas tecnologias que utilizam toxinas Cry e RNAi, a obtenção de resistência dos insetos aos α -AIs é de ocorrência menos provável, uma vez que as α -amilases são proteínas altamente conservadas e, portanto, menos suscetíveis a mutações que seriam exigidas para a adaptação dos insetos, já que estas podem, eventualmente, inativar a atividade enzimática pelas alterações estruturais provocadas na molécula e que desestruturam seu sítio ativo.

Há cerca de 800 espécies de plantas que apresentam atividade significativa de α -AIs, sendo o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e outras espécies do gênero *Phaseolus* as que contêm os α -AIs mais conhecidos e utilizados para conferir resistência contra insetos. Os α -AIs podem ser utilizados, eventualmente, no tratamento de diabetes *mellitus* tipo 2, uma vez que algumas variantes também podem se ligar a α -amilases de mamíferos (SALES et al., 2012). Estes inibidores atuam se ligando majoritariamente às enzimas α -amilases de insetos fitófagos, inibindo o processamento de carboidratos complexos como o amido por impedirem a hidrólise de ligações α -1,4, o que leva à morte dos insetos por inanição (GROSSI-DE-SÁ et al., 1997).

Nas sementes de *P. vulgaris*, no entanto, há expressão de duas isoformas destes inibidores que, apesar de sua alta similaridade estrutural, possuem espectros distintos de α -amilases-alvo: α -AI1, que possui atividade inibitória contra α -amilases de *Callosobruchus maculatus*, *Callosobruchus chinensis*, *Homo sapiens* e *Sus domesticus*; α -AI2, que possui atividade inibitória contra α -amilases de *Zabrotes subfasciatus* e *Bruchus pisorum* (GROSSI-DE-SÁ et al., 1997). Ambas as isoformas sofrem clivagens proteolíticas por hidrolases

presentes no vacúolo central (PUEYO et al., 1993), e a partir de uma cadeia polipeptídica de pré-proteína são gerados dois polipeptídeos, que sofrem processamentos adicionais com a hidrólise de alguns resíduos na extremidade C-terminal e resultam nas subunidades α , de aproximadamente 11 kDa, e β , de aproximadamente 15 kDa (YOUNG et al., 1999). Entretanto, ainda que as formas não-processada e processada do inibidor possam se acumular nas plantas, foi demonstrado que apenas a forma processada é ativa contra α -amilases, uma vez que a proteólise é requerida para aquisição da conformação com atividade inibitória (PUEYO et al., 1993).

Com isso, a transgenia tem sido aplicada de forma a transferir genes codificadores das α -AIs de feijoeiro para diferentes espécies de plantas, objetivando o desenvolvimento de resistência a insetos-praga (ALTABELLA; CHRISPEELS, 1990; SCHROEDER et al., 1995; MORTON et al., 2000; BARBOSA et al., 2010;), mas, embora as estratégias baseadas nestes inibidores apresentem considerável eficácia, o espectro de insetos-alvo passíveis de controle mediado por estas moléculas é bastante reduzido. Sendo assim, estratégias de evolução molecular *in vitro* baseadas em *DNA shuffling* e *phage display* se tornam alternativas viáveis para estender este espectro e direcionar a atividade inibitória de forma específica a uma enzima-alvo desejada, podendo ser geradas, artificialmente a partir de proteínas nativas, bibliotecas contendo milhares de variantes que apresentem perfil funcional novo ou melhorado (LASSNER; BEDBROOK, 2001; YUAN et al., 2005).

Através desta abordagem, moléculas específicas para o pulgão-da-ervilha (*Acyrtosiphon pisum*) e para alguns insetos de grande importância econômica no mundo, como a broca-gigante da cana-de-açúcar (*Telchin licus licus*) (CECI et al., 2003; CRAVEIRO et al., 2010), já foram desenvolvidos. Adicionalmente, nos últimos anos foi desenvolvida uma variante de α -AI, denominada α -AIC3 (SILVA et al., 2013), que foi selecionada com base na especificidade contra a α -amilase de *A. grandis* (AGA) e considerada altamente promissora no combate à praga, dado o seu nível de atividade inibitória. Isso porque as variantes nativas α -AI1 e α -AI2 não apresentam especificidade para o coleóptero, e a variante α BIII de *Secale cereale*, embora tenha especificidade, não apresentou nível de inibição satisfatório (DIAS et al., 2010).

O inibidor α -AIC3 foi desenvolvido com base no embaralhamento das sequências de resíduos dos inibidores α -AI1 e α -AI2 de *P. vulgaris* (Figura 2). A sequência e o processamento da pré-proteína foram elucidados, e este último demonstrou perfil proteolítico

similar ao das matrizes da proteína (Figura 3). Também foi elucidada, por técnicas de modelagem e dinâmica molecular, a formação do complexo α -AIC3-AGA (Figura 4), o que evidenciou a estabilidade da ligação e efetividade da inibição enzimática.



Figura 2. Desenvolvimento do inibidor α -AIC3 por evolução molecular *in vitro*. A figura representa o alinhamento das cadeias polipeptídicas dos inibidores parentais α -AI1 e α -AI2 de *Phaseolus vulgaris*, destacando-se seus resíduos diferenciais de aminoácidos em azul e em amarelo, respectivamente, e a cadeia polipeptídica do inibidor artificial α -AIC3 desenvolvido por evolução molecular *in vitro*, via *DNA shuffling* e *phage display*, evidenciando a hibridização dos resíduos diferenciais na molécula resultante (Adaptado de SILVA et al., 2013).

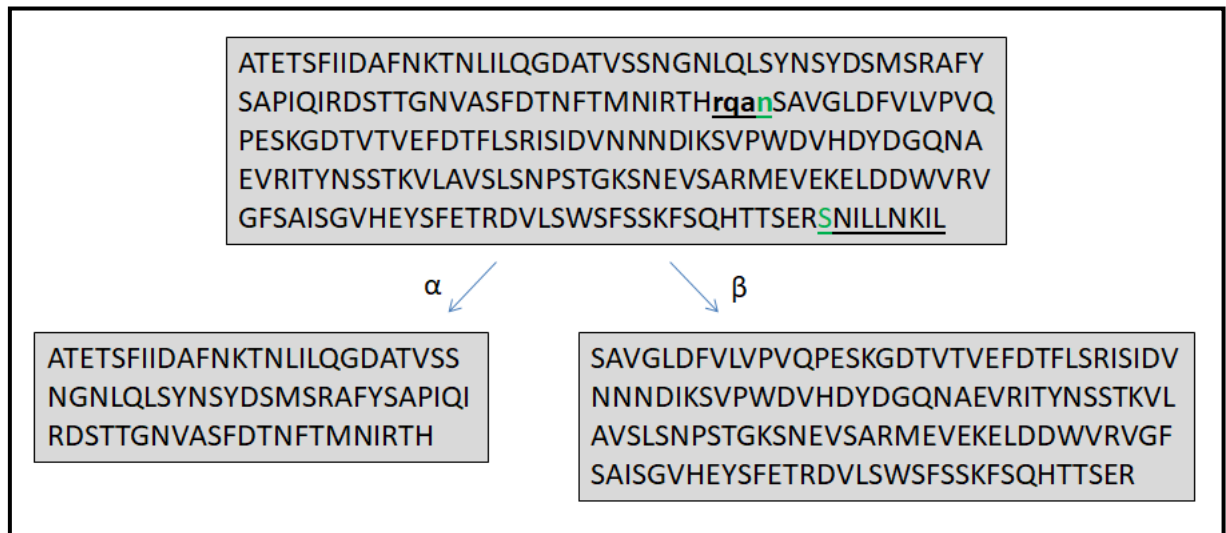


Figura 3. Estrutura primária e processamento proteolítico da proteína α -AIC3. Representação esquemática da sequência de resíduos de aminoácidos da cadeia polipeptídica do inibidor α -AIC3, com os resíduos em verde representando sítios internos de clivagem proteolítica, e os resíduos sublinhados representando resíduos ausentes na proteína madura. As subunidades resultantes (α , menor, e β , maior), que compõem a proteína ativa e processada, estão representadas abaixo da cadeia polipeptídica completa.

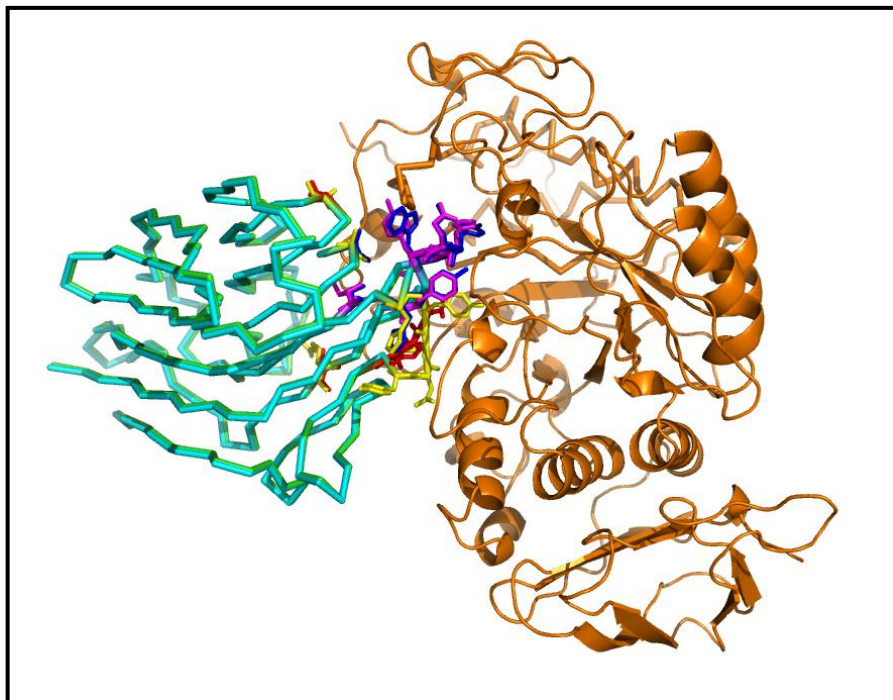


Figura 4. Estrutura tridimensional do complexo α -AIC3-AGA. Representação da estrutura terciária, elucidada por dinâmica molecular, do complexo α -AIC3-AGA formado na inibição enzimática. A estrutura tridimensional da AGA está representada em alaranjado, e a estrutura da α -AIC3 está representada em azul e verde. Os resíduos de aminoácidos que interagem entre si estão representados em amarelo, vermelho, roxo e azul. Imagem obtida no servidor Protein-Protein Interaction (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/PP/server/>).

1.3. BIOTECNOLOGIA APLICADA À SAÚDE HUMANA

1.3.1. Medicamentos biotecnológicos: biofármacos e biossimilares

A área de Saúde Humana é, no Brasil e no mundo, uma das áreas prioritárias para o desenvolvimento de novas tecnologias para o diagnóstico, controle e tratamento de doenças. Em relação a esta última aplicação, a indústria farmacêutica atua produzindo medicamentos naturais, sintéticos e biotecnológicos (FARDELONE; BRANCHI, 2006).

Uma vez que o acesso a medicamentos é fundamental para a manutenção da saúde populacional, no Brasil o Ministério da Saúde, por meio do Sistema Único de Saúde (SUS), os disponibiliza aos pacientes, sendo estes medicamentos classificados em componentes básicos, estratégicos ou excepcionais da assistência farmacêutica, dos quais os últimos se caracterizam pelo custo extremamente elevado, se tornando de difícil acesso, de forma privada, principalmente aos pacientes da população de baixa renda. Entretanto, este problema de aquisição é contornado pelo Programa de Medicamentos Excepcionais, criado pelo Governo Federal em 1993, que desde então passou a fornecê-los a este público. Porém

permanecem existindo gastos elevados ao Governo Federal, já que a maioria dos medicamentos pertencentes a esta categoria é produzida por empresas internacionais e, portanto, importada de outros países, representando uma grande despesa principalmente pelo fato de que são, juntamente com seu processo de produção, patenteados (BASSO, 2012).

Dentre os medicamentos excepcionais, uma parcela significativa é representada pelos medicamentos biotecnológicos, citados anteriormente. Os medicamentos biotecnológicos, ou biofármacos, são medicamentos de origem biológica, com estrutura molecular complexa, de alto peso molecular – cerca de 200 a 1.000 vezes maior que o de fármacos químicos – e consistem em macromoléculas orgânicas cuja natureza é peptídica, proteica e/ou de ácidos nucleicos, sendo produzidos, sobretudo, via engenharia genética (WALSH, 2010). Até o momento, há mais de 400 biofármacos produzidos e direcionados a inúmeras doenças, como AIDS, diabetes, artrite, esclerose múltipla, hepatite, câncer, hemofilia, lúpus e doenças cardiovasculares, embora grande parte se concentre no tratamento de neoplasias e doenças autoimunes (BASSO et al., 2013).

Os biofármacos podem ser produzidos utilizando diferentes tecnologias baseadas em engenharia genética, como a expressão heteróloga, a tecnologia de hibridomas e técnicas *in vitro* de *display*, a exemplo de *phage display*, *ribosome display*, *bacterial display*, *yeast display* e *mRNA display*. Estas moléculas também podem ser classificadas em diversos grupos e de acordo com suas naturezas bioquímicas (Figura 5), sendo eles: enzimas (ex.: glucocerebrosidase), anticorpos monoclonais (mAbs) (ex.: trastuzumabe), citocinas (ex.: interferon β), fatores de coagulação (ex.: fator VIII), fatores de crescimento (ex.: somatomedinas), fatores estimuladores de colônia (ex.: fator de granulócitos), anticoagulantes (ex.: hirudina), trombolíticos (ex.: ativador de plasminogênio tecidual), fatores de crescimento hematopoiético (ex.: eritropoietina), hormônios (ex.: insulina), siRNAs, aptâmeros (ex.: pegaptanibe sódico) e, eventualmente, vacinas (vacinas de DNA, peptídeos ou proteínas recombinantes) (BASSO et al., 2016).

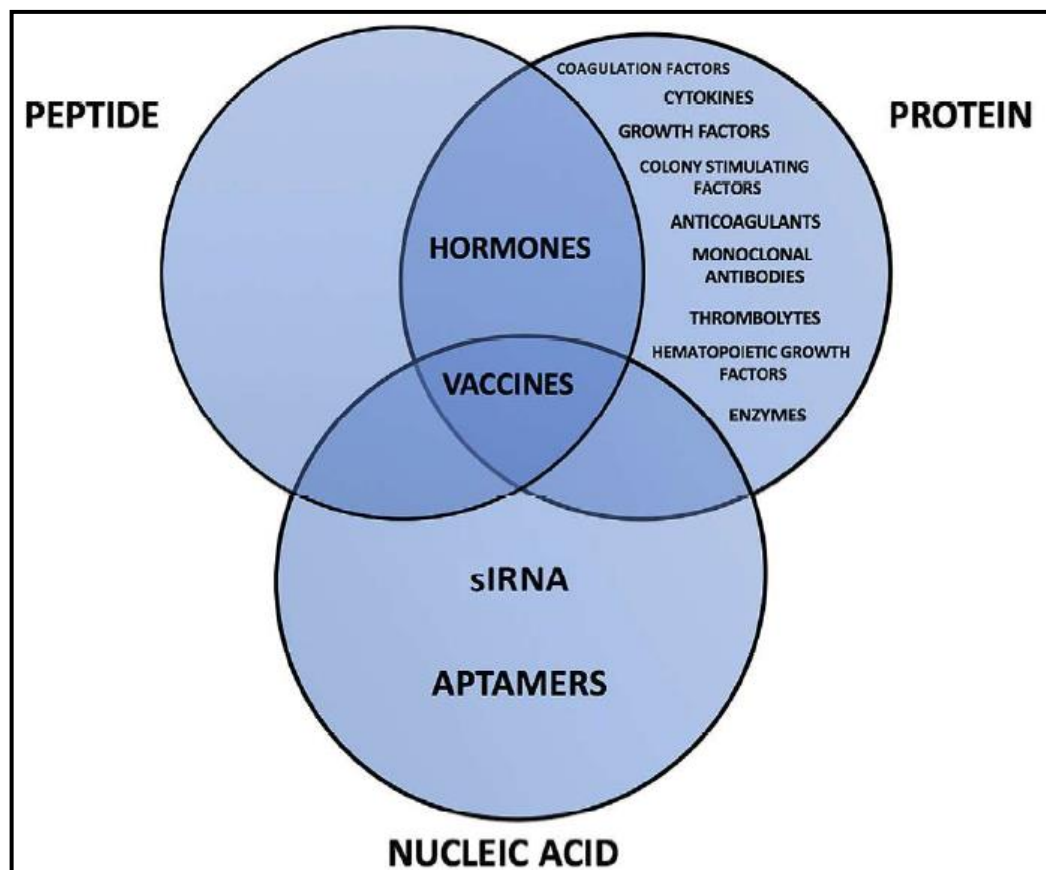


Figura 5. Classes de biofármacos de acordo com sua natureza bioquímica. Diagrama de Venn apresentando as classes biofarmacêuticas dos medicamentos biotecnológicos, que podem ser compostos por peptídeos, proteínas e/ou ácidos nucleicos (BASSO et al., 2016).

O primeiro biofármaco produzido por engenharia genética e aprovado para comercialização foi a insulina recombinante humana, em 1982 nos EUA, utilizando células GM da bactéria *Escherichia coli*, seguido pelo ativador de plasminogênio tecidual, em 1986. Em seguida, diversos outros biofármacos de diferentes classes e com indicações terapêuticas distintas foram sendo produzidos e comercialmente aprovados (CARREIRA et al., 2013), mas, uma vez que grande parte destes medicamentos entrou no mercado farmacêutico nas décadas de 80 e 90 (Figura 6), nos últimos anos uma parcela igualmente significativa de biofármacos atingiram seu período de expiração da patente. E isso abre oportunidades no mercado farmacêutico para que os países desenvolvam seus próprios biofármacos e adquiram independência da importação destes produtos através da produção de uma segunda geração de biofármacos com similaridade aos originais de referência, sendo denominados “biossimilares” (BASSO, 2012).

Biofármaco	Tratamento	Ano de Aprovação
Insulina	Diabetes	1982
Interferon α	Leucemia	1986
Ativador de plasminogênio tecidual (tPA)	Infarto	1986
Hormônio do crescimento humano	Deficiências no crescimento	1987
Eritropoítina	Anemia	1989
G-CSF	Neutropenia	1991
Interleucina 2	Carcinoma renal	1992
Proteína morfogenética óssea (BMP2)	Reparo ósseo	1992
Fator de coagulação VIII	Hemofilia A	1994
Hormônio foliculo estimulante (FSH)	Infertilidade feminina	1995
Interferon β	Esclerose múltipla	1996
Fator de coagulação IX	Hemofilia B	1999
Anticorpo monoclonal	Câncer de mama	1998
Anticorpo monoclonal	Leucemia	2001
Anticorpo monoclonal	Asma	2003

Figura 6. Exemplos dos primeiros biofármacos aprovados para comercialização no mundo. Relação de princípios ativos de biofármacos aprovados para comercialização, em ordem cronológica, indicando a aplicação terapêutica de cada um (CARREIRA et al., 2013).

Os biossimilares são biofármacos de mesmo princípio ativo e com alto grau de similaridade aos biofármacos correspondentes em relação às estruturas bioquímicas, embora sem identidade absoluta devido à impossibilidade de reprodução estrutural de macromoléculas utilizando-se linhagens celulares ou organismos diferentes como sistemas de produção. Porém os biossimilares devem possuir qualidade, biossegurança e atividade biológica equivalentes às dos medicamentos de referência, de forma que possam ser licenciados para a mesma indicação terapêutica e desempenhem sua função com, no mínimo, a mesma eficácia, almejando a intercambiabilidade entre eles (BASSO et al., 2016).

O primeiro biossimilar produzido – Omnitrope[®] (Sandoz[®]), um hormônio de crescimento humano – foi licenciado em 2006, e desde então diversos outros têm sido desenvolvidos, alguns deles lançados e registrados no Brasil, como o Basaglar[®] (Lilly[®]), uma insulina glargina biossimilar ao Lantus[®] (Sanofi[®]). Entretanto, os biossimilares até então criados, em geral, têm apenas sido produzidos internacionalmente e registrados e licenciados no Brasil, por processos de transferência de tecnologia, não sendo desenvolvidos inteiramente

em nível nacional para que sejam licenciados e posteriormente exportados de forma a reduzirem o déficit na balança comercial brasileira em relação a medicamentos.

Como os biossimilares são promissores na redução do custo de medicamentos obtidos por rotas biotecnológicas, em geral sendo em média de 30% a 40% mais baratos que os biofármacos de referência, reforça-se ser estratégico que o Brasil passe a produzi-los visando ao mercado interno e externo, fortalecendo a indústria farmacêutica brasileira (BASSO et al., 2016). Além disso, desenvolver biossimilares se torna crucial especialmente para a classe de mAbs, uma vez que, dentre os medicamentos mais caros do mundo, esta classe é predominante durante todos os anos, com um número expressivo de princípios ativos desta natureza no *ranking* de 2017 (Figura 7).



Figura 7. 20 medicamentos de maior custo no mundo, nos últimos anos. Ilustração dos nomes comerciais dos 20 biofármacos com maior valor em vendas, em âmbito mundial, no *ranking* de 2017, dos quais 8 são baseados em mAbs (IGEA HUB, 2017).

1.3.2. Anticorpos recombinantes e engenharia de anticorpos

Os mAbs são moléculas de imunoglobulina, ou anticorpo, produzidas a partir de um único clone de uma linhagem celular, geralmente obtidos pela tecnologia dos hibridomas e/ou por transfecção celular para engenharia genética. São de grande destaque devido à sua ampla aplicação como biofármacos e devido às suas propriedades bioquímicas, como a avidéz e a alta especificidade (REIS et al., 2009).

A estrutura geral dos mAbs é tradicionalmente baseada em imunoglobulinas da classe *gamma* (IgG) em sua forma completa (Figura 8), consistindo em uma proteína de estrutura quaternária heterotetramérica em forma de “Y”, formada por duas cadeias polipeptídicas de maior peso molecular, com aproximadamente 50 kDa e denominadas cada uma de “cadeia pesada” (ou *heavy chain* – HC), e unidas entre si por pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína, mais duas cadeias polipeptídicas de menor peso molecular, com aproximadamente 25 kDa e denominadas cada uma de “cadeia leve” (ou *light chain* – LC), cada uma unida a uma respectiva cadeia pesada na extremidade C-terminal, também por pontes dissulfeto. A molécula inteira, portanto, possui peso molecular de aproximadamente 150 kDa (ABBAS et al., 2012).

A cadeia pesada é composta por quatro domínios proteicos de aproximadamente 110 resíduos de aminoácidos, cada, sendo o domínio da extremidade N-terminal denominado “domínio variável da cadeia pesada” (V_H) e os outros três seguintes denominados “domínios constantes da cadeia pesada” (C_{H1-3}), de classe *gamma* (γ). No domínio C_{H2}, especificamente, há sítios de N-glicosilação, e entre os domínios C_{H1} e C_{H2} há uma região rica em resíduos de prolina (Pro), denominada “dobradiça”, a qual garante flexibilidade à imunoglobulina. A cadeia leve é composta por dois domínios proteicos de mesmo número médio de resíduos, cada, sendo o domínio da extremidade N-terminal denominado “domínio variável da cadeia leve” (V_L) e o domínio da extremidade C-terminal denominado “domínio constante da cadeia leve” (C_L), de classe *kappa* (κ) ou *lambda* (λ). A fenda formada pela união das regiões V_H e V_L em cada “braço” do anticorpo possui a conformação estrutural que gera a especificidade única ao antígeno, conferida por três subregiões de alta variabilidade genética em cada domínio variável, e denominadas “regiões hipervariáveis”, ou “regiões determinantes de complementariedade” (CDR). Os dois fragmentos (“braços”) formados pelas regiões variáveis e a primeira região constante de cada cadeia são denominados, cada um, “Fab”, e o terceiro fragmento restante, formado por C_{H2} e C_{H3}, é denominado “Fc” (ABBAS et al., 2012).

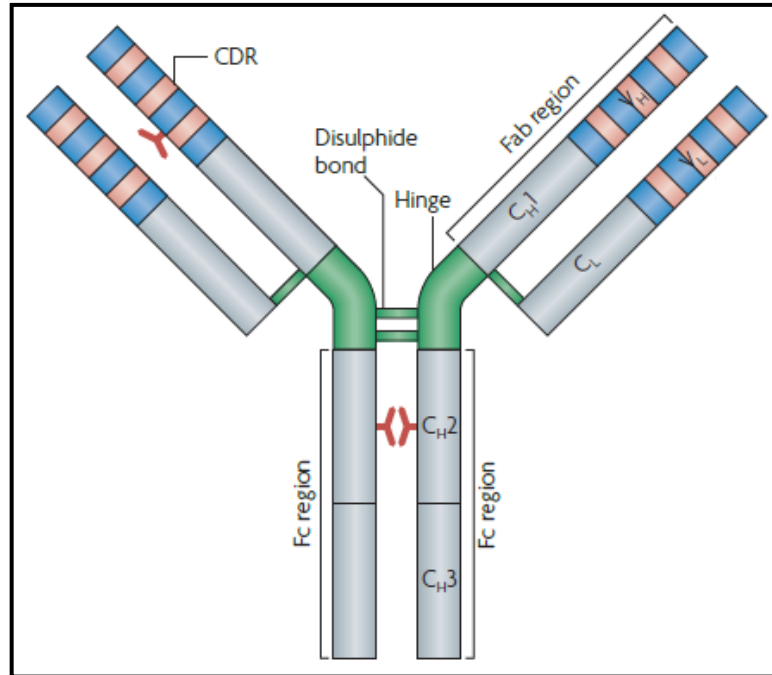


Figura 8. Estrutura geral de uma IgG. Representação esquemática da estrutura quaternária heterotetramérica das IgGs, evidenciando, em cinza, as regiões constantes das cadeias leve (CL) e pesada (CH), e, em azul, as regiões variáveis das cadeias leve (VL) e pesada (VH), com suas respectivas CDRs, em rosa. A região em verde representa a “dobradiça”, bem como as ligações dissulfeto entre as cadeias. Em vermelho, são representados oligossacarídeos adicionados em regiões de N-glicosilação. Os fragmentos Fab e Fc estão indicados na figura. (BECK et al., 2010).

A partir desta estrutura geral, outras estruturas (Figura 9) podem ser geradas para produzir anticorpos recombinantes e com mesma finalidade dos mAbs, por meio da engenharia de anticorpos. Dessa forma, configurações baseadas na decomposição da estrutura geral em fragmentos ou domínios, bem como a alteração da proporção padrão entre cadeias, podem ser “engenheiradas”. Um anticorpo passa a ser denominado simplesmente “recombinante”, portanto, quando produzido por engenharia genética em algum sistema que não se baseie em clones celulares únicos (MA et al., 2003).

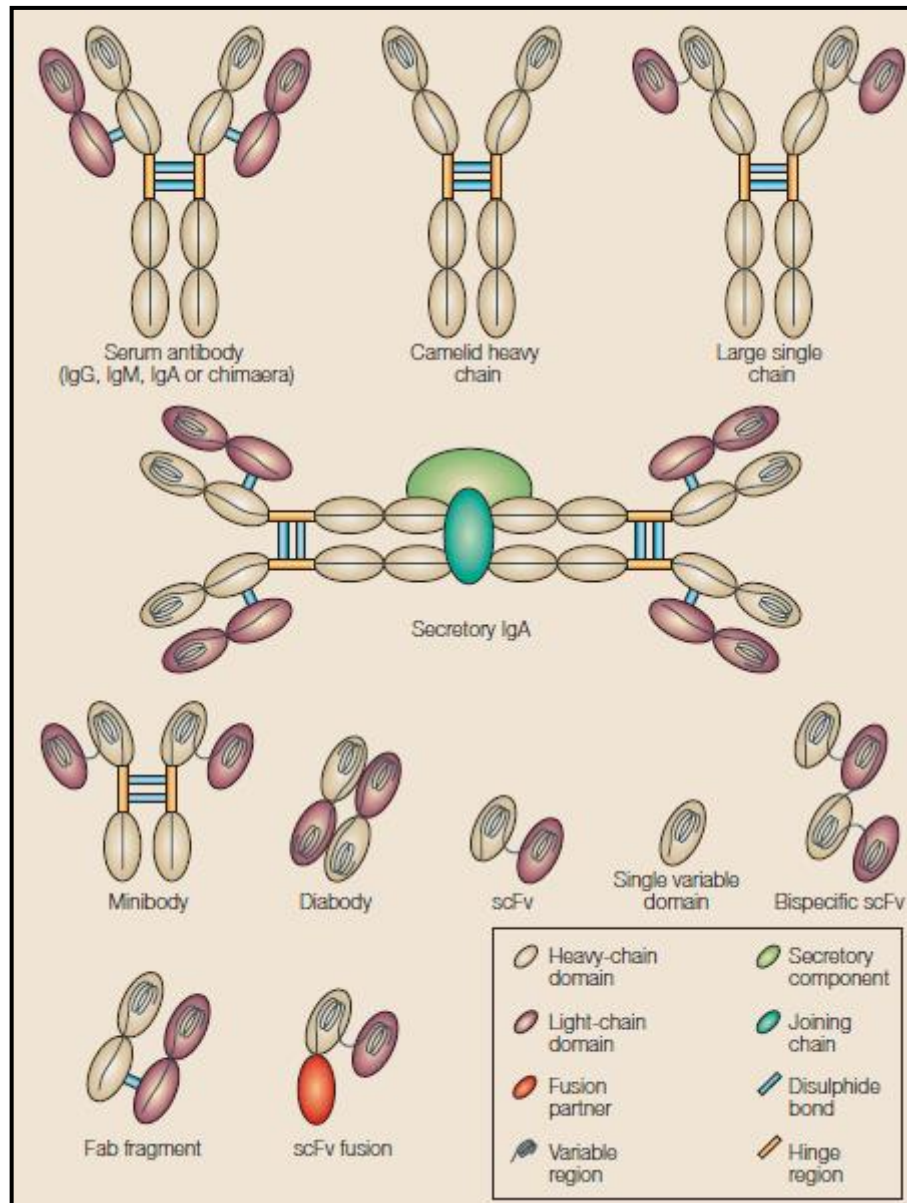


Figura 9. Configurações estruturais de anticorpos recombinantes. Representação esquemática de diferentes configurações possíveis para anticorpos recombinantes produzidos em diferentes organismos. (MA et al., 2003).

1.3.3. Doenças autoimunes e o papel das proteínas anti-TNF- α

As respostas imunológicas a células e tecidos do próprio corpo são denominadas “autoimunidade” e, em indivíduos geneticamente predispostos, mecanismos de autoimunidade podem ser desencadeados a partir de falhas nos processos intrínsecos de tolerância imunológica e/ou fatores ambientais, tais como infecções, desenvolvendo-se as doenças autoimunes, caracterizadas por lesão tecidual, muitas das quais são doenças inflamatórias mediadas por citocinas (MURPHY et al., 2010).

O fator de necrose tumoral α (TNF- α) (Figura 10) é uma citocina pró-inflamatória produzida majoritariamente por macrófagos ativados durante o processo de inflamação sistêmica na fase aguda de reação inflamatória (Figuras 11 e 12), também sendo expresso por outras células do sistema imune, como os linfócitos T. Trata-se de uma proteína com 233 resíduos de aminoácidos e 17 kDa, que se arranja em homotrímeros de 51 kDa, permanecendo nas formas solúvel ou transmembrana. Esta citocina, no entanto, pode ser superexpressa em alguns indivíduos geneticamente predispostos, desencadeando processos patológicos, uma vez que esta desempenha papel fundamental na patogênese de diversas doenças autoimunes inflamatórias (CHU, 2012).

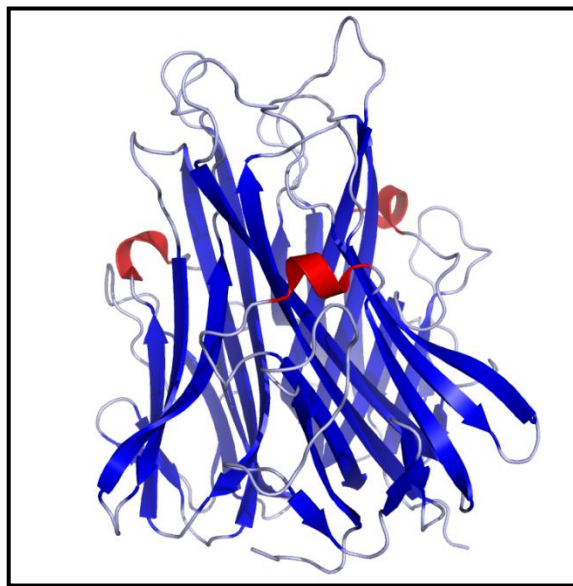


Figura 10. Estrutura cristalográfica do TNF- α . Estrutura tridimensional, obtida por cristalografia, do TNF- α em sua forma homotrimérica, indicando a predominância de folhas- β em sua estrutura terciária. PDB: 1TNF.

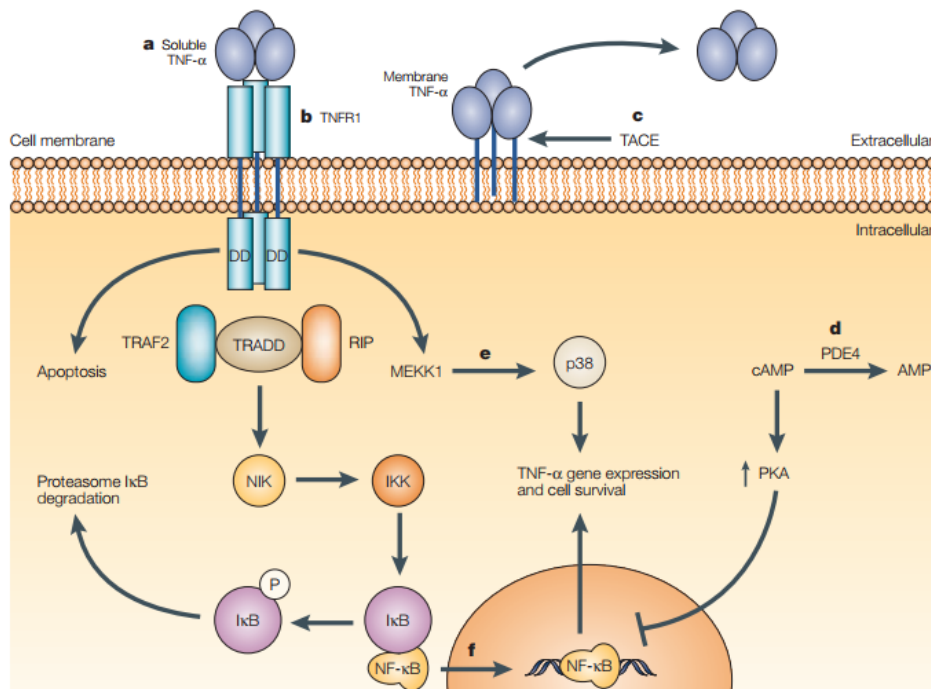


Figura 11. Mecanismos de sinalização celular mediados por TNF- α . Processos de sinalização celular desencadeados pelo estímulo por TNF- α solúvel (a), com ligação ao receptor TNFR1 (b), e TNF- α transmembrânico. A figura mostra a atuação da enzima conversora de TNF- α (TACE), que produz TNF- α solúvel a partir do transmembrânico. Proteínas relacionadas ao receptor (TRAF2, TRADD e RIP) induzem a uma cascata de quinases (NIK e IKK) que ativam o fator de transcrição NF- κ B por meio da fosforilação e inativação proteolítica do inibidor deste fator (I κ B). O NF- κ B atua no estímulo da expressão gênica de TNF- α em *feedback* positivo. O MEKK1 é outra quinase que estimula a proteína p38 a manter a célula viva e expressando TNF- α . Há inibidores (d), (e) e (f) que atuam sobre PDE4, p38 e NF- κ B, respectivamente, inibindo a resposta inflamatória (PALLADINO et al., 2003).

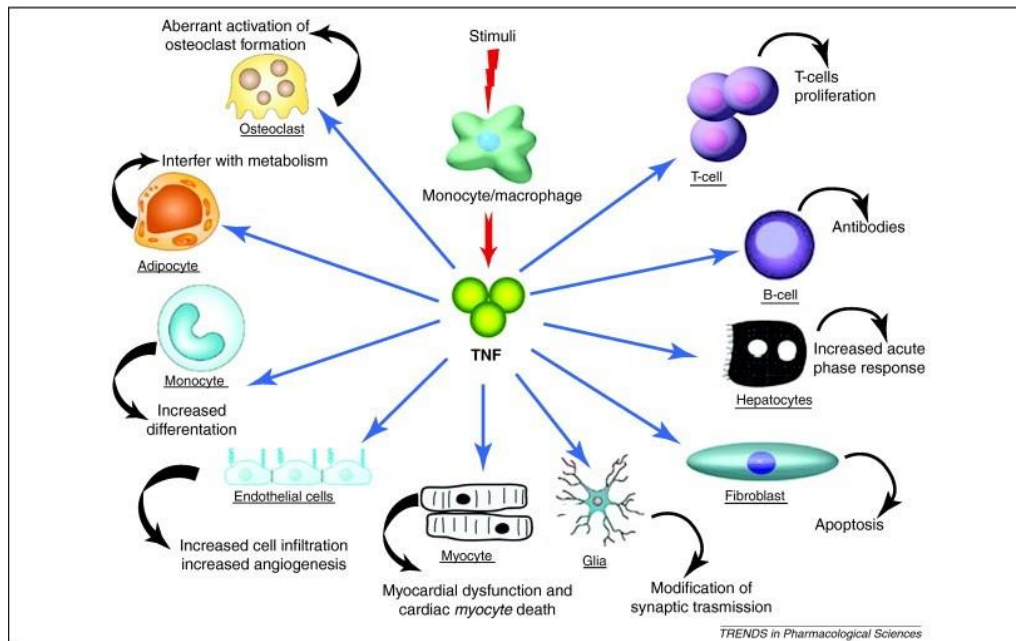


Figura 12. Processos celulares e fisiológicos desencadeados pelo estímulo por TNF- α . Uma vez estimulados e ativados, os macrófagos (e outras células do sistema imunológico) produzem TNF- α , que atua sinalizando mecanismos celulares e fisiológicos por estímulo a células como osteoclastos, adipócitos, monócitos, células endoteliais, miócitos, células da glia, fibroblastos, hepatócitos e linfócitos B e T (ESPOSITO; CUZZOCREA, 2011).

Para o tratamento dessas patologias, recorre-se à neutralização do TNF- α por meio do uso de anticorpos monoclonais com afinidade ao TNF- α solúvel ou transmembrana, denominados “anticorpos anti-TNF- α ”, bloqueando a transdução de sinais inflamatórios (Figura 13). Diversos anticorpos anti-TNF- α e receptores solúveis de TNF- α fusionados à região Fc de IgG têm sido desenvolvidos e aprovados para uso com esta finalidade, sendo os principais: infliximabe (Remicade[®]), etanercepte (Enbrel[®]), adalimumabe (Humira[®]), certolizumabepegol (Cimzia[®]) e golimumabe (Simponi[®]). Destes, os três primeiros persistem entre os 10 primeiros nos *rankings* anuais de medicamentos mais caros do mundo.

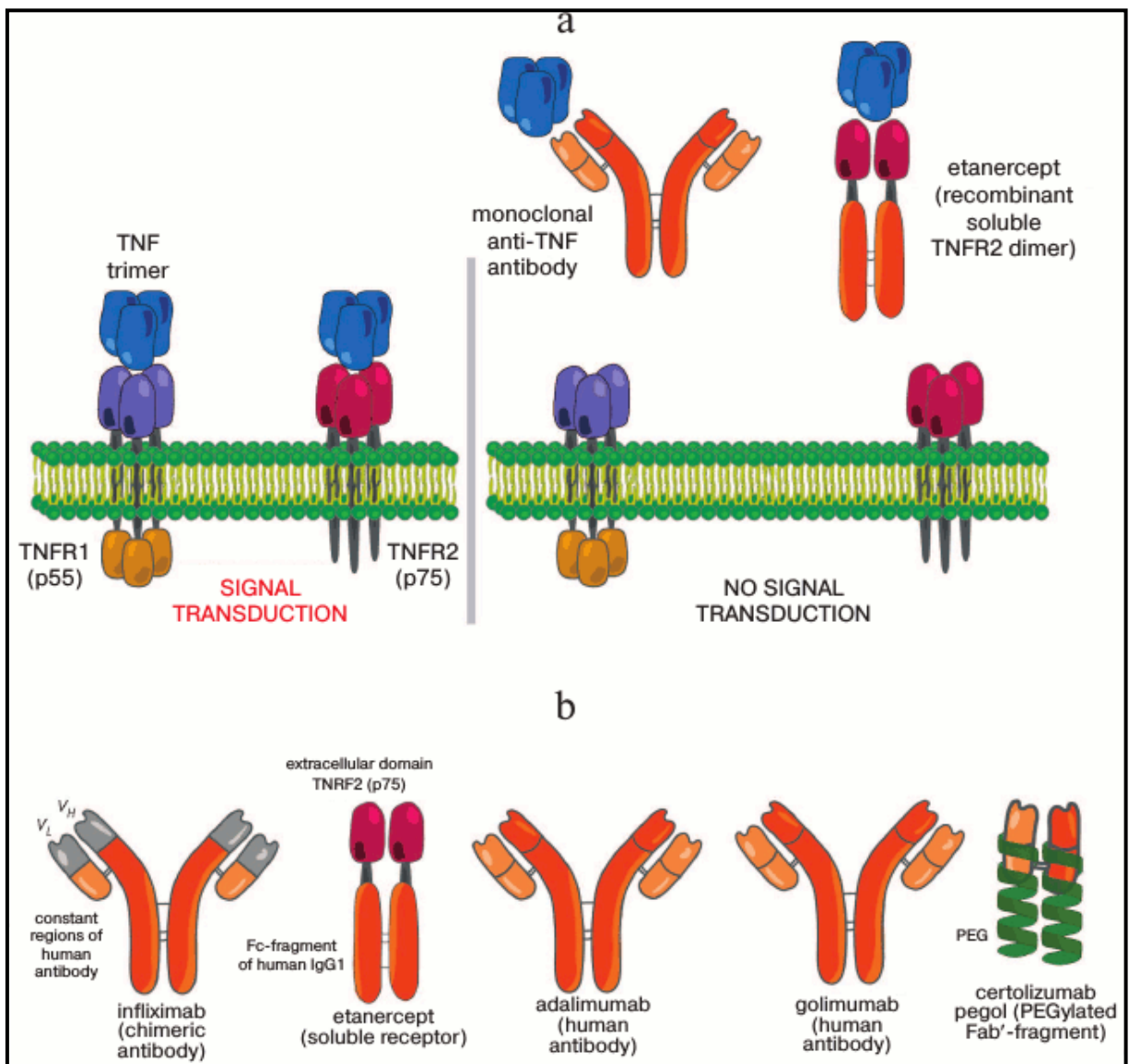


Figura 13. Mecanismo de ação das proteínas anti-TNF- α . (a) Representação esquemática do trimer de TNF- α ligado aos receptores TNFR1 e TNFR2, à esquerda, desencadeando a transdução de sinais, e da neutralização TNF- α solúvel ou transmembrana (não-mostrado) por meio de proteínas anti-TNF- α , à direita, bloqueando a transdução de sinais; (b) Representação esquemática das principais proteínas anti-TNF- α . (ASTRAKHANTSEVA et al., 2014).

1.3.4. Infiximabe

O infiximabe (Remicade[®]) é um mAb quimérico humano-murino da classe IgG1 κ , desenvolvido a partir do hibridoma murino A2. O processo de produção deste anticorpo foi modificado por técnicas de engenharia genética animal e, com isso, uma linhagem celular recombinante foi obtida a fim de otimizar suas propriedades de ligação e neutralização do TNF- α , substituindo-se as regiões constantes murinas por regiões constantes humanas, tanto para LC quanto para HC, gerando-se um anticorpo quimérico (cA2) constituído por 30% de sequências murinas (regiões variáveis) e 70% de sequências humanas (regiões constantes) (KNIGHT et al., 1993).

A partir disso, a produção do infiximabe passou a ser feita por transfecção de células de mieloma de camundongos – células SP2/0 (SHULMAN et al., 1987) – com dois plasmídeos como vetores de expressão: pA2HGlapgpt para HC e pA2HuKapgpt para LC (KNIGHT et al., 1993).

O Remicade[®] foi primeiramente licenciado para o tratamento de pacientes com doença de Crohn, e posteriormente seu uso foi estendido a outras doenças inflamatórias, como artrite reumatoide, artrite psoriática, espondilite anquilosante, colites ulcerativas, psoríase crônica, distrofia muscular e síndromes mielodisplásicas. Assim, este medicamento é considerado uma das principais proteínas anti-TNF- α devido ao seu amplo espectro de ação terapêutica (HSIA et al., 2006). Tornou-se o primeiro biofármaco da classe dos mAbs a ser aprovado para comercialização, pelas empresas Johnson & Johnson[®] e Merck & Co[®], e utilizado para tratar cerca de 700.000 pacientes em 82 países. Este medicamento foi o sexto mais vendido em 2012 (PIMENTEL et al, 2013), representou um custo total de 8,944 bilhões de dólares no mundo em 2013 (GEN, 2014), de 9,2 bilhões de dólares em 2014 e de 6,1 bilhões de dólares em 2016 (UDPA; MILLION, 2016).

Dentre os anticorpos recombinantes mais vendidos no mundo, há cinco com data de expiração de patente prevista para os anos de 2018 e 2019. Destes, o infiximabe teve sua patente expirada em 2015, na União Europeia, e sua patente nos EUA expirará em 2018 (UDPA; MILLION, 2016), abrindo oportunidades para o desenvolvimento de seus biossimilares, conforme está ocorrendo em diferentes países (GEN, 2014). No caso do infiximabe, há 13 biossimilares sendo desenvolvidos em alguns países, sendo que outros 5 já foram desenvolvidos, todos utilizando células de mamíferos: Remsima[™] (Celltrion[®]), Inflectra[™] (Hospira[®]), Flixabi[™] (Biogen[®]), Renflexis[™] (Merck[®]) e Ixifi[™] (Pfizer[®]).

(SCHULZE et al., 2016; UDPA; MILLION, 2016; LEE et al., 2017). Entretanto, nenhum biossimilar do infliximabe foi ainda desenvolvido inteiramente no Brasil para que seja aprovado e comercializado.

1.4. ENGENHARIA GENÉTICA E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS

Diversas ferramentas biotecnológicas baseadas em engenharia genética podem ser utilizadas em Agricultura, pela obtenção de variedades GM expressando moléculas que confirmam resistência a estresses bióticos como insetos-praga, por exemplo, e na Saúde Humana, pela produção de moléculas terapêuticas, por exemplo. Uma destas ferramentas, a transformação genética, consiste na introdução de ácidos nucleicos naturais ou sintéticos em um genoma receptor, excetuando-se mecanismos de reprodução sexuada. Este processo ocorre em duas etapas: a transferência gênica, que consiste na transfecção do material genético para o meio intracelular, e a integração genômica, que consiste na recombinação do ácido nucleico exógeno com o genoma do hospedeiro (BRASILEIRO; DUSI, 1999).

Embora haja obstáculos para a efetividade da transformação genética, como a eficiência da transformação – número de células transformantes em relação ao total de células submetidas à transformação – e a aleatoriedade do local de integração genômica, que pode interferir no nível de expressão gênica, os genes exógenos podem ser originados ou inseridos em qualquer organismo, como bactérias, fungos, vírus, protozoários, algas, animais e plantas (PRADO, 2013).

As plantas, por sua vez, são organismos versáteis para propósitos envolvendo transformação genética e, embora possuam uma barreira física adicional significativa – parede celular – em relação a outros organismos para a transferência gênica, possuem organelas celulares diferenciais, realizam modificações pós-traducionais complexas e peculiares e possuem alta capacidade de multiplicação devido à sua regeneração celular via cultivo de explantes. Adicionalmente, sua capacidade regenerativa e sua transformação genética desencadeiam consequências fisiológicas menos drásticas do ponto de vista bioético, o que elimina parte das preocupações referentes à biossegurança (AHMAD et al., 2012).

A transformação genética de plantas permite, portanto, a regeneração de plantas denominadas “transgênicas” ou GM. Para a obtenção de plantas transgênicas, algumas etapas básicas devem ser cumpridas: (1) o isolamento dos genes de interesse, (2) a clonagem destes genes em um vetor de expressão que contenha elementos genéticos – sequências regulatórias como promotores, terminadores, genes marcadores de seleção – apropriados, (3) a transfecção

celular com este vetor, com base em métodos diversos de transformação genética e (4) a seleção e regeneração de transformantes (ANDRADE; FALEIRO, 2011).

1.5. EXPRESSÃO HETERÓLOGA

1.5.1. Expressão estável e expressão transiente

As proteínas são macromoléculas orgânicas com atividade funcional diversa, podendo ser amplamente utilizadas nas variadas áreas da Biotecnologia quando se objetiva a obtenção de um produto biotecnológico. Algumas proteínas, entretanto, são difíceis ou até mesmo impossíveis de serem produzidas naturalmente em determinados organismos devido, respectivamente, ao baixo nível de expressão e/ou toxicidade intrínseca destas na forma nativa, ou à inexistência de uma isoforma desejada na natureza. Sendo assim, a produção de proteínas na forma recombinante se torna uma alternativa para contornar estes obstáculos. Para isso, há duas formas de expressar proteínas recombinantes, variando de acordo com o objetivo final de se produzir a proteína e com o método de introdução dos genes correspondentes no organismo hospedeiro: expressão estável e expressão transiente.

A expressão estável ocorre necessariamente mediante um processo de transformação genética, como ocorre em plantas transgênicas, havendo transferência vertical do transgene inserido, por herança mendeliana, indicando estabilidade do gene inserido, o que exige um meio seletivo contendo antibióticos ou herbicidas para seleção e regeneração de transformantes com base em um gene marcador de seleção inserido conjuntamente. Por outro lado, a expressão transiente pode ocorrer mediante transformação genética sem que haja transferência vertical do transgene ou ainda sem a integração deste no genoma do hospedeiro, de forma que o gene exógeno permaneça episomal ou extracromossômico. Neste caso, problemas de biossegurança podem ser reduzidos, já que se elimina a problemática da transmissão do transgene ao meio ambiente, uma vez que há a contenção deste. Enquanto na expressão estável os níveis de expressão são relativamente baixos, em geral, na expressão transiente os transgenes apresentam níveis mais altos de expressão, a qual se inicia após cerca de 3 horas, com o gene permanecendo transcricionalmente ativo por aproximadamente 10 dias (KOMAROVA et al., 2010; HABIBI et al., 2017).

1.5.2. Sistemas de expressão heteróloga

De forma a se obterem proteínas recombinantes com estrutura e função satisfatórias, os métodos de produção destas se baseiam no uso de diversos sistemas de expressão

heteróloga, que consistem em organismos que recebem um gene exógeno codificante de uma proteína de interesse, passando a expressá-lo. A expressão heteróloga, portanto, consiste na expressão de um gene em um organismo diferente do qual o gene exógeno é proveniente (VIANA et al., 2012).

Uma vez que a maioria dos genes pode ser expressa em organismos variados, torna-se essencial determinar qual sistema de expressão fornece maiores vantagens para a produção da proteína de interesse na forma recombinante esperada, e, portanto, a seleção do sistema constitui uma etapa crucial neste processo. Diferentes micro-organismos podem ser utilizados para este propósito. Destes, a bactéria *Escherichia coli* se destaca entre os sistemas bacterianos, sendo utilizada classicamente na produção de um vasto conjunto de moléculas. Fungos filamentosos como *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp., bem como as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*, constituem os principais sistemas fúngicos. O protozoário *Leishmania tarentolae* tem sido um sistema de expressão emergente. Células de insetos como *S. frugiperda* e *Trichoplusia ni* são, também, bastante eficientes para produção de altos níveis de proteínas recombinantes mediada por baculovírus (BASSO et al., 2016).

As células de mamíferos também são sistemas bem-estabelecidos, sendo as linhagens CHO, HEK, e SP2/0 algumas das mais utilizadas. Entretanto, animais e plantas constituem os sistemas de expressão mais adaptados à expressão de proteínas recombinantes em larga escala, por meio de *molecular farming*. Em ambos, as proteínas podem ter sua expressão direcionada para tecidos específicos, com o uso de alguns promotores, ou ainda endereçados em nível subcelular para organelas específicas, com o uso de peptídeos-sinal (BASSO et al., 2016).

Adicionalmente, em cada sistema de expressão, as proteínas recombinantes podem sofrer variações estruturais no que se refere às suas modificações pós-traducionais, uma vez que alguns sistemas, como os procarióticos, são incapazes de realizar a maioria destas modificações, e outros, como os eucarióticos, diferem significativamente em seu perfil de processamento, uma vez que este está associado a organelas celulares peculiares e perfil bioquímico. Destas modificações pós-traducionais, destaca-se a N-glicosilação, que possui variação ampla entre e dentro de cada sistema, produzindo diferentes perfis de N-glicanos (Figura 14) de acordo com a sublocalização e natureza da molécula (AEBI, 2013). Estes consistem em oligossacarídeos incorporados a resíduos de asparagina (Asn) ao longo da macromolécula no retículo endoplasmático rugoso (RER) e no complexo de Golgi. Este

processamento ocorre em glicoproteínas, que constituem a maioria das proteínas, e sua possibilidade de ocorrência é condicionada à existência de séquons de N-glicosilação ao longo da cadeia polipeptídica, que consistem no consenso Asn-X-Ser/Thr (N-X-S/T), em que X é qualquer aminoácido exceto a prolina (Pro). A importância da N-glicosilação se deve ao impacto causado na estrutura e funcionalidade da proteína, bem como em suas propriedades físico-químicas (AEBI, 2013; BOSCH et al., 2013).

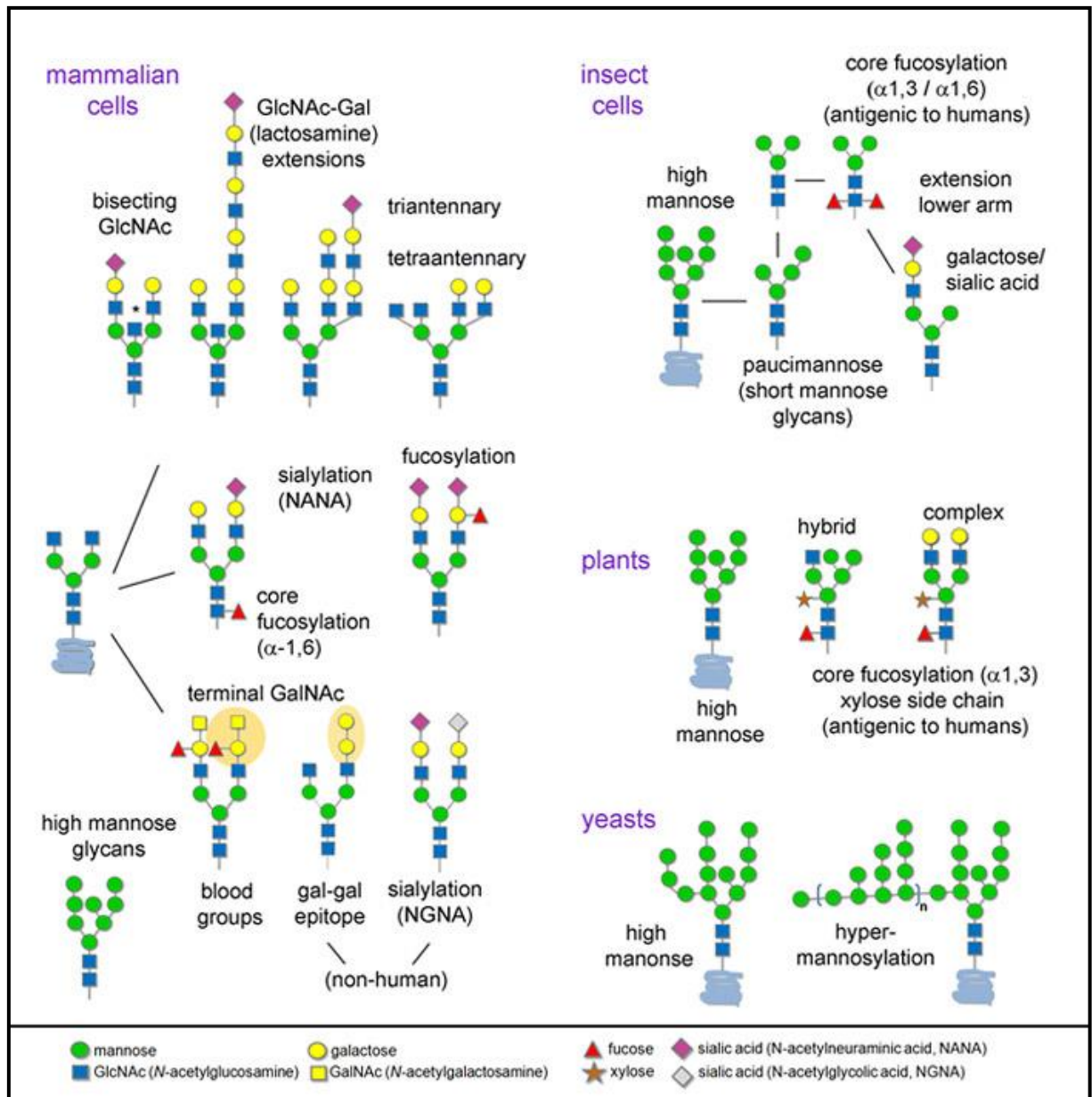


Figura 14. Padrões de N-glicosilação em diferentes sistemas de expressão. Glicoformas típicas encontradas para proteínas em diferentes sistemas de expressão, sendo que alguns destes padrões de N-glicosilação podem ocorrer em uma mesma molécula. As células de mamífero possuem maior diversidade de padrões de N-glicosilação, e alguns resíduos e suas ligações são peculiares de outros sistemas, como o resíduo de xilose e de α -1,3-fucose em plantas. Fonte: <https://www.neb.com/applications/glycobiology-and-proteomics/glycoprotein-production-in-various-expression-systems/expression-systems>.

1.5.3. Expressão de proteínas recombinantes em plantas

A maioria dos sistemas de expressão apresenta uma série de limitações relacionadas à capacidade de produção de proteínas mais complexas em quantidade e qualidade satisfatórias e com custo de produção e tempo de desenvolvimento viáveis ao escalonamento industrial e aos propósitos comerciais, por exemplo. Dessa forma, a adoção da engenharia genética de plantas para o estabelecimento de sistemas vegetais de expressão se torna uma alternativa promissora devido às várias vantagens oferecidas por estes organismos em relação a outros sistemas, tornando o processo de produção mais econômico. Isso porque as plantas são sistemas de expressão que apresentam facilidade relativa de transformação e garantem fonte proteica a baixo custo, uma vez que possuem baixo custo relativo de cultivo e de manutenção, facilidade de escalonamento, geram produtos proteicos livres de patógenos humanos, possuem biomassa relativamente elevada, geram altos níveis de expressão, geralmente, e têm acurácia no processamento de proteínas por meio de modificações pós-traducionais complexas (KARG; KALLIO, 2009; VIANA et al. 2012; SACK et al., 2015).

Com base nisso, os sistemas vegetais têm sido utilizados amplamente nos últimos anos para produzir proteínas recombinantes com diversas finalidades. Para isso, a expressão de proteínas heterólogas tem sido conduzida em várias plataformas vegetais nas últimas décadas, fazendo uso de folhas, sementes e cultura de células em suspensão (MADEIRA, 2008; BOOTHE et al., 2010; WILKEN; NIKOLOV, 2012), por meio de metodologias de transformação distintas, sendo os métodos baseados em *Agrobacterium tumefaciens* e o bombardeamento de partículas (ou biobalística) os mais comuns (POGUE et al., 2010).

Por outro lado, embora as plantas sejam vantajosas para a produção de variantes moleculares voltadas ao controle de insetos-praga na Agricultura e de moléculas biofarmacêuticas na Saúde Humana, a expressão estável baseada na produção de plantas transgênicas para *screening* e biofábricas de macromoléculas nem sempre é a alternativa mais útil, considerando-se os baixos níveis de expressão e o fato de a regeneração de plantas transformantes ocorrer em longo prazo. Sendo assim, para se caracterizar de forma acurada estas proteínas recombinantes e obtê-las em grande quantidade, os sistemas vegetais baseados na expressão transiente se tornam as melhores alternativas e fornecem uma redução do tempo e custo de produção (DANIELL et al., 2009).

Por fim, no caso de glicoproteínas terapêuticas, algumas ferramentas moleculares para glicoengenharia de proteínas são utilizadas de forma a reduzir ou até mesmo eliminar a

imunogenicidade dessas moléculas, levando em conta que os resíduos glicídicos típicos do padrão de N-glicanos em plantas incorporados na proteína podem desencadear graus de alergenicidade e toxicidade após a administração em mamíferos. Com isso, contorna-se um problema de biossegurança e as proteínas passam a ser mais seguras para uso terapêutico humano, já que seu padrão de N-glicosilação se torna mais próximo ao encontrado em proteínas humanas (WALSH; JEFFERIS, 2006).

Dentre estas ferramentas, destacam-se a aglicosilação – por eliminação *in silico* dos séquons de N-glicosilação ou por deglicosilação enzimática da glicoproteína *ex vivo* –, o silenciamento gênico para *knockout* de genes de glicosiltransferases do hospedeiro e que incorporam os resíduos de β -1,2-xilose (xilosiltransferase) e α -1,3-fucose (fucosiltransferase) e o uso de peptídeos-sinal de retenção das proteínas heterólogas no RER, de forma que não sejam processadas pelas enzimas citadas, as quais atuam nas faces medial e *trans* do complexo de Golgi (KO et al., 2008). Alguns destes peptídeos-sinal são KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu), HDEL (His-Asp-Glu-Leu) e SEKDEL (Ser-Glu-Lys-Asp-Glu-Leu), sendo fusionados na extremidade C-terminal de proteínas secretórias (DENECKE et al., 1992).

1.5.4. *Agrobacterium tumefaciens*

Para a expressão de proteínas recombinantes em plantas, tanto de forma estável quanto de forma transiente, a abordagem mais comumente utilizada é baseada em um método biológico e indireto, que faz uso da bactéria de solo *A. tumefaciens* como vetor biológico do material genético exógeno. Esta bactéria é Gram-negativa, aeróbia, possui formato de bacilo, flagelo e pertence à biovar 1 das linhagens de *Agrobacterium* spp. Em condições naturais, causa uma doença denominada “galha-da-coroa” (*crown gall*), com crescimento de tumores na região da coroa de algumas espécies de plantas. Estes tumores se devem à transformação genética com oncogenes, a qual a agrobactéria realiza em células de tecidos lesionados na planta hospedeira, em um processo de “engenharia genética natural” (SANTOS; TORRES, 2007).

O processo de transformação genética se baseia em um plasmídeo de aproximadamente 200 kpb denominado “plasmídeo Ti” (*tumor-inducing*) existente em *A. tumefaciens*. Este plasmídeo possui uma “região-T”, que é flanqueada por duas sequências repetidas e invertidas de 25 pb, denominadas “fronteira esquerda” (*left border* – LB) e “fronteira direita” (*right border* – RB). Internamente a estas sequências estão os oncogenes, responsáveis pela biossíntese de hormônios (auxinas e citocininas) e de opinas. Fora da região-T, há uma origem de replicação, uma região de incompatibilidade plasmidial, um gene

para catabolismo de opinas e um operon – operon *vir* – composto por 8 genes responsáveis pela virulência da agrobactéria (*virA-virH*) (SLUYS, 1999).

Neste processo, o exsudato de lesões teciduais libera moléculas sinalizadoras que consistem em açúcares e compostos fenólicos como a lignina, acetosseringona, hidroxiaacetosseringona e flavonoides. Estas moléculas desencadeiam a fosforilação do domínio intracelular da proteína transmembrana VirA, expressa constitutivamente de forma basal na bactéria. Esta proteína, por sua vez, fosforila a proteína VirG, que é livre no citosol e, uma vez fosforilada e ativada, regula a ativação de outros genes do operon *vir*. Ocorre, então, a transcrição e tradução dos genes de virulência, cujas proteínas participam da excisão da região-T como fita-simples a partir de LB e RB. A proteína VirD2 se liga à extremidade 5' da fita, protegendo-a contra degradação por exonucleases, e as proteínas VirE e VirF atravessam os poros formados entre a célula bacteriana e a célula vegetal pela proteína transmembrana VirB. A região-T associada a VirD2 também é translocada para o meio intracelular da célula hospedeira por meio de um sistema de secreção tipo IV, e em seguida proteínas VirE2 translocadas recobrem toda a superfície da região-T, formando o complexo-T, protegendo-a também contra a ação de endonucleases da planta. O complexo-T é transportado até o interior do núcleo celular, a fita de DNA é liberada e se recombina com o genoma hospedeiro para integração, e a sequência exógena passa a ser denominada “T-DNA”, concluindo o processo de transformação genética (GELVIN, 2003; McCULLEN; BINNS, 2006).

Os oncogenes, uma vez recombinados na célula vegetal, levam à biossíntese das substâncias responsáveis pelo crescimento dos tumores, fornecendo fonte nutricional para o patógeno, que cataboliza as opinas sintetizadas (GELVIN, 2003; McCULLEN; BINNS, 2006). Este processo é modificado visando à expressão de proteínas recombinantes, obtendo-se linhagens desarmadas de *A. tumefaciens*, ou seja, cujos oncogenes foram retirados e substituídos por genes que codificam proteínas de interesse, de forma que estes genes sejam transferidos às células vegetais para sua transformação genética e sejam traduzidos nas proteínas correspondentes.

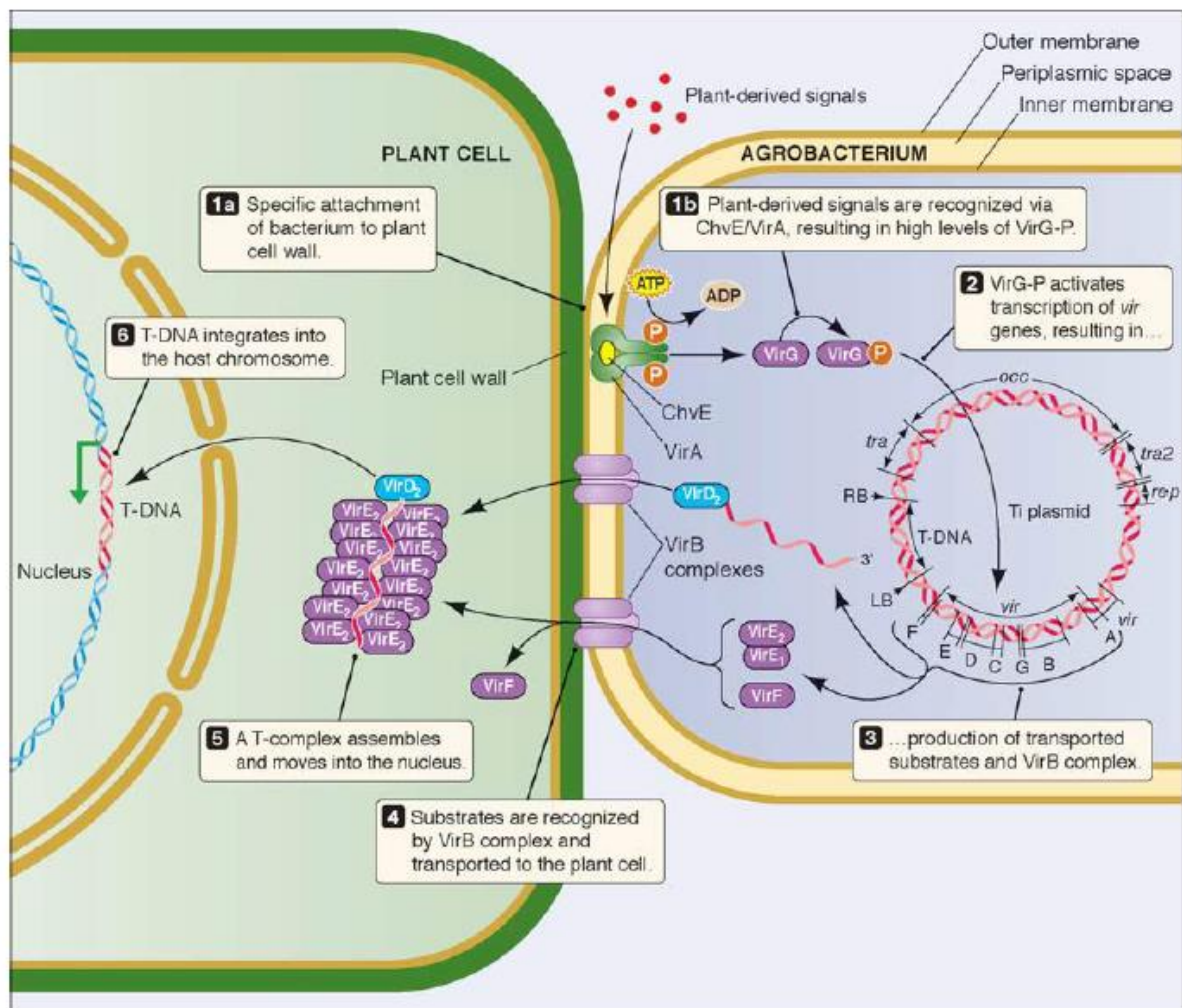


Figura 15. Mecanismo de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Esquematização do mecanismo de transferência da região-T para a célula vegetal hospedeira e transformação genética da planta. As etapas do mecanismo, detalhando as proteínas envolvidas no processo e suas funções, estão descritas sequencialmente na figura (McCULLEN; BINNS, 2006).

1.6. AGROINFILTRAÇÃO

A agroinfiltração é um método de produção de proteínas recombinantes em plantas, bem-estabelecido e tradicionalmente usado para expressão transitente, e baseia-se no *delivery* de plasmídeos contendo genes de interesse mediado por *A. tumefaciens*, sendo um método simples, rápido e barato (FISCHER et al., 1999). Para conduzir a agroinfiltração, suspensões celulares da agrobactéria têm sua virulência estimulada pela adição de um sinalizador celular, comumente a acetossiringona (3,5-dimetóxi-4-hidroxiacetofenona), mimetizando condições de lesão tecidual, e em seguida infiltradas nos tecidos foliares de uma planta hospedeira. Uma vez infiltradas, as células dos tecidos foliares são transformadas geneticamente seguindo o mecanismo de infecção por *A. tumefaciens* e passam a expressar o gene exógeno de forma transitente. Geralmente, a infiltração é conduzida utilizando-se uma seringa sem agulha, sob

vácuo ou pelo método *wound-and-agrospray*, que consiste em lesionar as células foliares por pulverização de partículas sólidas antes que os tecidos sejam expostos à suspensão bacteriana (KOMAROVA et al., 2010).

As espécies mais utilizadas em agroinfiltração são o tabaco selvagem (*Nicotiana benthamiana*) e a alface (*Lactuca sativa*), devido principalmente à superfície foliar e à facilidade de infiltração, embora outras como *N. tabacum*, *N. clevelandii*, *Spinacia oleraceae* e *Vigna unguiculata* também sejam utilizadas eventualmente. Entretanto, em *Nicotiana* spp. os genes exógenos estão sujeitos ao silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) desencadeado pelo hospedeiro, impedindo a acumulação de transcritos dos genes de interesse e reduzindo drasticamente o nível de expressão das proteínas correspondentes. Portanto, uma maneira de garantir que o nível de expressão se intensifique, sem que haja interferência da maquinaria molecular do hospedeiro, é pelo bloqueio do PTGS a partir da coexpressão de supressores virais de silenciamento gênico, aumentando o rendimento final da proteína de interesse. Estes supressores consistem em proteínas virais que atuam, via mecanismos variados, em diferentes etapas das vias de PTGS (Figura 16), sendo as proteínas P19 de *Tombusvirus* e P1/HC-Pro de *Potyvirus* algumas das mais utilizadas (KOMAROVA et al., 2010; BURGYÁN; HAVELDA, 2011).

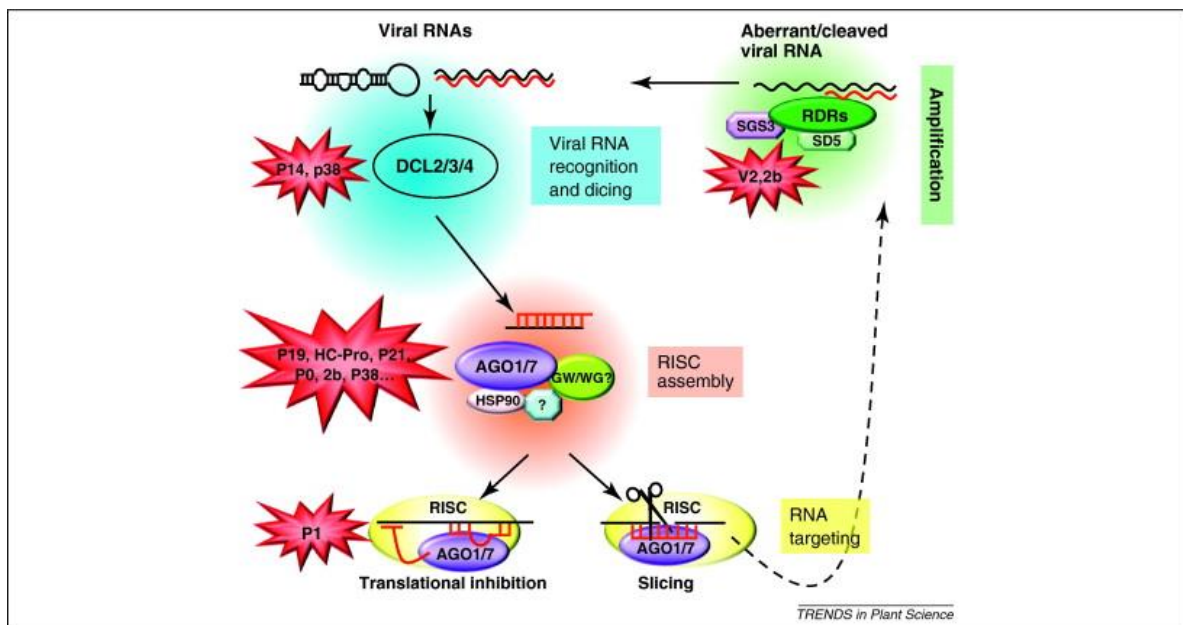


Figura 16. Atuação de supressores virais nas vias de silenciamento gênico. Esquematização das vias de silenciamento gênico em plantas, evidenciando, em vermelho, exemplos de supressores virais de silenciamento gênico que atuam em cada etapa do PTGS. (BURGYÁN; HAVELDA, 2011).

Embora o nível de expressão das proteínas recombinantes possa ser intensificado com o uso de supressores virais, o bloqueio do PTGS nas plantas é temporário, com o rendimento da proteína de interesse sendo reduzido após alguns dias. Com isso, pode ser realizado o acoplamento da agroinfiltração ao uso de vetores baseados em vírus (replicons virais) em um processo denominado “agroinfecção”. Neste procedimento, o método de agroinfiltração é realizado da mesma forma, porém com um genoma viral contendo o gene de interesse e clonado como DNA complementar (cDNA) na região-T do plasmídeo/vetor de expressão inserido em *A. tumefaciens*, de forma que todo o genoma viral recombinante seja transferido às células hospedeiras (MALLORY et al., 2002).

Na agroinfecção, um número considerável de genomas virais pode ser utilizado como veículo do gene de interesse, sendo vantajosos devido ao tamanho relativamente pequeno destes, com fácil manipulação, processo infeccioso eficaz e simples, além da alta capacidade replicativa do material genético viral, amplificando o gene de interesse de forma concomitante. Para a clonagem dos genes de interesse nos replicons virais, podem ser utilizadas 3 estratégias: (1) substituição gênica, em que genes virais não-essenciais são removidos e substituídos pelo gene de interesse; (2) inserção gênica, em que o gene de interesse é colocado sob o controle de um promotor subgenômico; (3) fusão gênica, em que o gene de interesse é fusionado a um gene viral, expressando uma proteína de fusão (LICO et al., 2008).

Os replicons virais, uma vez transferidos à célula hospedeira, se replicam independentemente do genoma, permanecendo epissomais no citoplasma e levando a um nível exponencial e acelerado de tradução gênica. As partículas virais montadas carregam o genoma viral contendo o gene de interesse, se dispersando sistemicamente pela planta via movimento célula-célula mediado por proteínas virais de movimento (Figura 17) (GLEBA et al., 2007).

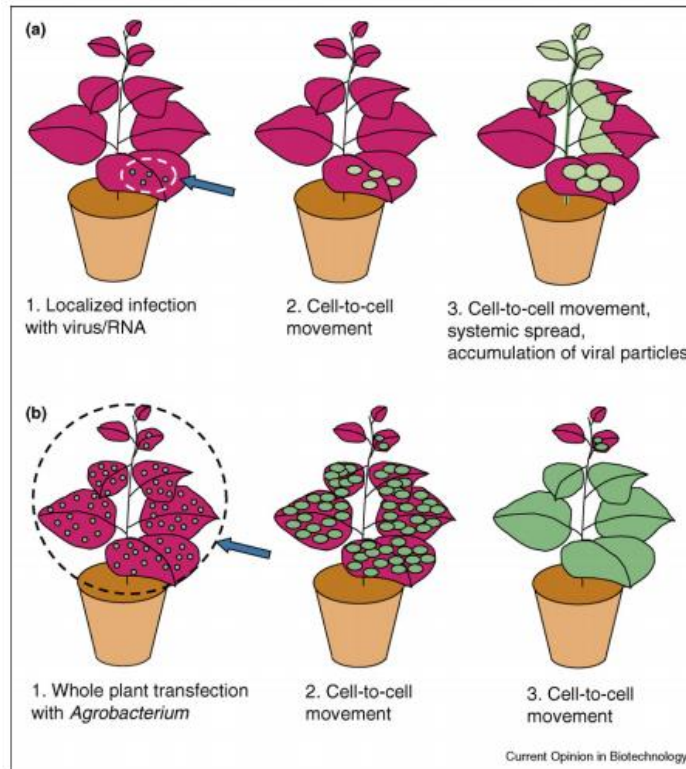


Figura 17. Procedimento de agroinfecção. Esquemática da dispersão sistêmica de replicons virais após a agroinfecção localizada (a) ou em diversos pontos de infiltração nos tecidos foliares (b) (GLEBA et al., 2007).

Os primeiros vetores virais para agroinfecção foram baseados em genomas de vírus da família Caulimoviridae, e desde então outros sistemas replicativos foram desenvolvidos a partir de genomas virais de gêneros como *Potexvirus*, *Tobamovirus*, *Comovirus*, *Potyvirus*, *Tobravirus*, *Geminivirus* e *Closterovirus*, tanto como vírus independentes – com o genoma viral nativo e capaz de produzir partículas virais que se dispersam sistemicamente – quanto como vírus mínimos – com o genoma desconstruído e ausente de genes dispensáveis, aumentando-se a carga genética heteróloga, porém desprovidos da capacidade de dispersão. Após a primeira geração de replicons virais, outras plataformas de segunda geração foram desenvolvidas, como o sistema magnICON[®], baseado no genoma otimizado de *Tobacco mosaic virus* (TMV) (KOMAROVA et al., 2010; HEFFERON, 2012).

Entretanto, os replicons virais disponíveis, em geral, foram desenvolvidos com compatibilidade de replicação em dicotiledôneas e se encontram protegidos por propriedade intelectual, não havendo ainda um sistema bem-estabelecido para replicação em monocotiledôneas e que seria passível de proteção patentária e, portanto, estratégico para a geração de novos produtos biotecnológicos.

2. JUSTIFICATIVA

A Biotecnologia constitui uma ferramenta fundamental para o desenvolvimento econômico em âmbito mundial, seja por gerar inovações na área de Agricultura com a produção de plantas geneticamente modificadas apresentando resistência a estresses bióticos e abióticos ou aumento de produtividade e qualidade nutricional, seja por gerar inovações na área de Saúde com a produção de medicamentos biotecnológicos utilizados no tratamento de inúmeras doenças. Com o uso da engenharia genética, diversas moléculas e plantas transgênicas produtoras dessas moléculas, bem como diversos biofármacos, já foram obtidos e demonstraram ser altamente promissores em nível comercial.

Entretanto, no setor de Agricultura o Brasil necessita manter ou avançar sua posição como produtor mundial de inúmeras cultivares do agronegócio, o qual é responsável por uma porção significativa da economia brasileira – como a balança comercial e participação no PIB – e tem grande impacto social. No setor de Saúde Humana, embora a indústria farmacêutica mundial tenha investido maciçamente no desenvolvimento de medicamentos biotecnológicos nos últimos anos, em nível nacional estes biofármacos ainda correspondem a uma grande parcela de gastos do Sistema Único de Saúde (SUS), por meio do qual são disponibilizados à população brasileira devido à elevada dificuldade de aquisição pelos pacientes, especialmente da população de baixa renda, uma vez que o custo destes medicamentos é extremamente alto.

Portanto, uma vez que grande parte das patentes de biofármacos encontra-se em fase de expiração e que o Brasil importa a maioria destes medicamentos, torna-se crucial e estratégico investir e consolidar a produção de medicamentos biossimilares em escala nacional, o que poderá reduzir os gastos gerados com importação e promover o crescimento da indústria farmacêutica brasileira, reduzindo a dependência externa do país e suprimindo a demanda interna. Com isso, esta estratégia potencializará o Brasil ao torná-lo competitivo na exportação de tais produtos biotecnológicos e contribuir para reerguer sua economia por meio de uma balança comercial favorável, tal como ocorre no setor agropecuário.

Dessa forma, o estudo e a caracterização de novas moléculas de interesse agrônômico, bem como a produção de biossimilares de anticorpos recombinantes, são prioritários e estratégicos, já que aquelas, a exemplo dos inibidores de α -amilase, são promissoras no controle de insetos-praga e outros fatores bióticos, e estes, a exemplo dos anticorpos anti-TNF- α , estão entre os medicamentos de maior custo no mundo. Sendo assim, a adoção de sistemas vegetais de expressão heteróloga e o desenvolvimento de estratégias de

intensificação da maquinaria molecular de expressão para a produção de ambas as moléculas podem contribuir para a competitividade do Brasil no mercado agropecuário e farmacêutico devido à viabilidade técnico-científica e industrial que estes sistemas oferecem nestes setores, respectivamente.

Por fim, a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia, aliada à necessidade de preservar o *status* brasileiro de referência no agronegócio e à necessidade de não apenas reduzir gastos com a importação de biofármacos como também de se tornar um fornecedor destes, estabelece alternativas para o fortalecimento da bioindústria brasileira, gerando externalidades e contribuindo para o desenvolvimento econômico e para o dinamismo industrial do país.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi estabelecer uma estratégia de expressão heteróloga transiente e de purificação do inibidor de α -amilase α -AIC3 e do infliximabe recombinante, bem como desenvolver uma nova metodologia de expressão transiente, com base em sistema vegetal, visando futuramente tanto ao desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas resistentes ao bicudo-do-algodoeiro quanto ao desenvolvimento de um novo biosimilar.

Objetivos específicos

- Construir vetores de expressão que sejam compatíveis com o método de agroinfiltração;
- Verificar a ocorrência do processo de expressão heteróloga no hospedeiro;
- Recuperar quantidades significativas das moléculas α -AIC3 e infliximabe expressas de forma transiente, para que estas possam ser caracterizadas estrutural e/ou funcionalmente;
- Obter as referidas moléculas em suas formas purificadas e com estruturas apropriadas à atividade biológica;
- Confirmar e validar a atividade inibitória específica da molécula α -AIC3 contra a enzima-alvo e, em seguida, sua biossegurança contra enzimas-não alvo;
- Estabelecer um sistema de replicon viral em hospedeiro intermediário para posterior aplicação na agroinfecção de monocotiledôneas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. DESENHO E SÍNTESE DOS GENES DE INTERESSE

Para realizar a expressão heteróloga das proteínas de interesse (α -AIC3 e infliximabe), inicialmente foi feito o desenho dos genes sintéticos para codificar as proteínas, de forma que os referidos genes constituíssem os insertos do vetor de expressão. Com essa finalidade, o procedimento de desenho dos genes foi realizado *in silico*, por meio de ferramentas de Bioinformática, e sua obtenção foi complementada por meio da síntese química de nucleotídeos.

4.1.1. Bioinformática e análises *in silico*

As sequências de nucleotídeos de cada gene sintético (*aic3*, *igglc* e *igghc*) foram obtidas *in silico* via tradução reversa e otimização de códons das sequências da proteína α -AIC3 [GenBank:AGB50990.1], conforme documentado por Silva et al. (2013), e das cadeias leve (*light chain*, LC) [PDB:4G3Y_L] e pesada (*heavy chain*, HC) [PDB: 4G3Y_H], conforme documentado por Liang et al. (2013). Para esse procedimento, utilizou-se o software Gene Designer 2.0 (VILLALOBOS et al., 2006), com a otimização de códons sendo baseada na tabela de *codon usage* para a espécie *N. benthamiana* (Figura 18), disponível na Kazusa Codon Usage Database (www.kazusa.or.jp/codon/). Para a sequência do gene *aic3*, a sequência nucleotídica correspondente ao peptídeo-sinal nativo de via secretória (MASSNLLSLALFLVLLTHANS) foi mantida e igualmente códon-otimizada. Para a sequência dos genes *igglc* e *igghc*, as sequências nucleotídicas correspondentes aos peptídeos-sinal de secreção de origem murina foram substituídas pela sequência igualmente códon-otimizada do peptídeo-sinal de secreção PR1a de *Nicotiana tabacum* (MGFVLFSQLPSFLLVSTLLLFLVISHSCRA) (CORNELISSEN et al., 1987) em cada um dos genes.

<i>Nicotiana benthamiana</i> [gbpln]: 100 CDS's (43763 codons)							
fields: [triplet] [frequency: per thousand] ([number])							
UUU	23.7(1036)	UCU	22.3(974)	UAU	15.8(690)	UGU	9.2(404)
UUC	17.6(771)	UCC	10.4(453)	UAC	12.8(562)	UGC	7.2(315)
UUA	12.8(559)	UCA	17.2(752)	UAA	0.7(32)	UGA	0.9(39)
UUG	24.3(1062)	UCG	5.6(247)	UAG	0.7(29)	UGG	12.4(542)
CUU	24.9(1091)	CCU	18.9(826)	CAU	12.9(566)	CGU	7.7(335)
CUC	12.5(545)	CCC	6.4(278)	CAC	8.2(360)	CGC	4.2(183)
CUA	9.2(404)	CCA	16.8(734)	CAA	18.1(790)	CGA	5.8(253)
CUG	11.9(522)	CCG	6.5(284)	CAG	17.0(745)	CGG	5.3(233)
AUU	26.7(1170)	ACU	17.4(762)	AAU	29.1(1272)	AGU	14.7(642)
AUC	13.9(610)	ACC	10.1(443)	AAC	16.9(741)	AGC	10.7(469)
AUA	12.1(530)	ACA	15.2(665)	AAA	29.0(1269)	AGA	15.8(690)
AUG	23.9(1044)	ACG	5.4(236)	AAG	38.0(1662)	AGG	13.0(569)
GUU	26.1(1142)	GCU	33.2(1452)	GAU	38.5(1686)	GGU	24.3(1065)
GUC	10.6(465)	GCC	12.6(550)	GAC	16.4(719)	GGC	11.4(500)
GUA	9.9(435)	GCA	23.5(1029)	GAA	35.2(1541)	GGA	22.5(986)
GUG	15.6(684)	GCG	6.5(283)	GAG	30.9(1351)	GGG	11.1(485)

Figura 18. Codon usage de *Nicotiana benthamiana*. Códons preferenciais e sua frequência para a espécie *Nicotiana benthamiana*, com base em 100 sequências codantes totalizando 43.763 códons registrados no banco de dados Kazusa Codon Usage Database (<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=4100>).

4.1.2. Delineamento e checagem dos insertos

Os insertos componentes de cada construção gênica foram delineados obedecendo às seguintes estruturas (Figura 19):

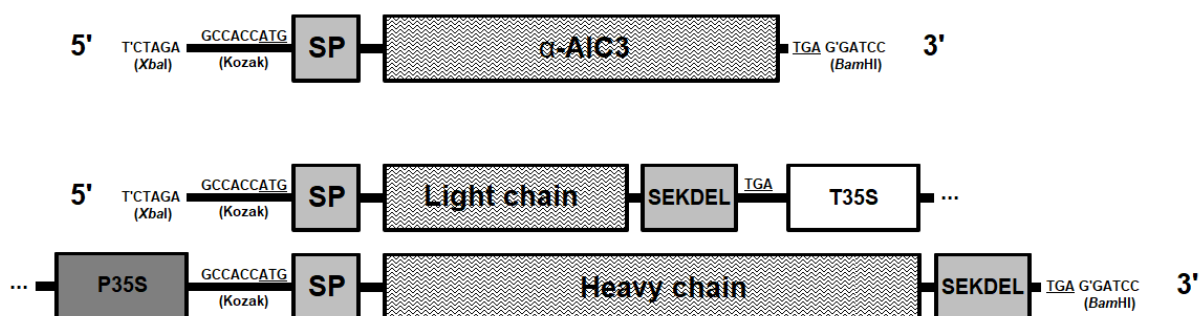


Figura 19. Estruturas dos insertos para os genes *aic3*, *iglc* e *igghc*. Representação esquemática dos insertos de cada gene, no sentido 5'-3', evidenciando sua composição de elementos genéticos: sequência consenso de Kozak (GCCACC), seguida pelo *start codon* (ATG), pelos respectivos peptídeos-sinal (SP), pela sequência codante (CDS) e pelo *stop codon* (TGA). Adicionalmente, para o inserto dos genes relativos à IgG, um peptídeo-sinal de retenção (SEKDEL) foi fusionado à extremidade 3' de cada CDS imediatamente antes do *stop codon*. Entre o *stop codon* de *iglc* e a sequência de Kozak de *igghc* foram inseridos um terminador do gene da subunidade 35S de *Cauliflower mosaic virus* (CaMV 35S, T35S) e o promotor do mesmo gene (CaMV35S, P35S), nessa ordem. Todos os insertos foram flanqueados pelos sítios de restrição *Xba*I (TCTAGA), a 5', e *Bam*HI (GGATCC), a 3', permitindo sua inserção em vetores de clonagem e de expressão.

Os elementos genéticos que compuseram cada um dos insertos foram adicionados na seguinte ordem: a 5' do *start codon* (ATG) de cada *Open Reading Frame* (ORF), foi inserida a sequência consenso de Kozak (GCCACC) (KOZAK, 1986) para indicação do ATG preferencial para início do processo de tradução pelos ribossomos, sendo nativa em muitos transcritos de genes eucarióticos bastante expressos. Subsequentes ao *start codon*, foram dispostos os respectivos peptídeos-sinal de secreção para cada sequência codante (CDS), descritos anteriormente, seguidos pelas próprias CDS e pelo *stop codon* (TGA).

De forma adicional e diferencial ao inserto do gene *aic3*, os genes *igglc* e *igghc* tiveram, fusionado à extremidade 3' de cada CDS e imediatamente antes de cada *stop codon*, um segundo peptídeo-sinal (SEKDEL) (MUNRO; PELHAM, 1987) para retenção da cadeia polipeptídica no RER via retorno na via secretória a partir do complexo de Golgi. A importância da inserção deste peptídeo-sinal residuiu na necessidade de impedir o trânsito das cadeias leve e pesada para regiões mais distais do complexo de Golgi – tipicamente as faces medial e *trans* – onde ocorrem processos de N-glicosilação com incorporação de resíduos glicídicos típicos de plantas e consequente formação de padrões complexos de N-glicanos, indesejados do ponto de vista farmacológico, uma vez que podem contribuir para a alergenicidade e toxicidade da proteína quando usada terapêuticamente em mamíferos (LOMBARDI et al., 2012; ROSENBERG et al., 2013). Por outro lado, a ausência do peptídeo-sinal SEKDEL no inserto para *aic3* se deveu à necessidade de ocorrência de clivagens proteolíticas através de enzimas hidrolíticas presentes no vacúolo central para a ativação da proteína por formação de subunidades (PUEYO et al., 1993), e para o qual a proteína é direcionada a partir da via secretória sem que haja retenção no RER.

Finalmente, as ORFs contendo os genes *igglc* e *igghc* foram mantidas *in tandem*, sendo intercaladas por elementos regulatórios do gene da subunidade ribossomal 35S de *Cauliflower mosaic virus* (CaMV 35S). Dessa forma, o terminador do gene 35S (T35S) e o promotor do mesmo gene (P35S) foram inseridos, nessa ordem, entre o *stop codon* do gene *igglc* e a sequência de Kozak do gene *igghc*. Ao final do delineamento dos dois insertos, foram inseridos sítios de restrição flanqueando cada um deles: *XbaI* (TCTAGA), na extremidade 5', e *BamHI* (GGATCC), na extremidade 3', gerando compatibilidade com sítios de clonagem em vetores de clonagem e de expressão para inserção e excisão.

Uma vez finalizados os delineamentos, os insertos foram checados quanto à possível existência de sítios de restrição *XbaI* e *BamHI* internamente ao inserto – de forma que as

enzimas de restrição utilizadas não clivassem o próprio inserto e inviabilizassem a clonagem da sequência completa –, quanto à sequência correta de resíduos de aminoácidos das respectivas ORFs e quanto à predição de peptídeo-sinal de secreção por simulação de clivagem. A checagem de sítios de restrição foi conduzida na ferramenta NEBCutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>), a análise de ORFs foi realizada no recurso ExpASy Translate Tool (<http://web.expasy.org/translate/>) e a predição de peptídeo-sinal feita no servidor SignalP 4.1 (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/).

4.1.3. Vetor de expressão, vetores de clonagem e síntese química de insertos

Para ambos os insertos, o vetor de expressão utilizado nos experimentos foi o vetor binário para *Agrobacterium tumefaciens* pBin61 (BENDAHMANE et al., 2002), o qual foi obtido a partir da excisão do cassete 35S (P35S + T35S) do vetor pJIT61 pelas enzimas de restrição *KpnI* e *XhoI* e subclonagem deste fragmento nos sítios *KpnI* e *SalI* do gene *lacZ* presente na região-T do vetor binário comercial pBin19 (Figura 20).

Dessa forma, para a introdução dos insertos no vetor pBin61, foi primeiramente realizada a síntese química *de novo* destes pela empresa Epoch Life Science[®], conforme a estrutura exata delineada e sua sequência de nucleotídeos. Os insertos também foram clonados, pela mesma empresa, nos sítios *XbaI* e *BamHI* do gene *lacZ* do vetor de clonagem pUC18, constituindo os vetores pUC18: α -AIC3 e pUC18:IgG.

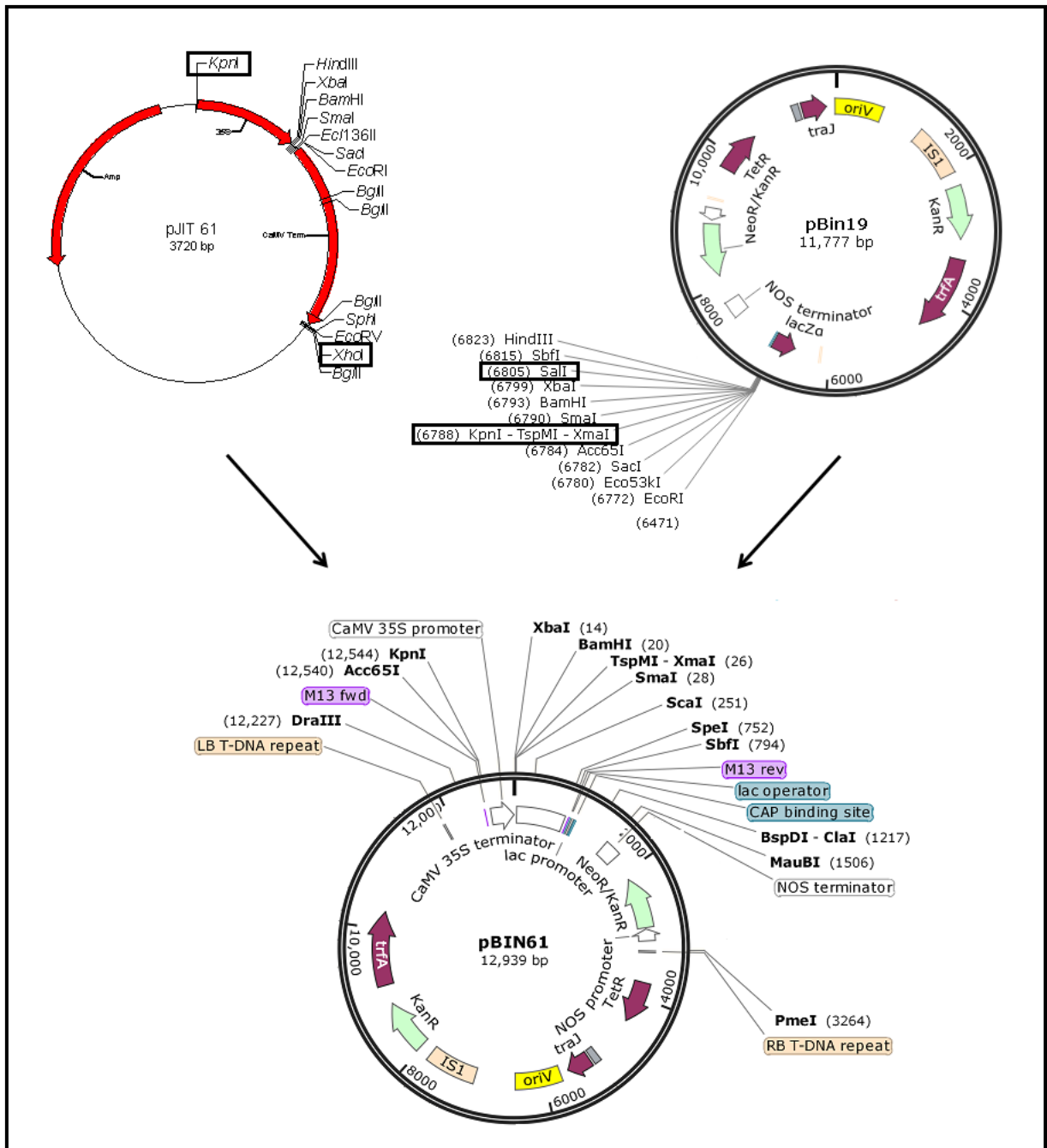


Figura 20. Obtenção do vetor pBin61 a partir dos vetores pJIT61 e pBin19. Representação esquemática dos vetores de expressão utilizados para gerar o vetor binário pBin61, a partir da subclonagem do cassete 35S do vetor pJIT61 nos sítios de restrição *KpnI* e *SmaI* do gene *lacZ* do vetor binário pBin19.

4.2. PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES

Paralelamente, foi realizado o preparo de células termo e eletrocompetentes de *E. coli* e *A. tumefaciens*, respectivamente, para transformação bacteriana e amplificação dos vetores de clonagem e de expressão, bem como para o processo de transformação genética de plantas mediada por células transformadas com o vetor de expressão.

4.2.1. *Escherichia coli*

Células termocompetentes de *E. coli* foram preparadas a partir de uma colônia da cepa DH5 α , inoculada em 5 mL de meio de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido e estéril (Apêndice A), com crescimento a 37 °C e 200 rpm por 18 horas. Deste pré-cultivo, 1 mL foi utilizado para inocular mais 100 mL de meio LB líquido, mantendo as condições de crescimento até se atingir a OD₆₀₀ de 0,5. Logo após, o volume de células foi transferido para tubos de 50 mL, mantido em gelo por 20 minutos e centrifugado a 4 °C e 5.000 rpm por 10 minutos. Após remover o sobrenadante, o *pellet* em cada tubo foi ressuscitado em 5 mL de CaCl₂ gelado a 0,1 M, unificado e incubado novamente em gelo por 30 minutos. Em seguida, as células foram novamente centrifugadas da mesma forma, removendo o sobrenadante e ressuscitando o *pellet* em 2 mL de CaCl₂ gelado a 0,1 M acrescido de glicerol a 15%. Alíquotas de 100 μ L foram preparadas a partir desta suspensão bacteriana, congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e depois mantidas a – 80°C até o uso.

4.2.2. *Agrobacterium tumefaciens*

Células eletrocompetentes de *A. tumefaciens* foram preparadas a partir de uma colônia da cepa C58C1, conforme o procedimento descrito por Wise et al. (2006). Alíquotas de 40 μ L foram preparadas a partir desta suspensão bacteriana, congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e depois mantidas a – 80°C até o uso.

4.3. CLONAGEM GÊNICA E SEQUENCIAMENTO DE DNA

Os vetores clonagem preparados pela empresa Epoch Life Science[®] foram utilizados para a amplificação plasmidial, de forma a gerarem os vetores de expressão, conforme os procedimentos de biologia molecular descritos a seguir.

4.3.1. Transformação bacteriana com vetor de clonagem

Alíquotas de 100 μ L de células termocompetentes de *E. coli* DH5 α foram utilizadas para transformação genética bacteriana com 100 ng de cada um dos vetores de clonagem, pUC18: α -AIC3 e pUC18:IgG, e do vetor de expressão, pBin61, cedido gentilmente pela Dr^a Séverine Lacombe (IRD, Montpellier, França), para amplificação da quantidade de material genético a ser trabalhado nas etapas de subclonagem. Dessa forma, o volume contendo 100 ng de cada vetor foi adicionado a uma alíquota de células competentes, e a mistura incubada em

gelo por 30 minutos, seguido por uma etapa de choque térmico a 42 °C por 45 segundos, incubando novamente em gelo por dois minutos, tempo após o qual a mistura foi acrescida de 500 µL de meio LB líquido e mantida em agitação a 37 °C e 200 rpm por 1 hora.

4.3.2. Cultivo bacteriano (*E. coli*) e extração e quantificação de DNA plasmidial

Após a transformação, 300 µL do volume contendo células transformadas foram usados para plaqueamento, utilizando uma alça de Drigalski, em meio LB sólido (Apêndice A) acrescido de ampicilina ou kanamicina a 100 µg/mL como marcador de seleção para células transformadas com os vetores. As células plaqueadas foram incubadas em estufa a 37 °C por 18 horas, e as colônias formadas no meio de cultivo foram selecionadas para inocular 10 mL de meio LB líquido contendo ampicilina ou kanamicina a 100 µg/mL, mantendo o crescimento em *shaker* a 37 °C e 200 rpm por 18 horas. O volume de células bacterianas foi utilizado para a extração de DNA plasmidial por lise alcalina, conforme protocolo para *miniprep* QIAprep[®] (Qiagen[®]), obtendo-se volumes de 50 µL de vetor eluído. Os plasmídeos recuperados tiveram sua concentração e pureza estimadas por quantificação de DNA em espectrofotômetro NanoDrop[™] (ThermoFisher Scientific[™]).

4.3.3. Digestão enzimática, excisão do inserto e ligação gênica

Os vetores de clonagem amplificados foram digeridos enzimaticamente em pares com o vetor de expressão, utilizando 1 µg de cada vetor de clonagem e 1 µg do vetor de expressão pBin61 – 0,5 µg do vetor de expressão para cada vetor de clonagem.

Para isso, primeiramente a massa necessária de cada vetor foi separadamente adicionada a uma solução contendo 4 unidades (U) da enzima de restrição *Xba*I (New England BioLabs[®]), 5 µL de tampão NEB4 (New England BioLabs[®]) e 0,1 µg de BSA (New England BioLabs[®]), perfazendo um total de 50 µL de reação de digestão. A solução foi mantida em estufa a 37 °C por 3 horas para digestão parcial dos vetores, e em seguida concluída com uma segunda digestão para linearização do vetor de expressão pBin61 e excisão dos insertos a partir dos vetores de clonagem. Dessa forma, os volumes da primeira digestão foram recuperados e dessalinizados em membranas de filtração GN-Metricel (Thomas Scientific[®]) com poros de 0,45 µm de diâmetro, pipetando-se os volumes sobre a membrana flutuando em água milli-Q e mantendo por 5 minutos.

Após a recuperação dos volumes, 42,5 µL foram adicionados a 4 U da enzima de restrição *Bam*HI (Promega[®]), 5 µL de tampão *Bam*HI (Promega[®]) e 0,1 µg de BSA (New

England BioLabs[®]), perfazendo um total de 50 µL de reação de digestão. A solução foi mantida em estufa a 37 °C por 2 horas, e a reação de digestão inativada incubando-se os sistemas a 65 °C por 10 minutos. Finalmente, o vetor pBin61 foi, em seguida, desfosforilado pela adição de 1 U de fosfatase alcalina termossensível (Promega[®]) e 5,5 µL de tampão Multi-Core[™] 10x (Promega[®]) ao volume total de reação de digestão inativada. A desfosforilação foi conduzida para evitar a recircularização do plasmídeo linearizado, e ocorreu incubando-se o sistema a 37 °C por 30 minutos, sendo posteriormente inativada a 80 °C por 10 minutos.

Os fragmentos digeridos e gerados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio (EtBr), a 80 V durante 40 ou 60 minutos, e os tamanhos esperados (759 pb para α-AIC3, 3.186 pb para IgG e ~13 kpb para pBin61) comparados com as alturas de bandas dos marcadores Ladder 1 kb ou Ladder 1 kb Plus (ThermoFisher Scientific[™]). Com o auxílio de iluminação UV, utilizou-se uma lâmina de bisturi para remover os fragmentos de gel contendo as bandas correspondentes ao vetor de expressão linearizado e aos insertos excisados. Uma vez recuperados os fragmentos e colocados separadamente em tubos de 1,5 mL, foi realizada a purificação de DNA por eluição a partir das peças de gel, conforme o protocolo QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen[®]).

Os fragmentos eluídos foram quantificados conforme descrito anteriormente e utilizados na ligação gênica entre os diferentes insertos e o vetor de pBin61 vazio, na proporção de massa de 3:1 de inserto para vetor, compondo sistemas de 20 µL de reação de ligação contendo a mistura inserto-vetor, 2 U da enzima T4 DNA ligase (ThermoFisher Scientific[™]) e 2 µL do tampão de reação (ThermoFisher Scientific[™]). A reação de ligação foi mantida a 4 °C por 18 horas, e o volume foi utilizado para amplificação dos plasmídeos ligados, pBin61:α-AIC3 e pBin61:IgG.

4.3.4. Transformação de *E. coli* com vetores de expressão e sequenciamento de DNA

Células termocompetentes de *E. coli* DH5α foram utilizadas para transformação com as reações de ligação preparadas e com o vetor pBin61 vazio – para se obter um controle negativo para os experimentos posteriores. Com este objetivo, 2 µL de cada reação de ligação e 100 ng do vetor pBin61 foram utilizados separadamente em sistemas de transformação via choque térmico, conforme descrito anteriormente. As células plaqueadas foram incubadas em estufa a 37 °C por 18 horas para formação de colônias, as quais foram selecionadas para inocular 10 mL de meio LB líquido contendo kanamicina a 50 µg/mL como marcador de seleção plasmidial, mantendo o crescimento em *shaker* a 37 °C e 200 rpm por 18 horas. O

volume de células bacterianas foi utilizado para a extração de DNA plasmidial, conforme descrito anteriormente, porém com eluições de 30 µL. Os plasmídeos recuperados tiveram sua concentração e pureza estimadas por quantificação de DNA em espectrofotômetro NanoDrop™ (ThermoFisher Scientific™), também sendo separados por eletroforese em gel de agarose 1% e visualizados em fotodocumentador (Bio-Rad®) para detecção.

Os clones transformados com os sistemas de ligação e contendo plasmídeos detectados na altura esperada tiveram seu DNA plasmidial submetido ao sequenciamento de DNA utilizando os *primers forward* e *reverse* M13 universais, cujos sítios de anelamento flanqueiam o cassete 35S, confirmando o sucesso da ligação gênica. Os vetores pBin61:α-AIC3 e pBin61:IgG dos diferentes clones foram sequenciados pelas empresas Beckman Coulter Genomics® e Epoch Life Science®, respectivamente.

4.3.5. Transformação e cultivo de *A. tumefaciens*

Os plasmídeos sequenciados e cuja presença dos insertos foi confirmada, bem como o vetor pBin61 vazio, foram utilizados para transformar células eletrocompetentes de *A. tumefaciens* C58C1. Nesse sentido, 100 ng de cada plasmídeo foram utilizados separadamente para transformar as células competentes por eletroporação, de acordo com o procedimento descrito por Wise et al. (2006). As células transformadas foram plaqueadas em meio de cultivo LB sólido acrescido de kanamicina a 50 µg/mL como marcador de seleção plasmidial e rifampicina a 100 µg/mL como marcador de seleção cromossomal para *Agrobacterium* spp, sendo mantidas em estufa a 28 °C por 42 horas para crescimento de colônias.

4.4. SUPRESSORES VIRAIS DE SILENCIAMENTO

Adicionalmente, foram utilizados outros plasmídeos como vetores de expressão de proteínas virais supressoras de silenciamento gênico (Figura 21). Os supressores virais de PTGS foram as proteínas P0 de *Beet western yellow virus* – BWYV (BAUMBERGER et al., 2007), P1Tz3 de *Rice yellow mottle virus* – RYMV (SIRÉ et al. 2008) e P19 de *Cymbidium ringspot virus* – CymRSV (HAMILTON et al. 2002), selecionadas com o objetivo de intensificar o nível de expressão das proteínas recombinantes de interesse via bloqueio de algumas etapas do mecanismo de PTGS, uma vez que a combinação específica destas três proteínas demonstrou ser bastante adequada e efetiva em expressão transiente (LACOMBE et al., 2017).

As construções gênicas para cada supressor de silenciamento foram obtidas com base no vetor de expressão pBin61, sob o controle do cassete CaMV 35S, compondo os vetores pBin61-P0, pBin61-P1 e pBin61-P19. Os vetores foram introduzidos em células de *A. tumefaciens* C58C1, cujo procedimento foi realizado e descrito por Lacombe et al. (2010), e os clones transformados foram gentilmente cedidos pela Dr^a Séverine Lacombe (IRD, Montpellier, França).

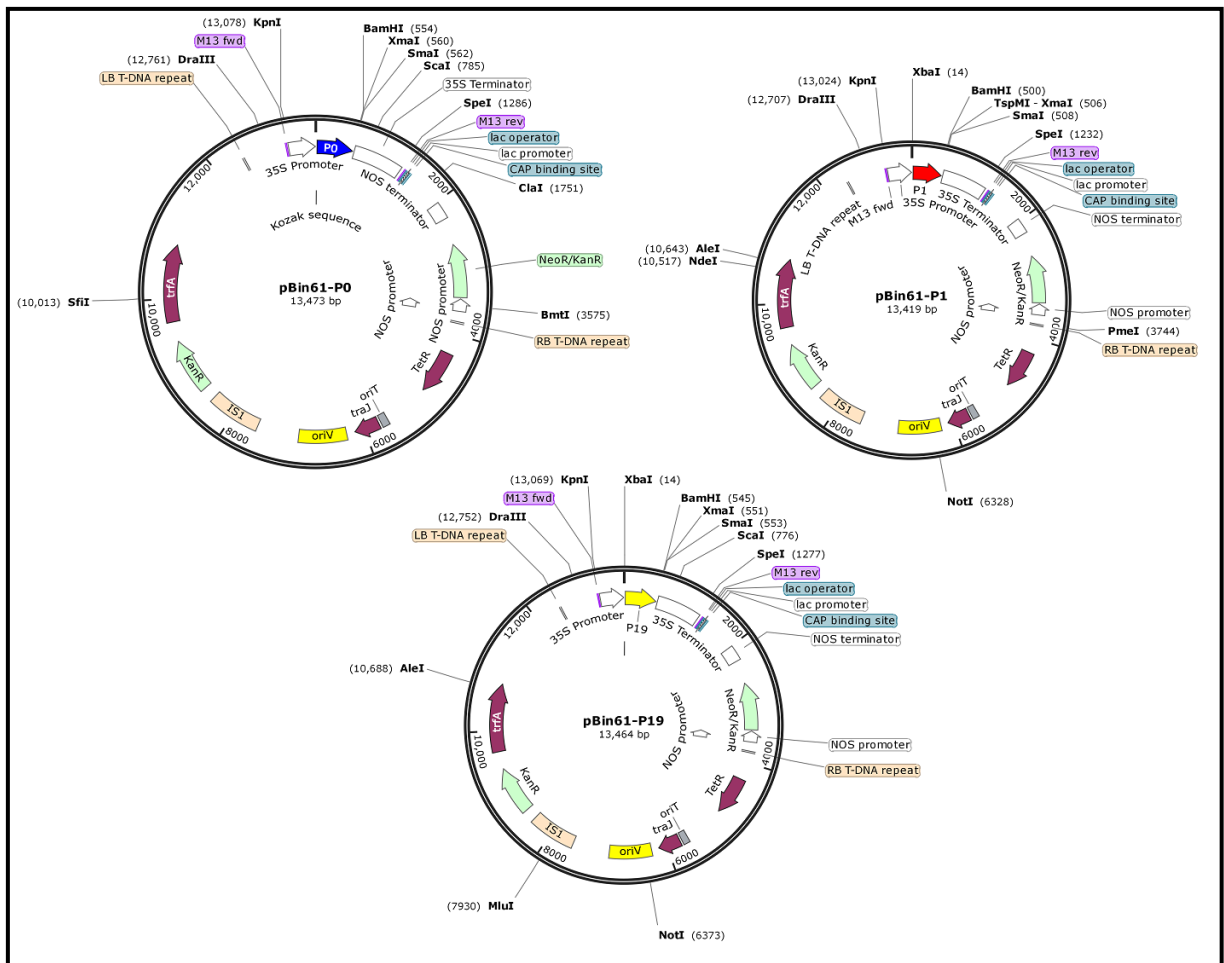


Figura 21. Vetores de expressão para supressores virais de silenciamento gênico. Representação esquemática dos vetores de expressão utilizados para codificar as proteínas virais supressoras de silenciamento: P0 (pBin61-P0), P1Tz3 (pBin61-P1) e P19 (pBin61-P19), dos vírus BWYV, RYMV e CymRSV, respectivamente, cuja expressão foi dirigida pelo cassete 35S de CaMV. Os mapas dos plasmídeos foram obtidos no software SnapGene[®] Viewer 4.1.3.

4.5. AGROINFILTRAÇÃO

4.5.1. Preparo de coquetéis bacterianos de agroinfiltração

Os clones de agrobactérias descritos anteriormente foram utilizados em experimentos de agroinfiltração para expressão transiente das proteínas de interesse. Para isso, colônias

isoladas dos clones de *A. tumefaciens* transformados com os vetores pBin61, pBin61: α -AIC3, pBin61:IgG, pBin61-P0, pBin61-P1 e pBin61-P19 foram separadamente inoculadas em 2 mL de meio LB líquido, acrescido de kanamicina a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e de rifampicina a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e incubadas a 28 °C e 150 rpm por 18 horas para crescimento de pré-inóculos. Em seguida, 30 μL de cada pré-inóculo foram adicionados a 30 mL de meio LB líquido, acrescido de kanamicina a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e de rifampicina a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e incubadas a 28 °C e 150 rpm por 18 horas para crescimento de inóculos. Logo após, foi realizada a aferição da densidade óptica em comprimento de onda de 600 nm (OD_{600}) para cada um dos inóculos, devendo estar todas situadas entre 0,4 e 1,5.

Uma vez obedecidas as OD_{600} no intervalo mencionado, os cultivos foram centrifugados por 10 minutos a 5.000 rpm e os *pellets* ressuspensos em uma solução de MgCl_2 a 10 mM e acetosseringona a 100 μM , ajustando a OD_{600} para 0,5. As suspensões bacterianas foram mantidas a temperatura ambiente por 3 horas e em seguida combinadas para gerar coquetéis bacterianos de agroinfiltração.

Os coquetéis de agroinfiltração foram preparados combinando-se os volumes de clones para pBin61, pBin61: α -AIC3 ou pBin61:IgG com todos os três clones para supressores de silenciamento em uma proporção volumétrica de 3:1:1:1, ou X:P0:P1:P19, em que “X” é um clone para pBin61, pBin61: α -AIC3 ou pBin61:IgG (Figura 22). Com isso, os coquetéis contendo clone para pBin61: α -AIC3 ou para pBin61:IgG foram utilizados na expressão das respectivas proteínas de interesse e o coquetel contendo clone para pBin61 foi utilizado como controle negativo.

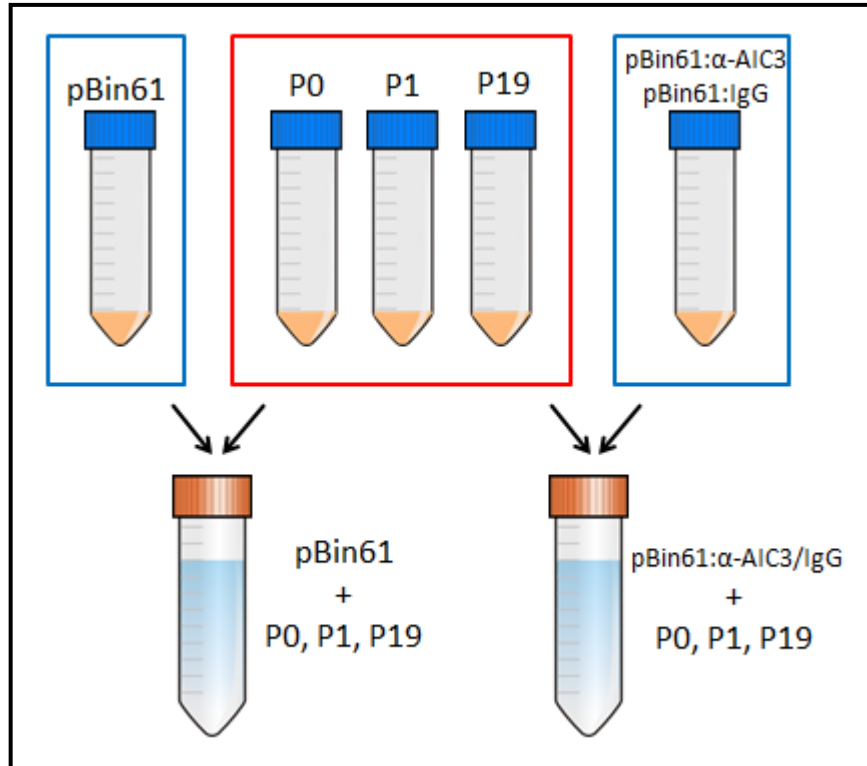


Figura 22. Clones bacterianos e coquetéis de agroinfiltração. Representação esquemática da montagem combinatória de clones de *A. tumefaciens* transformados com os vetores pBin61, pBin61:α-AIC3, pBin61:IgG, pBin61-P0, pBin61-P1 e pBin61-P19. Os clones para os supressores de silenciamento foram combinados com os clones para pBin61:α-AIC3 ou para pBin61:IgG, de forma a compor coquetéis de agroinfiltração para expressão das proteínas de interesse, e com o clone para pBin61, de forma a compor um coquetel de agroinfiltração sem expressão de proteína de interesse e utilizado como controle negativo.

4.5.2. Infiltração de folhas de *Nicotiana benthamiana*, cultivo e coleta

Os três diferentes coquetéis de agroinfiltração foram utilizados para infiltrar folhas de plantas da espécie *N. benthamiana*. Com esse objetivo, indivíduos dessa espécie foram cultivados em substrato Carolina Soil (Carolina Soil do Brasil Ltda.), dentro de casa de vegetação com condições de umidade relativa (UR) de 50%, temperatura média de 25 °C e fotoperíodo natural. Plantas com 4 semanas de idade foram utilizadas nos experimentos de agroinfiltração, sendo 12 plantas para a produção de α-AIC3, 8 para a produção de IgG e 8 para controle negativo. Em cada grupo de plantas, os respectivos coquetéis de agroinfiltração foram utilizados para infiltrar, utilizando seringas sem agulha, a superfície abaxial de três folhas por planta, sendo eleitas preferencialmente as mais jovens e com maior área de superfície.

Após a agroinfiltração, as plantas foram mantidas em cultivo nas mesmas condições descritas acima. O total de plantas para α-AIC3 e 4 plantas para controle negativo foram

cultivados durante 5 dias, enquanto metade das plantas para IgG e o restante das plantas para controle negativo foram cultivados durante 6 dias, sendo a outra metade das plantas para IgG cultivada durante 12 dias. Finalizados os tempos de cultivo para cada grupo, as folhas foram coletadas, e as regiões desenvolvendo halos de clorose foram isoladas com o auxílio de uma lâmina de bisturi e pesadas em balança para determinação da massa fresca. Após a pesagem, as regiões cloróticas foram identificadas quanto ao grupo experimental e congeladas em nitrogênio líquido.

4.6. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS

As regiões cloróticas de folhas coletadas com 5, 6 e 12 dias pós-infiltração (dpi) foram maceradas em nitrogênio líquido utilizando almofariz e pistilo até a formação de um pó fino. Cada macerado foi submetido à extração de proteínas solúveis com tampão de extração A – para experimentos com α -AIC3 e seu controle negativo – ou B – para experimentos com IgG e seu controle negativo (Apêndice A). A extração de proteínas vegetais solúveis procedeu-se em proporção volumétrica, adicionando-se 700 μ L dos respectivos tampões de extração a cada mL de tecido macerado.

Os sistemas de extração foram mantidos em gelo por 20 minutos, e em seguida agitados vigorosamente em vórtex por 20 minutos e a 4 °C. Os extratos foram centrifugados a 9.000 rpm por 30 minutos e a 4 °C para recuperação do sobrenadante contendo as proteínas solúveis.

4.7. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE BRADFORD

O total de proteínas solúveis (TSP) recuperado a partir do sobrenadante foi submetido à quantificação de proteínas com base no método de Bradford (BRADFORD, 1976). Dessa forma, as amostras de sobrenadantes foram quantificadas em placas de poliestireno Corning[®] Costar[®] (Sigma-Aldrich[®]) utilizando reagente Bio-Rad[®] Bradford Protein Assay (Bio-Rad[®]), conforme instruções do fabricante, e baseado em curva de concentração proteica de soroalbumina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich[®]) variando de 0,1 μ g a 5 μ g de proteína. Todas as quantificações, tanto da curva-padrão quanto das amostras de concentração desconhecida, foram realizadas em triplicata e os valores de absorbância foram obtidos após leitura em

espectrofotômetro SpectraMax 190 (Molecular Devices[®]) em comprimento de onda de 595 nm.

Com base na regressão linear gerada no software Excel 2007 (Microsoft[®]) a partir da correlação entre os valores de concentração e absorbância na curva-padrão, os valores de concentração para cada amostra foram calculados de acordo com suas respectivas absorbâncias.

4.8. DETECÇÃO DAS PROTEÍNAS DE INTERESSE: SDS-PAGE E WESTERN BLOT

Um total de 40 µg de proteína solúvel de cada amostra foi liofilizado a vácuo utilizando centrífuga CentriVap (Labconco[®]), ressuspendido em 15 µL de água milli-Q e 5 µL de tampão de carregamento de proteínas para gel de poliacrilamida (LAEMMLI, 1970) 4x concentrado. As amostras foram desnaturadas a 95 °C por 5 minutos e centrifugadas a 6.000 rpm por 3 minutos para aplicação dos sobrenadantes em poços de géis de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Para a análise dos extratos de α -AIC3, a amostra de pBin61: α -AIC3 foi comparada com uma amostra de controle negativo (pBin61), sendo ambas ressuspendidas no referido tampão de carregamento acrescido de ditiotreitol (DTT) a 10 mM e separadas por SDS-PAGE a 15% durante 90 minutos a 120 V, corando-se o gel com solução corante de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad[®]) (Apêndice A) durante 18 horas, seguido de revelação com solução descorante (Apêndice A) por 4 horas para visualização de bandas diferenciais entre as amostras. Para a proteína de interesse, as bandas esperadas consistiam em um fragmento de aproximadamente 11 kDa correspondente à subunidade α , de aproximadamente 15 kDa correspondente à subunidade β e de aproximadamente 26 kDa correspondente à cadeia completa e não-processada.

Um gel-espelho também foi submetido à eletroforese, nas mesmas condições, e alternativamente à coloração foi submetido a um Western blot para transferência de proteínas a uma membrana de nitrocelulose Amersham[™] Protran[™] (GE Healthcare[®]), mantendo-se a membrana e o gel imersos em tampão de transferência (Apêndice A) por 10 minutos antes de se iniciar a transferência. A transferência foi conduzida a 20 V por 5 minutos, utilizando a célula de transferência em sistema semisseco Trans-Blot[®] SD (Bio-Rad[®]). Seguiu-se com o bloqueio da membrana com leite desnatado em pó a 3% (m/v) em tampão TBS-T 1x

(Apêndice A), incubando-se a membrana por 2 horas a 40 rpm e temperatura ambiente. A proteína de interesse foi sondada pela adição de um anticorpo primário específico (Anti- α -AIC3 Rabbit IgG) (GenScript[®]) à suspensão de bloqueio na proporção de 1:2.500 (anticorpo:bloqueio, v/v), incubando-se novamente a membrana por 2 horas nas mesmas condições. Após seis etapas de lavagem por 5 minutos com TBS-T, adicionou-se uma solução de anticorpo secundário (Anti-rabbit Goat IgG conjugado à fosfatase alcalina) (Sigma-Aldrich[®]) em TBS-T à membrana para ligação ao anticorpo primário, na proporção de 1:3.000 (anticorpo:tampão, v/v), incubando-se a membrana por 1 hora nas mesmas condições. As etapas de lavagem foram repetidas, e as proteínas foram detectadas utilizando um kit de revelação colorimétrica AP Substrate Reagent (Bio-Rad[®]), conforme as instruções do fabricante.

Para a análise dos extratos de IgG, as amostras de pBin61:IgG, tanto de 6 dpi quanto de 12 dpi, foram comparadas com amostras de controle negativo (pBin61), sendo ambas ressuspendidas no referido tampão de carregamento acrescido ou não de ditiotreitol (DTT) a 10 mM e separadas por SDS-PAGE a 12% durante 90 minutos a 120 V, corando-se o gel com nitrato de prata, conforme protocolo descrito por Switzer et al. (1979), para visualização de bandas diferenciais entre as amostras. Para a proteína de interesse, as bandas esperadas consistiam em um fragmento de aproximadamente 23 kDa correspondente à cadeia leve, de aproximadamente 48 kDa correspondente à cadeia pesada e de aproximadamente 142 kDa correspondente à forma heterotetramérica da molécula. Também foi utilizado, como controle positivo, um anticorpo Rabbit Anti-mouse IgG (Merck Millipore[®]), aplicando-se nos poços do gel uma mistura de 5 μ L de anticorpo e 1,5 μ L de tampão de carregamento com ou sem DTT. Como marcador de peso molecular, foram utilizados 6 μ L de PageRuler[™] Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific[™]).

Um gel-espelho também foi submetido à eletroforese, nas mesmas condições, e a um Western blot conforme o procedimento para α -AIC3. A transferência foi conduzida a 10 V por 40 minutos, utilizando a célula de transferência em sistema semisseco Trans-Blot[®] SD (Bio-Rad[®]). A membrana foi corada reversivelmente com solução Ponceau S BioReagent (Sigma-Aldrich[®]), conforme instruções do fabricante. Seguiu-se com o bloqueio da membrana com leite desnatado em pó a 3% (m/v) em tampão TBS-T 1x, incubando-a por 2 horas a 40 rpm e temperatura ambiente. Após seis etapas de lavagem por 5 minutos com TBS-T, a proteína de interesse foi sondada pela adição de proteína A conjugada à fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich[®]) em solução com TBS-T na proporção de 1:2.000 (proteína A:tampão, v/v),

incubando-se a membrana por 1 hora nas mesmas condições. A proteína A de *Staphylococcus aureus* se liga à região Fc de imunoglobulinas (CHOE et al., 2016), e foi utilizada devido à afinidade equivalente da proteína A para IgG1 humana e para IgG cunicular (Apêndice B). As etapas de lavagem foram repetidas, e as proteínas foram detectadas utilizando kit AP Substrate Reagent (Bio-Rad®), conforme as instruções do fabricante.

4.9. DIÁLISE

Amostras de extrato para pBin61: α -AIC3 e para seu controle negativo correspondente foram dialisadas devido à composição do tampão de extração, uma vez que a presença de D-glicose constitui um fator limitante para a realização de ensaios posteriores de caracterização da proteína de interesse. Com esse objetivo, as proteínas solúveis do sobrenadante foram dialisadas contra água utilizando cassetes de diálise Slide-A-Lyzer™ G2 (ThermoFisher Scientific™), de 3 mL de capacidade volumétrica e 10 kDa de *cut-off* para peso molecular. A diálise se procedeu com os cassetes de diálise imersos em béquer contendo água milli-Q, na proporção de 200 mL de água para cada mL de sobrenadante, em câmara fria (4 °C) e trocando-se o volume de água a cada 2 horas, totalizando 3 ciclos de diálise. Para eliminar proteínas precipitadas que formam partículas ao longo do processo, as amostras foram clarificadas por centrifugação a 5.000 rpm e 4 °C por 10 minutos.

Os sobrenadantes recuperados foram requantificados para estimar a concentração de proteínas pelo método de Bradford e separados novamente por eletroforese de proteínas, seguindo os mesmos procedimentos, porém utilizando, como controle positivo, 15 μ g de subunidade β da proteína α -AIC3, expressa em *E. coli*, purificada e gentilmente cedida pelo Dr. Leonardo Lima Pepino de Macedo (Embrapa Cenargen, Brasília, Brasil). Como marcador de peso molecular, foram utilizados 6 μ L de SeeBlue® Plus2 Prestained Protein Standard (Invitrogen®). O Western blot para estas amostras foi igualmente conduzido a partir de gel-espelho, conforme anteriormente descrito para análise de α -AIC3, porém utilizando 6 μ L de BenchMark™ Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific™) como marcador de peso molecular.

4.10. ANÁLISE DO NÍVEL DE EXPRESSÃO E CÁLCULO DE RENDIMENTO: ELISA

Com o intuito de quantificar as proteínas de interesse nos extratos de proteínas solúveis totais e, com isso, avaliar o rendimento final das proteínas, foram realizados experimentos de ELISA indireto e direto para detecção de α -AIC3 e IgG, respectivamente, utilizando placas de 96 poços Corning® Costar® (Sigma-Aldrich®).

Dessa forma, para a detecção de α -AIC3, foi estabelecida uma curva-padrão baseada na subunidade β expressa em *E. coli*, como controle positivo, com gradiente de 0 ng a 200 ng da proteína purificada. Os extratos dialisados para pBin61 e para pBin61: α -AIC3 foram analisados com base em 160 ng e 80 ng de proteína total. Todas as amostras, tanto da curva-padrão quanto dos extratos, foram analisadas em triplicata e diluídas em tampão de amostras para ELISA (Apêndice A). A sensibilização dos poços com as proteínas ocorreu a 4 °C por 18 horas, seguida de incubação a 37 °C por 1 hora. Seguiu-se com o descarte dos volumes dos poços e lavagem com 200 μ L de tampão PBS-T 1x (Apêndice A). O bloqueio dos poços foi realizado em seguida, com 200 μ L de gelatina a 3% (m/v) em tampão PBS-T 1x, incubando-se a placa em estufa por 2 horas a 37 °C.

Após o descarte do bloqueio e repetição das lavagens, a proteína de interesse foi sondada pela adição de 100 μ L do anticorpo Anti- α -AIC3 Rabbit IgG (GenScript®) diluído em PBS-T 1x na proporção de 1:1.000 (anticorpo:tampão, v/v), acrescido de 1% de gelatina (m/v), incubando-se novamente a placa por 2,5 horas a 37 °C. Após descarte e lavagem da placa, adicionaram-se 100 μ L de uma solução de anticorpo secundário (Anti-rabbit Goat IgG conjugado à HRP) (Bio-Rad®) em PBS-T na proporção de 1:3.000 (anticorpo:tampão, v/v), acrescido de 1% de gelatina, aos poços para ligação ao anticorpo primário, incubando-se a placa por 1 hora a 37 °C. As etapas de descarte e lavagem foram repetidas, e as proteínas foram detectadas com 100 μ L de solução de revelação para HRP (Apêndice A) baseada no substrato TMB (Sigma-Aldrich®). A reação de revelação foi parada com 100 μ L de H₂SO₄ a 3 M. Os valores de absorbância foram obtidos em comprimento de onda de 450 nm, utilizando espectrofotômetro SpectraMax 190 (Molecular Devices®).

Para a detecção de IgG, foi estabelecida uma curva-padrão baseada no anticorpo cunicular Anti-mouse IgG (Merck Millipore®) como controle positivo, com gradiente de 0 ng a 200 ng da proteína purificada. Os extratos para pBin61 e para pBin61:IgG foram analisados com base em 160 ng e 80 ng de proteína total. Todas as amostras, tanto da curva-padrão quanto dos extratos, foram analisadas em triplicata e diluídas em tampão de amostras para

ELISA. A sensibilização dos poços com as proteínas ocorreu a 4 °C por 18 horas, seguida de incubação a 37 °C por 1 hora. Seguiu-se com o descarte dos volumes dos poços e lavagem com 200 µL de tampão TBS-T 1x. O bloqueio dos poços foi realizado em seguida, com 200 µL de gelatina a 3% (m/v) em tampão TBS-T 1x, incubando-se a placa em estufa por 2 horas a 37 °C.

Após o descarte do bloqueio e repetição das lavagens, a proteína de interesse e na forma heterotetramérica foi sondada pela adição de 100 µL de proteína A conjugada à fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich[®]), diluída em TBS-T 1x na proporção de 1:5.000 (proteína A:tampão, v/v), acrescido de 1% de gelatina (m/v), incubando-se novamente a placa por 2 horas a 37 °C. As etapas de descarte e lavagem foram repetidas, e as proteínas foram detectadas com 100 µL de solução de revelação para fosfatase alcalina (Apêndice A) baseada no substrato pNPP. A reação de revelação foi parada com 100 µL de NaOH a 1 M. Os valores de absorbância foram obtidos em comprimento de onda de 405 nm, utilizando espectrofotômetro SpectraMax 190 (Molecular Devices[®]).

Com base nas regressões lineares geradas no software Excel 2007 (Microsoft[®]) a partir da correlação entre os valores de concentração e absorbância nas curvas-padrão, as concentrações de cada proteína de interesse no extrato total foram calculadas de acordo com suas respectivas absorbâncias, relacionando-se também a massa total de proteína de interesse com a massa de tecido fresco coletado, de forma a se estimar o rendimento de cada proteína em mg/kg de folha.

4.11. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE INTERESSE

4.11.1. Cromatografias: exclusão molecular e bioafinidade

Amostras de extrato dialisado para pBin61:α-AIC3 e de extrato bruto para pBin61:IgG foram utilizadas para a purificação das proteínas de interesse via cromatografia de exclusão molecular e cromatografia de bioafinidade, respectivamente.

Um total de 15 mL de extrato contendo a proteína α-AIC3 foi liofilizado a vácuo e ressuspenso em 1 mL de tampão de equilíbrio (Apêndice A). Paralelamente, uma coluna cromatográfica HiLoad[®] 16/600 Superdex[®] 75 pg (GE Healthcare[®]) foi lavada com 120 mL de água milli-Q sob um fluxo de 1 mL/minuto e equilibrada com 240 mL de tampão de equilíbrio sob o mesmo fluxo. Em seguida, o volume de proteína solúvel foi aplicado na

coluna, seguido por uma aplicação de 180 mL de tampão de equilíbrio a 1 mL/minuto para eluição, com frações coletadas a cada 2 minutos.

Por outro lado, 10 mL de extrato de 12 dpi contendo a proteína IgG foram diluídos para 25 mL com NaH₂PO₄ a 20 mM e pH 8,0. Paralelamente, uma coluna cromatográfica de bioafinidade para proteína G HiTrap™ HP (GE Healthcare®) foi lavada com 10 mL de etanol a 20% sob um fluxo de 1 mL/minuto e equilibrada com 10 mL com NaH₂PO₄ a 20 mM e pH 8,0 sob o mesmo fluxo. Em seguida, o volume proteico foi aplicado na coluna, seguido por uma lavagem com a mesma solução usada no equilíbrio, a 1 mL/minuto, e eluição com glicina a 0,1 M e pH 2,7 sob o mesmo fluxo, com frações coletadas a cada 2 minutos.

Em ambos os casos, as cromatografias foram conduzidas em sistema de purificação ÄKTAprime Plus Protein (GE Healthcare®), e os picos dos cromatogramas foram gerados e analisados no software UNICORN™ 6.4 (GE Healthcare®).

4.11.2. Confirmação da purificação

Frações de diferentes eluições que corresponderam a picos nos cromatogramas foram selecionadas para separação por eletroforese de proteínas. Para a proteína α -AIC3, 15 μ L para frações de diferentes picos de eluição, bem como para uma fração de lavagem e para o extrato bruto, foram separados por SDS-PAGE 15% e as bandas visualizadas por coloração com nitrato de prata, conforme descrito anteriormente. Como marcador de peso molecular, foram utilizados 6 μ L de BenchMark™ Protein Ladder (ThermoFisher Scientific™). Após a confirmação de bandas em determinadas frações, estas foram reunidas, liofilizadas a vácuo, ressuspendidas em 50 μ L de água milli-Q, requantificadas pelo método de Bradford e 15 μ g de proteína purificada foram aplicados em gel de tris-tricina a 16% (m/v) durante 6 horas a 100 V e 4 °C, também utilizando 6 μ L de BenchMark™ Protein Ladder (ThermoFisher Scientific™) como marcador de peso molecular. As bandas foram visualizadas por coloração com Coomassie Brilliant Blue G-250 para excisão de *spots* e análise por espectrometria de massas.

Para a proteína IgG, as frações correspondentes ao pico de eluição foram reunidas, liofilizadas a vácuo, ressuspendidas em 15 μ L de água milli-Q e neutralizadas com 6 μ L de Tris a 2 M. Juntamente com esta amostra, 15 μ L para uma fração de lavagem e para o extrato bruto, bem como uma mistura de 5 μ L de anticorpo Rabbit Anti-mouse IgG (Merck Millipore®) e 1,5 μ L de tampão de carregamento com ou sem DTT, foram separados por

SDS-PAGE 12% e as bandas visualizadas por coloração com nitrato de prata, conforme descrito anteriormente. Como marcador de peso molecular, foram utilizados 6 μL de PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific™).

4.12. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL: ESPECTROMETRIA DE MASSAS

4.12.1. Tripsinização de amostras: digestão *in gel*

Realizou-se a excisão de *spots* de bandas observadas na fração reunida das eluições para α -AIC3. As bandas corresponderam às alturas esperadas para as formas processada e não-processada da proteína, e foram submetidas à digestão *in gel* via tripsinização. Primeiramente, as amostras de *spots* foram descoradas em 3 lavagens com etanol a 30%, sob agitação vigorosa por 20 minutos. Em seguida, as amostras foram desidratadas por 15 minutos com uma solução de acetonitrila (ACN) a 50% e NH_4HCO_3 a 25 mM, o sobrenadante foi removido e 200 μL de ACN a 100% foram adicionados, mantendo-se os *spots* imersos por 10 minutos sob agitação vigorosa. Após o descarte do sobrenadante, fez-se a secagem dos *spots* a temperatura ambiente e adicionaram-se 15 μL de tripsina ativada (Promega®), preparada em tampão de digestão enzimática conforme instruções do fabricante. A mistura em cada amostra foi incubada em gelo por 30 minutos, e 25 μL de NH_4HCO_3 a 50 mM foram adicionados em cada uma, dando continuidade à digestão por 18 horas a 37 °C.

4.12.2. Preparo de amostras para ionização/dessorção

Os produtos da hidrólise, coletados a partir do sobrenadante da reação de digestão enzimática em cada amostra, foram dessalinizados, concentrados e purificados utilizando ponteiros ZipTip® (Merck Millipore®) com colunas de resina C18, cujo processo foi realizado conforme as instruções do fabricante, diferindo na etapa de eluição, que foi realizada com ACN a 80%. Os peptídeos trópticos eluídos foram liofilizados a vácuo e ressuspensos em 10 μL de água milli-Q. As análises de massa molecular dos peptídeos e seus fragmentos foram conduzidas por espectrometria de massas MS/MS MALDI-TOF. Paralelamente, uma solução de uma matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma-Aldrich®) a 10 mg/mL foi preparada em proporção volumétrica de 1:1 para uma solução aquosa de ACN contendo ácido trifluoracético (TFA) a 0,3%. A matriz foi, então, adicionada a cada uma das soluções contendo produtos de hidrólise na proporção volumétrica de 3:1 (matriz:amostra), pipetando-se 2 μL da mistura, em triplicata, em uma placa para MALDI (Bruker Daltonics®). Após a

secagem das amostras e subsequente cristalização a temperatura ambiente, estas foram caracterizadas em espectrômetro de massas Autoflex™ Speed (Bruker Daltonics®).

4.12.3. Aquisição de espectros e fragmentação de íons

As amostras peptídicas foram submetidas a um mecanismo de dessorção-ionização e posteriormente à detecção e análise no espectrômetro de massas. O processo de ionização foi conduzido no modo de reflexão positivo, e os espectros dos peptídeos foram adquiridos com base em uma triplicata do calibrante Protein Calibration Standard II (Bruker Daltonics®), o qual abrange as seguintes moléculas e seus respectivos valores de $[M+H]^+$: bradicinina 1-7 (757,4 Da), angiotensina II (1.046,5 Da), angiotensina I (1.296,7 Da), substância P (1.347,7 Da), bombesina (1.619,8 Da), substrato de renina (1.758,9 Da), ACTH 1-17 (2.093,1 Da), ACTH 18-39 (2.465,2 Da), somatostatina 28 (3.147,5 Da). A fragmentação dos peptídeos detectados foi conduzida no método LIFT™ (SUCKAU et al., 2003) e os espectros de MS/MS foram interpretados manualmente, com os peptídeos correspondentes sendo sequenciados nas séries b/y, no software FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics®).

4.12.4. Análise comparativa: digestão trípica teórica

Os peptídeos sequenciados foram comparados com os dados dos peptídeos trípticos teóricos esperados para a cadeia polipeptídica de α -AIC3. A digestão teórica foi realizada no servidor ExPASy PeptideMass (http://web.expasy.org/peptide_mass/), sendo utilizada para confirmar a identidade dos fragmentos sequenciados à sequência já conhecida da proteína via análise de cobertura.

4.13. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL: ENSAIO DE ATIVIDADE INIBITÓRIA

4.13.1. Validação da atividade biológica de α -AIC3: enzima-alvo

Realizou-se, primeiramente, a validação da atividade inibitória da proteína α -AIC3 expressa em *N. benthamiana* para a AGA, comparando-se com a atividade inibitória da mesma proteína expressa previamente em *A. thaliana* e biologicamente ativa (SILVA et al., 2013). Dessa forma, conduziu-se um ensaio bioquímico colorimétrico baseado em ácido 3,5-dinitrossalicílico (ADNS) aferir a atividade enzimática de AGA, conforme protocolo adaptado de Bernfeld (1955), utilizando amido a 2% como substrato para a enzima. Paralelamente, extratos enzimáticos para AGA foram preparados a partir de intestinos de insetos adultos da

espécie *A. grandis* para uma concentração final de 0,5 g de macerado por mL de tampão AGA (Apêndice A).

O ensaio se procedeu com volumes de extrato enzimático contendo 1 U de AGA, considerando 1 U a quantidade necessária de enzima, definida previamente ao ensaio em uma curva de atividade, para aumentar o valor de absorbância a 550 nm (OD_{550}) em 0,11 a 0,15. Como controles da validação, extratos proteicos de sementes de *A. thaliana* transformada ou não com o gene *aic3* foram utilizados. Todas as amostras tiveram controles negativos de digestão, inativando-se a AGA a 95 °C por 5 minutos antes da adição de substrato ao sistema. O ensaio foi realizado com triplicatas para todas as amostras, seja de digestões, seja de seus controles negativos. Com isso, 100 µg de proteína solúvel dos extratos dialisados para pBin61 e para pBin61: α -AIC3, bem como dos referidos extratos de *A. thaliana*, foram liofilizados a vácuo e ressuspensos em 75 µL de tampão AGA contendo 1 U de AGA. O ensaio foi realizado conforme o protocolo citado acima, e os valores de absorbância foram obtidos em comprimento de onda de 550 nm, utilizando espectrofotômetro SpectraMax 190 (Molecular Devices®).

As análises de nível de inibição foram feitas no software Excel 2007 (Microsoft®) a partir da subtração dos valores de absorbância para extratos sem proteína α - pelos valores para extratos AIC3 contendo proteína α -AIC3, descontados os valores de absorbância referentes ao *background*, representado pelos respectivos controles negativos de digestão para cada amostra. O valor de absorbância referente a 100% da atividade de AGA foi considerado como sendo a média para a triplicata do valor pré-estabelecido para digestão com 1 U de enzima.

4.13.2. Análise de especificidade e biossegurança: enzimas-não alvo

Simultaneamente à validação da atividade inibitória para AGA por extratos de *N. benthamiana* contendo ou não a proteína α -AIC3, 100 µg de proteína solúvel das amostras dos mesmos extratos foram testados para a inibição de enzimas-não alvo, ou seja, de insetos para os quais a α -AIC3 teoricamente não teria especificidade. Dessa forma, extratos enzimáticos para α -amilase de *Apis mellifera* (AMA) e de *S. frugiperda* (SFA) foram preparados a partir de insetos adultos para uma concentração final de 0,5 g de macerado por mL de tampão AMA ou SFA (Apêndice A), respectivamente. O ensaio e as análises de nível de inibição foram conduzidos exatamente como para AGA.

4.14. AGROINFECÇÃO

De forma a estabelecer um novo sistema de replicon viral para agroinfecção, realizou-se a amplificação viral em *N. benthamiana* como hospedeiro intermediário, de modo que seus tecidos pudessem servir de reservatório para infecção viral secundária em espécies de monocotiledôneas. Este sistema baseou-se no genoma desconstruído do RYMV, na configuração $\Delta P1\Delta CP$, ou seja, com a deleção total da ORF1 para a proteína P1 e parcial da ORF3 para a proteína do capsídeo viral (CP, *coat protein*) (Figura 23) (KOU DAMILORO et al., 2015). Uma vez que estas proteínas são dispensáveis para a replicação viral, embora sejam necessárias para a dispersão sistêmica célula-célula, esta configuração possibilita o aumento da carga heteróloga para expressão de proteínas recombinantes.

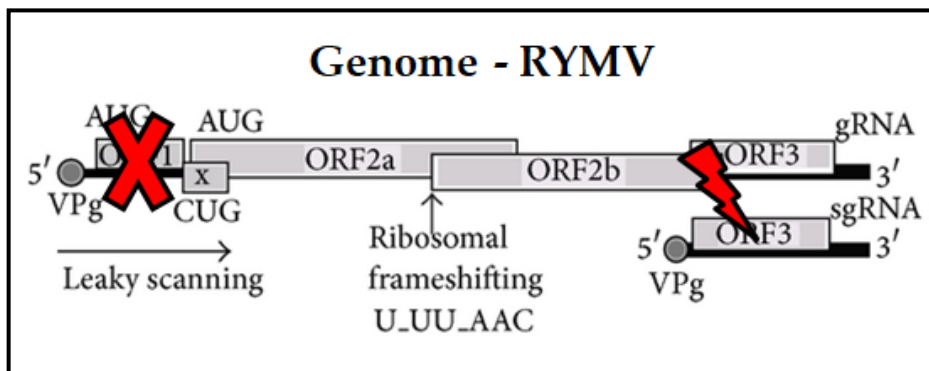


Figura 23. Genoma desconstruído do RYMV ($\Delta P1\Delta CP$). Representação esquemática do genoma do RYMV, evidenciando suas ORFs (ORF1, ORF2a, ORF2b, ORF3 e ORFx), das quais a ORF1, que codifica a proteína P1 de movimento e supressão de PTGS, sofreu deleção total, e a ORF3, que codifica a CP, sofreu deleção parcial para clonagem dos genes de interesse via fusão gênica, dando origem ao genoma desconstruído na configuração $\Delta P1\Delta CP$ (adaptado de KOU DAMILORO et al., 2015).

Para isso, foram utilizados 3 vetores de expressão baseados em um vetor pCambia1300 derivado (SIRÉ et al., 2008), sendo eles: (1) pCambia1300:GFP, com o gene *gfp* códon-otimizado para *N. benthamiana* (LACOMBE et al., 2017), clonado no cassete 35S; (2) pCambia1300: $\Delta\Delta RYMV$ -GFP, com o genoma viral desconstruído contendo o gene *gfp* fusionado ao gene parcialmente deletado para CP, clonado também no cassete 35S do plasmídeo; (3) pCambia1300: $\Delta\Delta RYMV$ -TEV-GFP, com a mesma configuração do vetor anterior, porém com um sítio de clivagem (o heptapeptídeo ENLYFQ/G) para proteinase do *Tobacco etch virus* (TEV) situado entre os genes para CP e GFP. As sequências para GFP e para TEV-GFP foram fusionadas ao genoma viral por meio dos sítios de restrição *Sna*BI e *Spe*I a 5' e 3', respectivamente.

Estes vetores de expressão foram preparados pela Dr^a Séverine Lacombe (IRD, Montpellier, França) e gentilmente cedidos em clones transformados de células C58C1 de *A. tumefaciens*. Estes clones foram utilizados em uma nova agroinfiltração, combinando-se cada um com os clones para supressores virais de silenciamento gênico utilizados anteriormente. O procedimento de agroinfiltração foi conduzido da mesma forma, coletando-se as folhas de cada grupo em 5 dpi.

Procedeu-se com a extração de RNA total com base no método de trizol utilizando TRI Reagent[®] (Sigma-Aldrich[®]). Para isso, foram adicionados 500 µL de reagente de trizol a 1 mL de tecido macerado de cada amostra, seguido de agitação vigorosa em vórtex. Em seguida, adicionaram-se 100 µL de clorofórmio a cada sistema, repetindo-se a agitação. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm e 10 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados e sofreram a adição de mesmo volume de isopropanol, agitando-se lentamente os sistemas, os quais foram incubados a -20 °C por 3 horas. Repetiu-se a centrifugação, descartaram-se os sobrenadantes e lavaram-se os *pellets* com 100 µL de etanol a 75%. Centrifugou-se novamente cada amostra, descartou-se cada sobrenadante e os *pellets* foram secados. Cada amostra foi ressuspensa em 100 µL de água milli-Q *RNA-free* e quantificada em espectrofotômetro NanoDrop[™] (ThermoFisher Scientific[™]). Em seguida, realizou-se a digestão do DNA por meio de tratamento com DNase RQ1 *RNase-free* (Promega[®]) de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras de RNA total foram submetidas com 2 µg, cada, à transcrição reversa para síntese de cDNA de duas formas: (a) 10 µL de RNA acrescidos de 2 µL de *primer* Oligo(dT)₁₅ a 10 µM; (b) 10 µL de RNA acrescidos de 1 µL de *primer* Oligo(dT)₁₅ a 10 µM e 1 µL de *primer* GFP-*SpeI* (5'-ACT AGT TTA AAG CTC ATC ATG TTT GTA-3') a 10 µM. A transcrição reversa se procedeu utilizando a enzima transcriptase reversa GoScript[™] (Promega[®]), conforme as instruções do fabricante. Também se realizou um experimento paralelo para controle negativo da transcrição reversa, sem adição da enzima.

Após a transcrição reversa, os cDNAs gerados foram diluídos 5 vezes e 3 µL foram amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *primers* específicos. Em uma análise, validou-se o experimento com a amplificação de um gene *housekeeping* como controle interno (*NbEIF1-α*), cujo amplicon esperado foi de 732 pb, utilizando par de *primers* *forward* (5'-TCA CAT CAA CAT TGT GGT CAT TGG C-3') e *reverse* (5'-TTG ATC TGG TCA AGA GCC TCA AG-3') a 10 µM, também se conduzindo a PCR para o controle

negativo da transcrição reversa. Em outra análise, verificou-se a amplificação viral em *N. benthamiana* por meio da detecção do gene *gfp*, cujo amplicon esperado foi de 654 pb, utilizando par de *primers forward* (5'-AGT AAA GGA GAA GAA CTT TTC ACT-3') e *reverse* (5'-ACT AGT TTA AAG CTC ATC ATG TTT GTA-3') a 10 µM.

As reações foram conduzidas com volumes finais de 10 µL contendo 1 U de enzima *Taq* DNA polimerase (Promega®). As condições de PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 40 segundos; extensão final a 72 °C por 7 minutos. Os fragmentos amplificados por PCR foram separados e visualizados em gel de eletroforese em agarose a 1% corado com EtBr, tendo o Ladder 1 kb Plus (ThermoFisher Scientific™) como marcador de peso molecular.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISES *IN SILICO*

Foram obtidas, no software Gene Designer 2.0, as sequências de nucleotídeos para os genes sintéticos *aic3*, *igglc* e *igghc*, com base nas sequências de resíduos de aminoácidos de cada cadeia polipeptídica, [GenBank:AGB50990.1], [PDB:4G3Y_L] e [PDB: 4G3Y_H], respectivamente. Os nucleotídeos foram resultantes de tradução reversa e otimização de códons, realizadas *in silico* (Figura 24), sendo esta última baseada na tabela de *codon usage* para *N. benthamiana* (Figura 18).

Com os insertos delineados para codificação das proteínas α -AIC3 e IgG (Figura 19), geraram-se mapas de restrição para ambos, os quais confirmaram a ausência de sítios de restrição *Xba*I e *Bam*HI internos aos insertos (Figura 25), exceto para os sítios flanqueando cada inserto, a 5' e 3', respectivamente, que possibilitaram a clonagem dos fragmentos.

New Project - Project - Gene Designer by DNA2.0
 File Edit Tools Reports Configure Window Help

New Construct Nicotiana
 Alfa-AIC3

Elements Not in a Construct:

Alfa-AIC3 (242 aa)

M A S S N L L S L A L F L V L L T H A

A T G G C T T T C T T C A A A C C T T C T T T C A C T T G C T C T T T T T C T T G T T T C T T T A C A C A T G C C T
 T A C C G A A G A A G T T T G G A A G A A A G T G A A C G G A G A A A A G A A C A A G A A T G T G T A C G A T

Cadeia leve (LC)

M G F V L F S Q L P S F L L V S T L L

A T G G G C T T T G T T T G T T C T C A C A G T T G C T T T C T T T C T T G T T G G T G T C A A C A C T T C T T T
 T A C C C G A A A A C A A A A C A A G A G T G T C A A C G G A A G A A A G A A C A A C C A C A G T T G T G A A G A A

Cadeia pesada (HC)

M G F V L F S Q L P S F L L V S T L L

A T G G G T T T C G T T C T T T T C T C T C A G T T G C C A T C A T T C C T T C T T G T T T C T A C T C T T T T G T
 T A C C A A A A G C A A G A A A A G A G A G T C A A C G G T A G T A A G G A A G A A C A A A A G A T G A G A A A A C

Figura 24. Tradução reversa e otimização de códons para os genes sintéticos. A Figura evidencia a extremidade 5' para cada gene sintético códon-otimizado no software Gene Designer 2.0, destacando os códons selecionados para cada resíduo de aminoácido. Em verde, a sequência para o gene *aic3*; em azul, a sequência para o gene *igg1c*; em vermelho, a sequência para o gene *igg2c*.

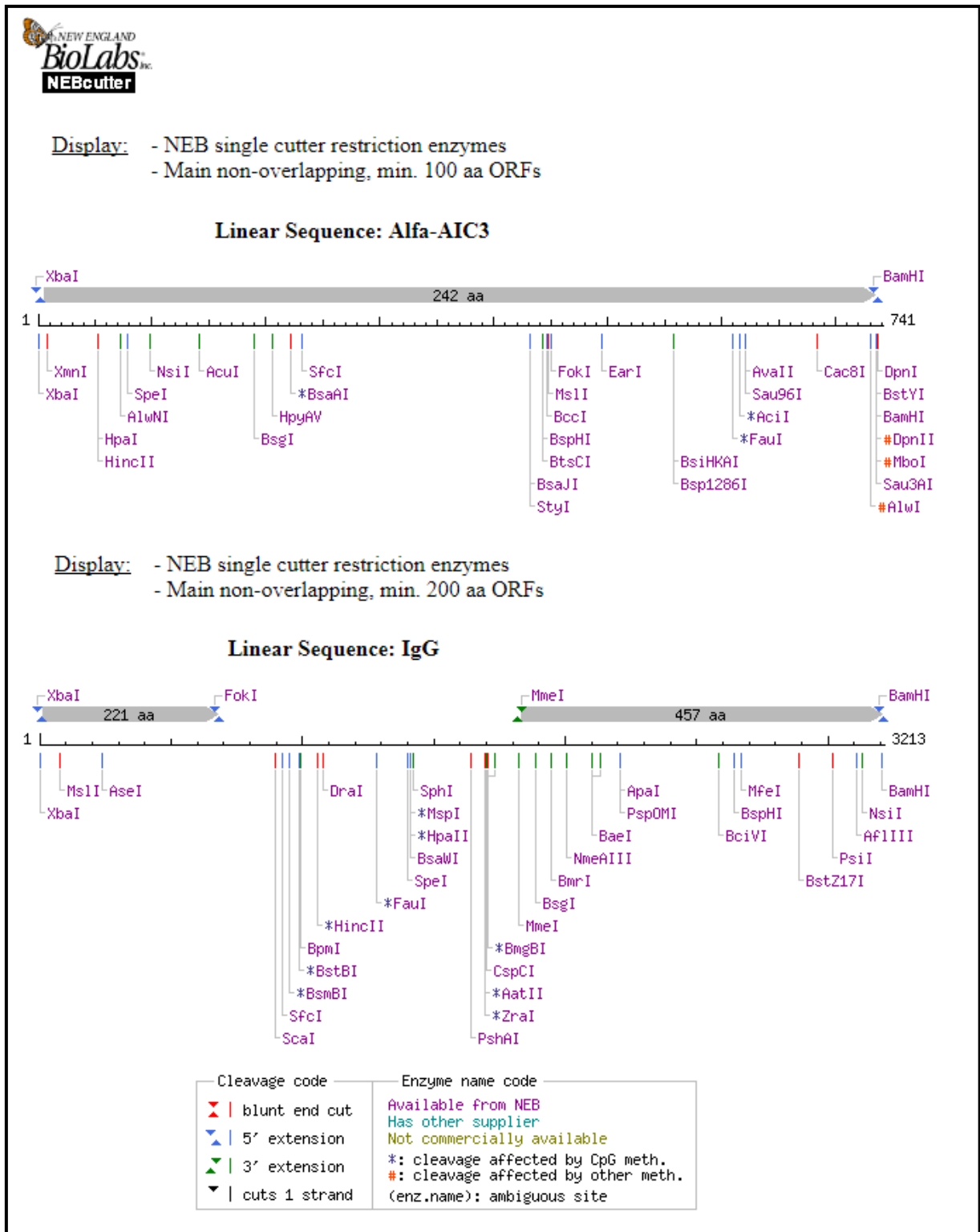


Figura 25. Mapas de restrição dos insertos para α -AIC3 e IgG. Representação esquemática dos insertos para codificação das proteínas α -AIC3 e IgG, evidenciando sítios de restrição com corte único. Observa-se que os sítios *XbaI* e *BamHI* estão presentes apenas nas extremidades 5' e 3', respectivamente, flanqueando cada inserto, não clivando internamente as sequências. Os mapas de restrição foram gerados na ferramenta NEBCutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>).

Também se observou que as ORFs para cada gene contiveram as sequências corretas dos resíduos de aminoácidos (Figura 26), tanto dos peptídeos-sinal quanto das proteínas em si, e que os peptídeos-sinal de secreção foram preditos em todas elas (Figura 27), sugerindo a eficácia do endereçamento subcelular das cadeias polipeptídicas para o lúmen do RER, a partir do qual as proteínas seguiriam a via secretória, sendo ou não devolvidas ao lúmen. A confirmação da predição foi referente aos picos existentes nos gráficos de predição, os quais separam as sequências dos peptídeos-sinal dos genes sintéticos acima do valor de *cut-off*.

Translate Tool - Results of translation

Open reading frames are highlighted in **red**

5'3' Frame 1

<pre> MASSNLLSLALFLVLLTHANSATETSFIIDAFNKTNLI LQGDATVSSNGNLQLSYNSYDS MSRAFYSAPIQIRDSTTGNVASFDTNFTMNI RTHRQANS AVGLDFVLVPVQPESKGDVT VEFDTFLSRISIDVNMNDIKSVPWVDVHDYDGGQNAEVRITYNSSTKVLAVSLSNPSTGKSN EVSARMEVEKELDDWVRVGFSAISGVHEYSFETRDLVLSWFSKFSQHTTSERSNILLNK IL- </pre>	α-AIC3
<pre> MGFVLFSQLPSFLLVSTLLLFLVISHSCRADILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQFVG SSIHMYQQRNTNGSPRLLIKYASESMGIPSRFSGSGSGTDFTLSINTVESEDIADYYCQQ SHSWPFTFGSGTNLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVL LNNFYPREAKVQWIKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGECSEKDEL- </pre>	Cadeia leve
<pre> MGFVLFSQLPSFLLVSTLLLFLVISHSCRAEVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFIFS NHWNNWVRQSPEKGLEWVAEIRSKSINSATHYAESVKGRFTISRDDSKSAVYLQMTDLRT EDTGYYC SRNYYGSDYDWGGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK SEKDEL- </pre>	Cadeia pesada

Figura 26. Open Reading Frames para os genes *aic3*, *igglc* e *igghc*. Sequências dos resíduos de aminoácidos codificados pelos genes sintéticos, no sentido 5'-3'. Na ORF do gene *aic3* é possível verificar a sequência do peptídeo-sinal de secreção e da CDS, bem como o *start* e *stop codon*. Nas ORFs dos genes *igglc* e *igghc* é possível verificar os mesmos elementos, bem como os peptídeos-sinal adicionais de retenção, na extremidade C-terminal. Os peptídeos-sinal de secreção e de retenção estão indicados como resíduos sublinhados em vermelho e em azul, respectivamente. A tradução *in silico* da sequência de nucleotídeos foi realizada no recurso Expasy Translate Tool (<http://web.expasy.org/translate/>).

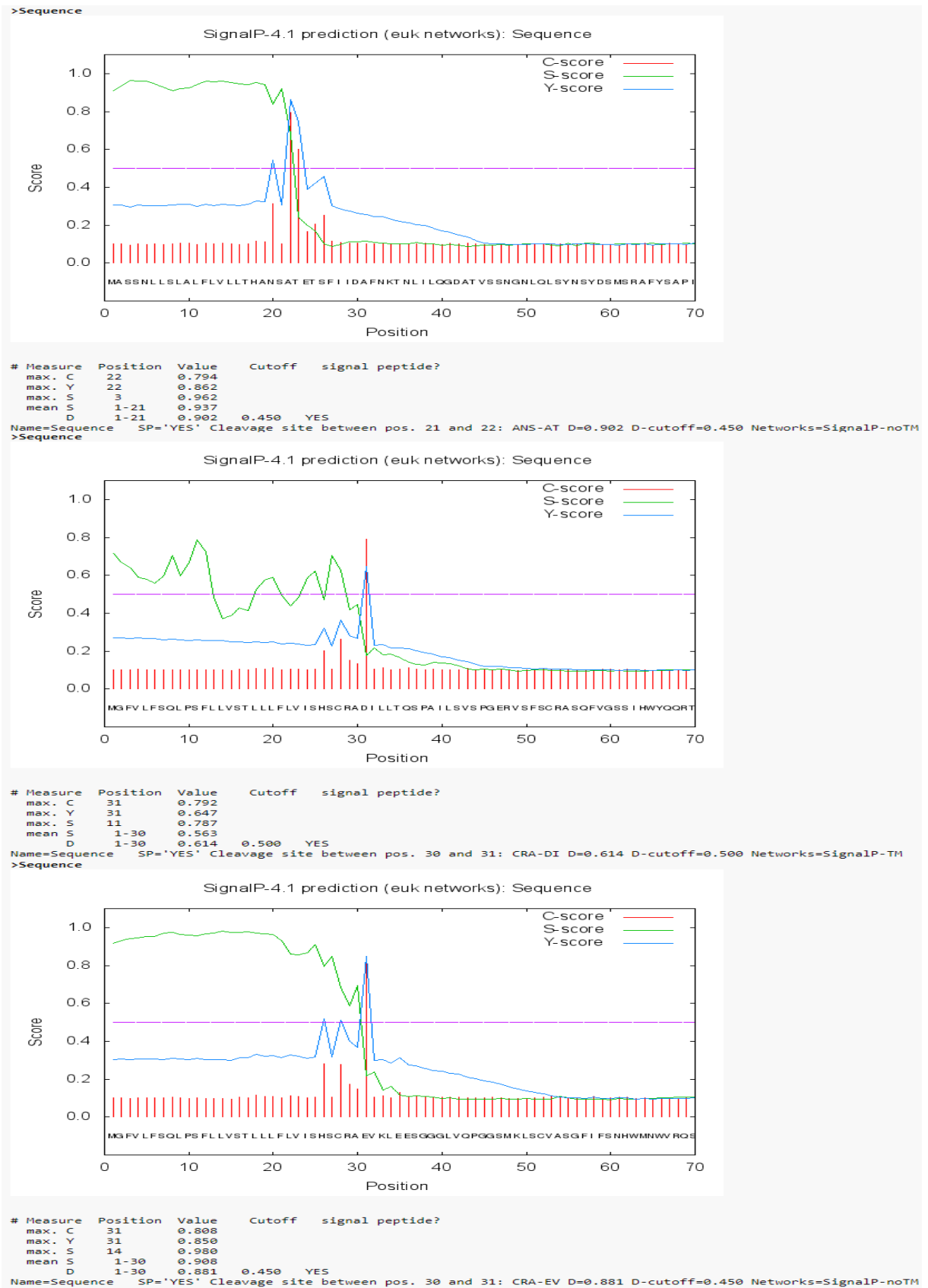


Figura 27. Predição de peptídeos-sinal para α -AIC3 e para as cadeias leve e pesada de IgG. Gráficos de predição de peptídeo-sinal N-terminal evidenciando picos referentes ao sítio de clivagem entre o peptídeo-sinal e a CDS de cada gene, superando o valor de *cut-off* em cada caso. A predição foi realizada no servidor SignalP 4.1 (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/).

5.2. DIGESTÃO ENZIMÁTICA, SUBCLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DE DNA

Após a amplificação dos vetores de clonagem pUC18: α -AIC3 e pUC18:IgG e do vetor de expressão vazio pBin61, em *E. coli*, a digestão enzimática dos vetores com as enzimas de restrição *Xba*I e *Bam*HI foram seguidas da revelação dos fragmentos esperados na eletroforese em gel de agarose. Na Figura 28, foram observados dois fragmentos referentes ao vetor pUC18: α -AIC3 (3.501 pb) digerido, sendo eles o inserto excisado, de 759 pb de tamanho, e o *backbone* do vetor pUC18, de 2.742 pb. Também foi observado um fragmento único referente ao vetor pBin61 (12.939 pb), conforme o esperado, uma vez que a digestão enzimática promoveu apenas a linearização do vetor, a qual foi estabilizada pela reação de desfosforilação. As alturas para cada fragmento foram identificadas com base no marcador de peso molecular Ladder 1 kb Plus (ThermoFisher Scientific™) e, uma vez identificados, os fragmentos do vetor linearizado e do inserto excisado foram removidos para recuperação.

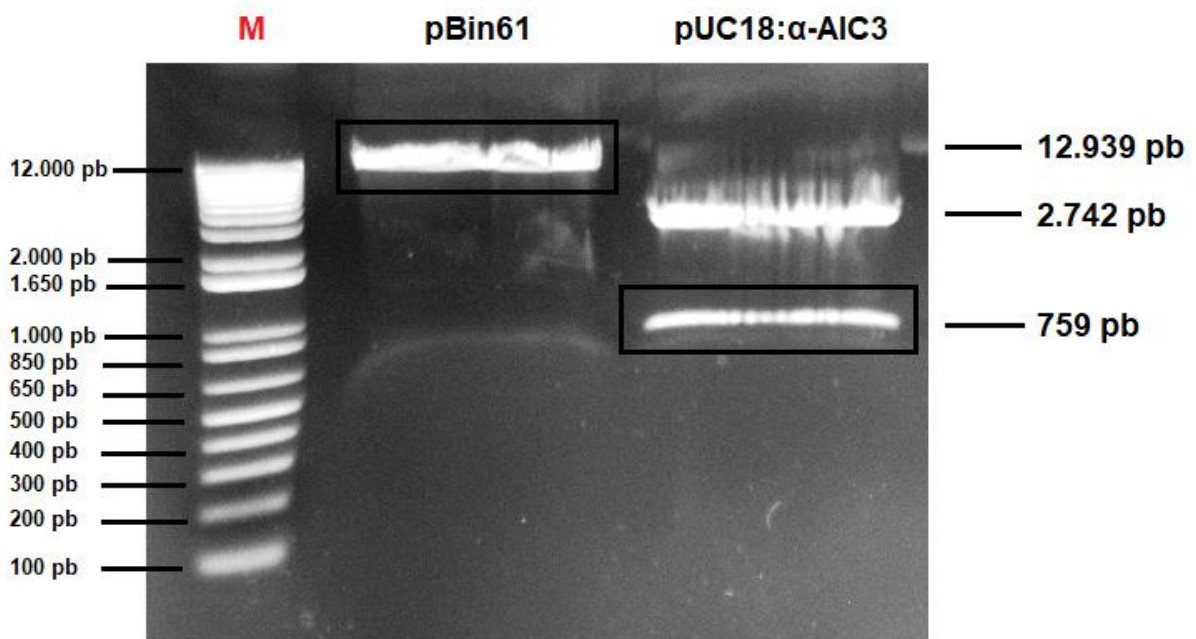


Figura 28. Eletroforese em gel de agarose para checagem da digestão enzimática de pBin61 e pUC18: α -AIC3. Fragmentos separados por eletroforese em gel de agarose a 1% e visualizados sob iluminação UV, corados com EtBr. Os fragmentos destacados na imagem são referentes ao vetor de expressão pBin61 linearizado e desfosforilado, na altura de 12.939 pb, e ao inserto excisado para α -AIC3, na altura de 759 pb. A banda na altura de 2.742 pb é referente ao *backbone* do vetor pUC18. Utilizou-se o marcador de peso molecular Ladder 1 kb Plus, cujas bandas são evidenciadas na primeira coluna.

Na Figura 29, foram observados dois fragmentos referentes ao vetor pUC18:IgG (5.928 pb) digerido, sendo eles o inserto excisado, de 3.186 pb, e o *backbone* do vetor pUC18, de 2.742 pb. Também foi observado um fragmento único referente ao vetor pBin61 (12.939

pb). As alturas para cada fragmento foram identificadas com base no marcador de peso molecular Ladder 1 kb (ThermoFisher Scientific™) e, uma vez identificados, os fragmentos do vetor linearizado e do inserto excisado foram removidos para recuperação.

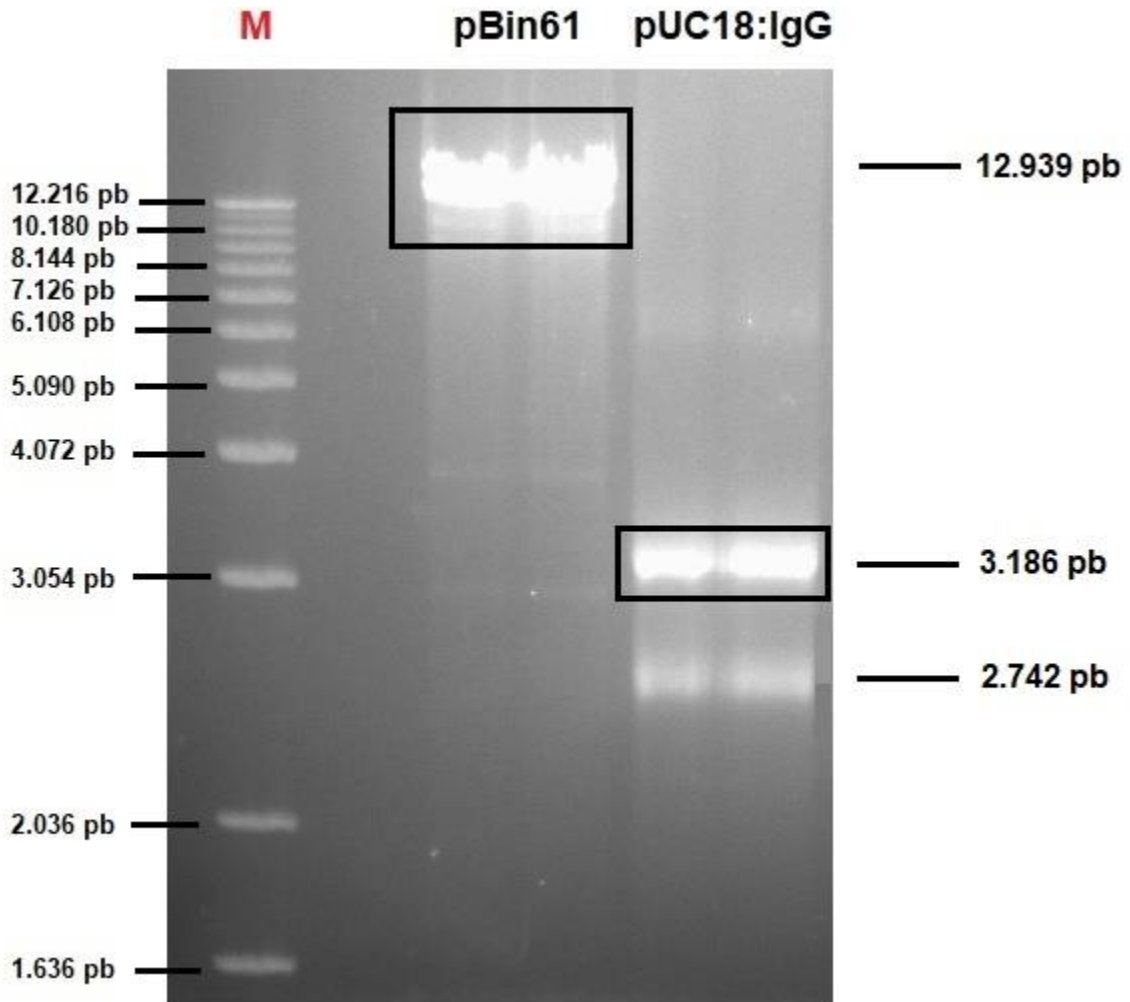


Figura 29. Eletroforese em gel de agarose para checagem da digestão enzimática de pBin61 e pUC18:IgG. Fragmentos separados por eletroforese em gel de agarose a 1% e visualizados sob iluminação UV, corados com EtBr. Os fragmentos destacados na imagem são referentes ao vetor de expressão pBin61 linearizado e desfosforilado, na altura de 12.939 pb, e ao inserto excisado para IgG, na altura de 3.186 pb. A banda na altura de 2.742 pb é referente ao *backbone* do vetor pUC18. Utilizou-se o marcador de peso molecular Ladder 1 kb, cujas bandas são evidenciadas na primeira coluna.

Os fragmentos recuperados para o vetor de expressão linearizado e para os insertos excisados foram utilizados na ligação gênica para gerar os vetores de expressão pBin61: α -AIC3 e pBin61:IgG (Figura 30). Estes vetores, bem como o vetor pBin61 vazio, foram amplificados em *E. coli* e os DNAs plasmidiais de 3 clones para cada ligação gênica e de 1 clone para o vetor vazio apresentaram o tamanho esperado conforme o marcador de peso molecular Ladder 1 kb Plus (ThermoFisher Scientific™) (Figura 31), ou seja, acima de 12 kpb.

De forma a confirmar o sucesso da ligação gênica, o sequenciamento de DNA dos clones para pBin61: α -AIC3 e pBin61:IgG, utilizando *primers* M13, foi conduzido e pôde demonstrar sequências dos insertos para α -AIC3 e para IgG adjacentes ao promotor 35S (Figura 32) e ao terminador 35S (Figura 33), respectivamente. Uma vez que elementos genéticos derivados dos vetores de clonagem e do vetor de expressão foram identificados em uma única sequência de nucleotídeos para cada sequenciamento, constatou-se que as ligações gênicas foram efetivadas e que os clones de *E. coli* estavam transformados com os vetores pBin61: α -AIC3 e pBin61:IgG. Um único clone para cada ligação gênica foi selecionado para proceder com os experimentos.

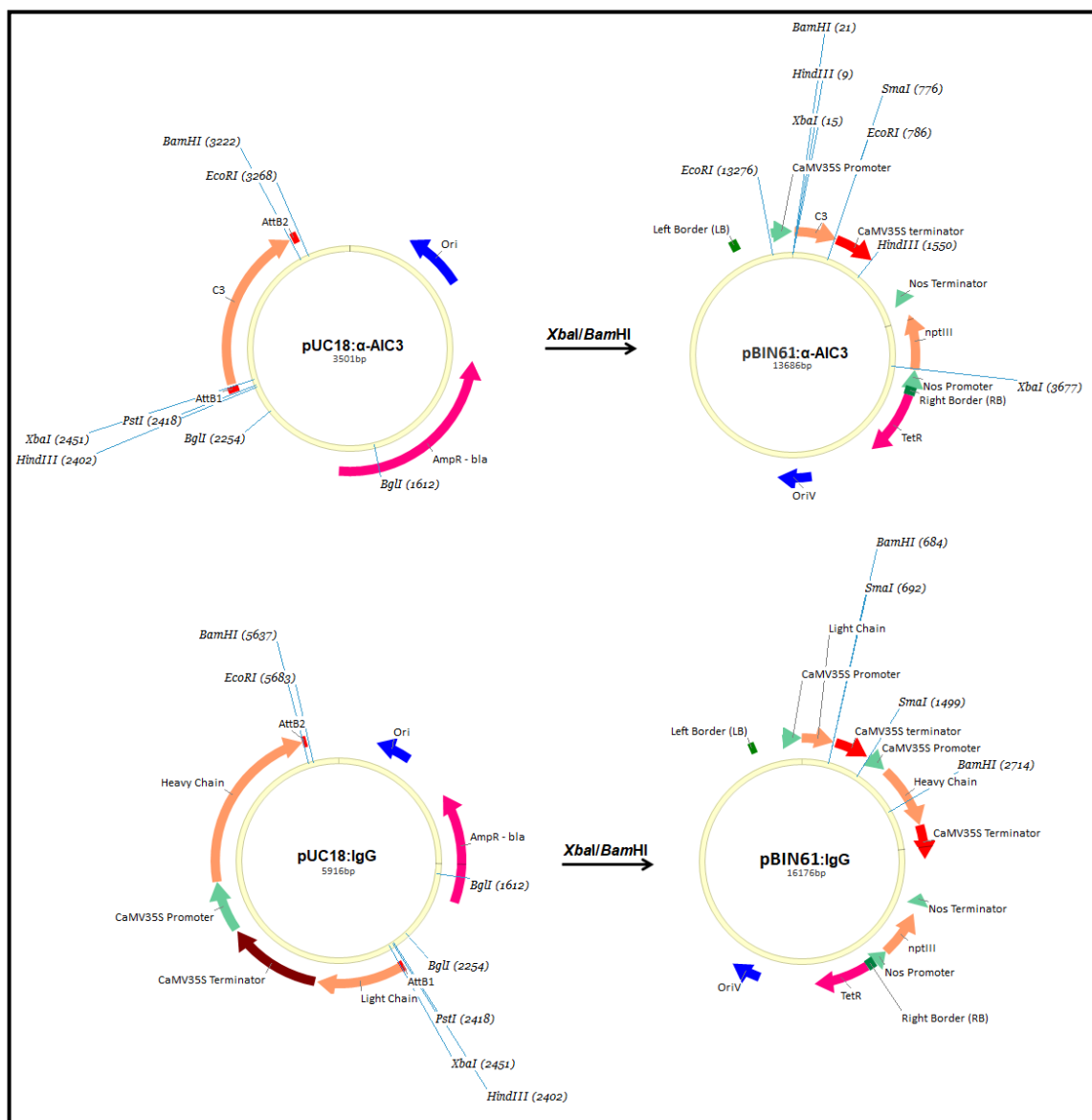


Figura 30. Vetores de clonagem e de expressão para α -AIC3 e IgG. Representação esquemática da subclonagem, no vetor pBin61, de insertos excisados dos vetores de clonagem pUC18: α -AIC3 e pUC18:IgG, utilizando as enzimas de restrição *XbaI* e *BamHI*, para gerar os vetores de expressão pBin61: α -AIC3 e pBin61:IgG.

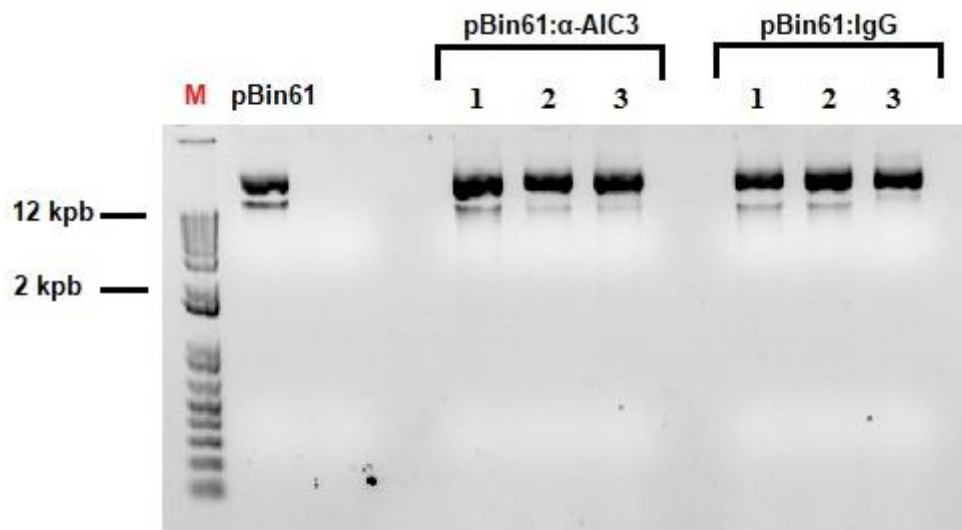


Figura 31. Eletroforese em gel de agarose para checagem da amplificação de vetores de expressão. DNAs plasmidiais amplificados e extraídos de *E. coli*, a partir de 1 clone para o vetor vazio pBin61 e 3 clones para os vetores pBin61:α-AIC3 e pBin61:IgG. As bandas identificadas encontram-se nas alturas esperadas, ou seja, acima de 12 kpb, conforme o marcador de peso molecular utilizado, Ladder 1 kb Plus.

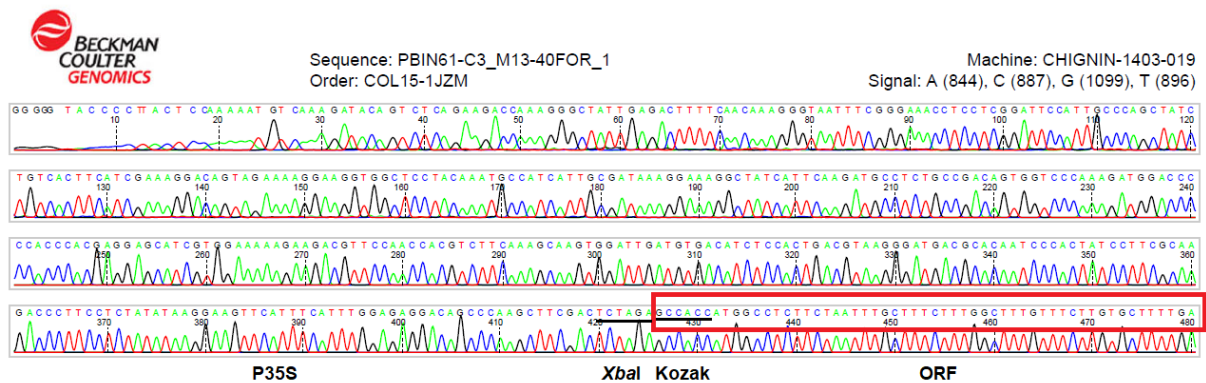


Figura 32. Eletroferograma para o sequenciamento do vetor pBin61:α-AIC3. Sequenciamento de clone plasmidial para o vetor pBin61:α-AIC3 utilizando *primer forward* M13. Podem ser identificados picos referentes aos nucleotídeos para o promotor 35S (P35S), adjacente ao sítio de restrição *XbaI* e à ORF englobando a sequência consenso de Kozak, as quais estão destacadas em vermelho, confirmando a efetivação da ligação gênica.

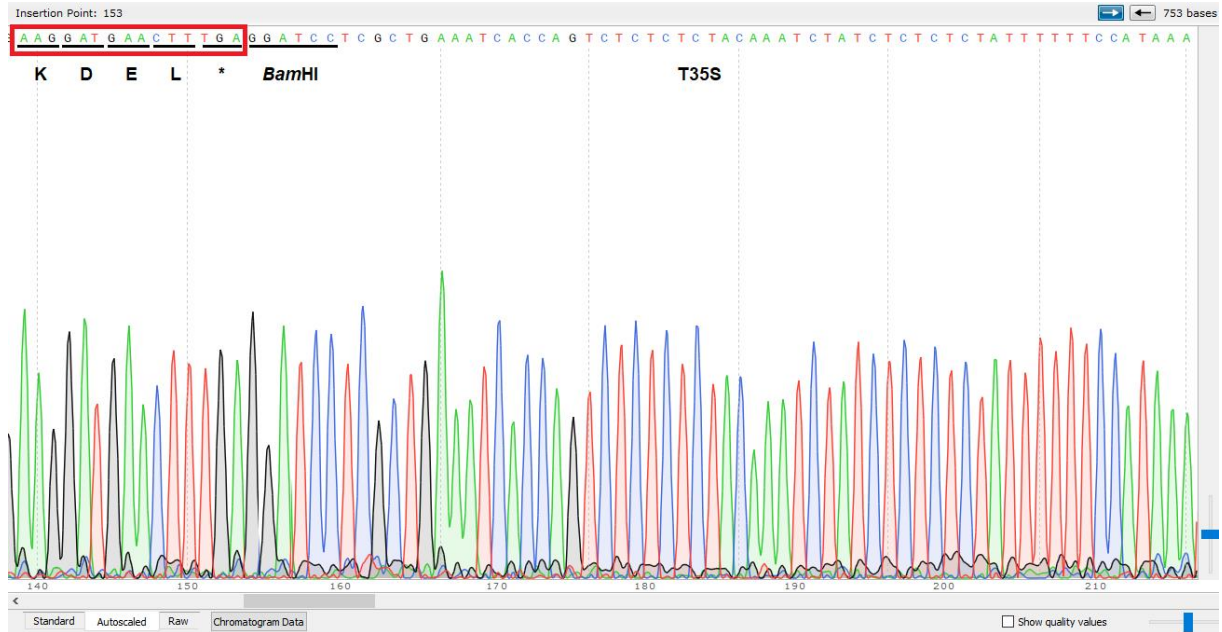


Figura 33. Eletroferograma para o sequenciamento do vetor pBin61:IgG. Sequenciamento de clone plasmidial para o vetor pBin61:IgG utilizando *primer reverse* M13. Podem ser identificados picos referentes aos nucleotídeos para a ORF englobando parte do peptídeo-sinal de retenção e o *stop codon*, os quais estão destacados em vermelho, adjacente ao sítio de restrição *Bam*HI e ao terminador 35S (T35S), confirmando a efetivação da ligação gênica. O eletroferograma foi visualizado no software SnapGene® Viewer 4.1.3.

5.3. AGROINFILTRAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS

Plantas de *N. benthamiana* com 4 semanas de idade foram infiltradas com os coquetéis de agroinfiltração para os vetores pBin61, pBin61: α -AIC3 e pBin61:IgG, cada um contendo os 3 clones para os supressores virais de silenciamento, e, uma vez finalizados os tempos de cultivo para cada grupo de plantas, as folhas infiltradas foram coletadas. Foi possível observar halos de clorose em todos os grupos de plantas, ao se comparar folhas infiltradas com folhas não infiltradas (Figura 34). As folhas infiltradas e coletadas nos diferentes dpi desenvolveram o mesmo padrão mostrado na Figura 34, não havendo diferenças significativas na intensidade dos halos.



Figura 34. Halos cloróticos de infiltração em folha de *N. benthamiana*. A figura mostra, à esquerda, uma folha de *N. benthamiana* não infiltrada com coquetel de agroinfiltração e, à direita, uma folha infiltrada em dois pontos do limbo com uma seringa sem agulha, e em torno dos quais a área atingida pelo coquetel de agroinfiltração desenvolveu reação clorótica. É esperado que as proteínas de interesse estejam confinadas nos halos de infiltração.

Após o isolamento das regiões cloróticas, os valores de massa fresca foram obtidos para cada grupo de coleta. Após a maceração dos tecidos foliares de cada grupo e extração de suas proteínas solúveis utilizando os respectivos tampões de extração, determinou-se o volume de cada extrato. Além disso, obteve-se o valor de concentração de proteínas em cada extrato por quantificação pelo método de Bradford. Particularmente ao extrato para α -AIC3, também se dialisou a amostra contra água para eliminação de D-glicose. Posteriormente à diálise e clarificação do extrato, registrou-se novamente o volume do extrato proteico, bem como sua nova concentração utilizando o mesmo método de quantificação de proteínas. Os valores de massa fresca, volumes de extrato proteico e concentrações de proteína solúvel foram registrados na Tabela 1, de forma a ser utilizada no cálculo de rendimento de cada proteína de interesse.

Tabela 1. Grandezas físicas relativas aos materiais biológicos de agroinfiltração para produção das proteínas de interesse α -AIC3 e IgG.

GRANDEZA	α-AIC3	IgG (6 dpi)	IgG (12 dpi)
Massa foliar fresca	25,57 g	9,4 g	6,71 g
Volume de extrato	54 mL (70 mL*)	21 mL	16 mL
Concentração comum	0,31 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (0,13 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ *)	0,19 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0,23 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

*Valores de volume e concentração comum obtidos após a diálise do extrato para α -AIC3.

5.4. SDS-PAGE E WESTERN BLOT

O extrato para α -AIC3 foi analisado comparativamente ao controle negativo em SDS-PAGE 15%, corado com Coomassie Brilliant Blue G-250, e via Western blot utilizando anticorpo específico anti- α -AIC3 (Figura 35). No gel corado, foi possível observar bandas diferenciais para a amostra de α -AIC3 nas alturas de 11 kDa e 15 kDa, as quais correspondem às alturas esperadas para as subunidades α e β da proteína α -AIC3 processada, respectivamente. O resultado se confirmou no Western blot, no qual as mesmas bandas diferenciais apresentaram alta intensidade. Além disso, bandas de maior peso molecular, embora de menor intensidade, foram visualizadas na faixa de 26 a 28 kDa, que corresponde à faixa de altura esperada para a proteína α -AIC3 não-processada. Não foram identificadas bandas com sinal significativo para o controle negativo no Western blot.

A presença de bandas nas diferentes faixas de peso molecular sugere processamento proteolítico parcial do total de proteína de interesse. Adicionalmente, pode-se observar que todas as bandas não apresentaram padrão linear, mas sim empilhado, sugerindo proximidade de isoformas para as diferentes bandas, que podem ser variantes de glicosilação, já que há 3 séquons potenciais de N-glicosilação na cadeia polipeptídica desta proteína, sendo 2 deles (N-K-T e N-F-T) existentes na subunidade α e 1 deles (N-S-S) existente na subunidade β . O resultado observado apontou que houve expressão e acúmulo da proteína de interesse, nas formas processada e não-processada, em folhas infiltradas com coquetéis de agroinfiltração para pBin61: α -AIC3.

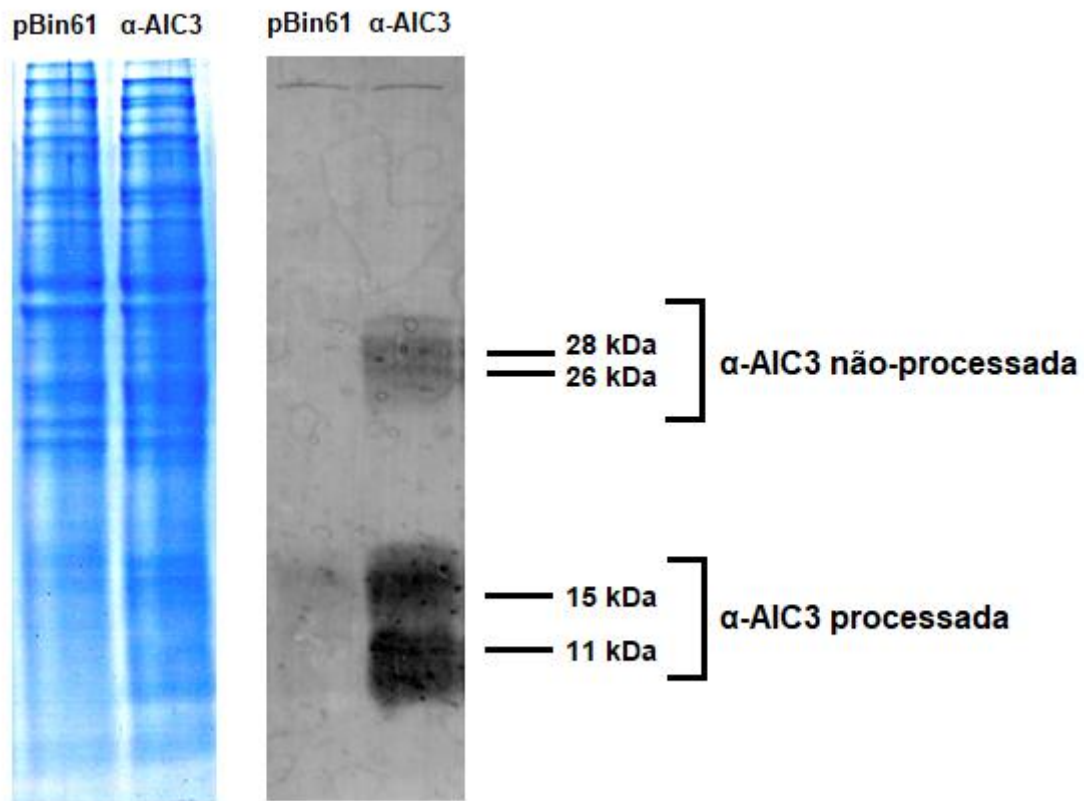


Figura 35. SDS-PAGE e Western blot para análise da proteína α -AIC3. À esquerda, uma imagem de SDS-PAGE a 15% corado com Coomassie Brilliant Blue G-250, contendo amostras de extrato para pBin61 e para pBin61: α -AIC3, evidenciando bandas diferenciais de baixo peso molecular, nas alturas esperadas para as subunidades α (11 kDa) e β (15 kDa). À direita, uma imagem do Western blot para o gel-espelho, revelado utilizando anticorpo específico anti- α -AIC3, e evidenciando as mesmas bandas diferenciais observadas no gel corado, bem como bandas adicionais de maior peso molecular, na faixa de 26 a 28 kDa, ou seja, na altura esperada para a forma não-processada da proteína α -AIC3.

Analisando-se novamente as amostras por eletroforese de proteínas, porém após serem submetidas à diálise contra água, foi possível observar, no gel corado (Figura 36-A), a presença de bandas diferenciais nítidas e intensas para as amostras de α -AIC3, não apenas nas alturas de 11 kDa e 15 kDa, mas também na faixa de 26 a 28 kDa, observadas no Western blot para amostras não-dialisadas. Uma banda também na altura de 15 kDa foi observada na amostra de controle positivo, conforme esperado, uma vez que este consistiu na subunidade β da proteína α -AIC3, expressa em *E. coli* e purificada. No Western blot do gel-espelho (Figura 36-B), as mesmas bandas foram visualizadas para o controle positivo e para as amostras de α -AIC3. Também não foram identificadas bandas para o controle negativo no Western blot.

Observando-se a proporção de bandas para as amostras de α -AIC3, verificou-se a predominância de bandas referentes às alturas esperadas para a proteína de interesse, tanto na

forma processada quanto na forma não-processada, em relação ao total de proteínas solúveis. Isso provavelmente se deveu à precipitação, durante o processo de diálise, de uma porção significativa das proteínas correspondentes às outras bandas visualizadas no gel anterior (Figura 35), uma vez que a alta solubilidade da proteína α -AIC3 em água pode contribuir para que esta permaneça solúvel enquanto outras proteínas do extrato bruto precipitem, já que o solvente utilizado na diálise foi água ultrapura, e a constatação da formação de partículas dentro do cassete de diálise reforça esta hipótese. Com isso, o processo de diálise pode ter se tornado vantajoso no enriquecimento da proteína de interesse no extrato de proteínas solúveis.

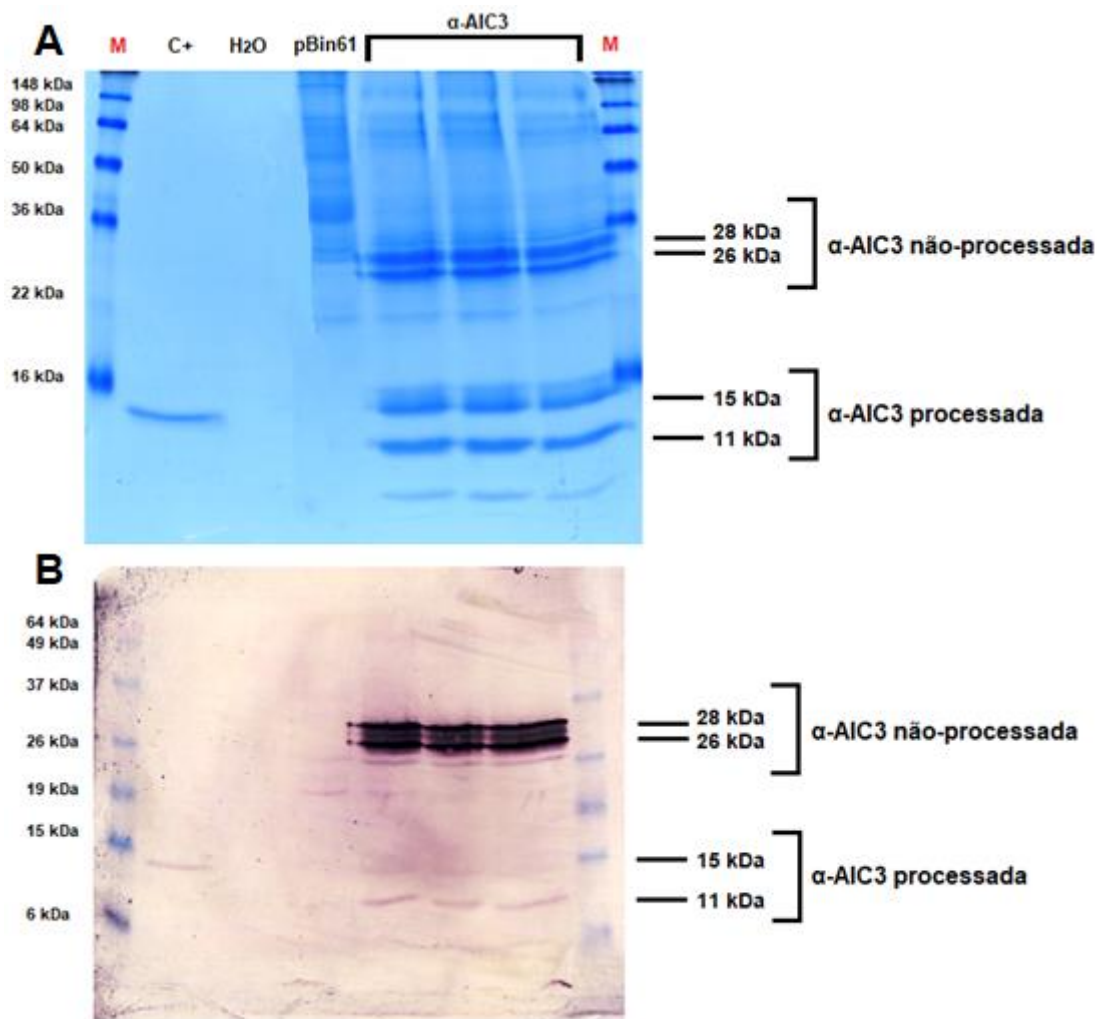


Figura 36. SDS-PAGE e Western blot para análise da proteína α -AIC3 após diálise. A) SDS-PAGE a 15% corado com Coomassie Brilliant Blue G-250, contendo amostras de extrato para pBin61 e para uma triplicata de pBin61: α -AIC3, evidenciando bandas diferenciais de baixo peso molecular, nas alturas esperadas para as subunidades α (11 kDa) e β (15 kDa), bem como as bandas de maior peso molecular, na faixa de 26 a 28 kDa, reveladas anteriormente no Western blot para extratos não-dialisados e referentes à forma não-processada da proteína α -AIC3. Adicionalmente, as amostras foram comparadas com um controle positivo consistindo na subunidade β de α -AIC3 expressa em *E. coli* e purificada; B) Western blot para o gel-espelho, revelado utilizando anticorpo específico anti- α -AIC3, e evidenciando as mesmas bandas diferenciais observadas no gel corado, validando-se o experimento pela observação da banda para a subunidade β do controle positivo.

Os extratos de 6 dpi e 12 dpi para IgG foram analisados comparativamente ao controle negativo em SDS-PAGE 12%, corado com nitrato de prata (Figura 37), e via Western blot utilizando proteína A (Figura 38-B). Uma vez que a desnaturação de proteínas para aplicação em gel promoveu a formação de uma quantidade significativa de precipitado, a visualização de bandas com corante Coomassie Blue ficaria prejudicada, optando-se, com isso, a se proceder com a coloração por nitrato de prata. No gel corado, portanto, foi possível observar bandas diferenciais de intensidade fraca para as amostras de IgG nas alturas de 23 kDa e 48 kDa, as quais correspondem às alturas esperadas para as cadeias leve e pesada, respectivamente. As referidas bandas puderam ser melhor visualizadas na membrana de nitrocelulose corada com Ponceau S (Figura 38-A), embora as bandas indicativas para cadeia pesada nas amostras vegetais tenham se situado pouco abaixo da altura esperada. Analisando-se o controle positivo, foi possível verificar uma mudança no perfil de bandas quando em condições não-redutoras (sem DTT) e redutoras (com DTT), com predomínio de bandas de maior e de menor peso molecular, respectivamente. Para a amostra sem DTT, inclusive, observou-se um arraste na faixa de 100 kDa a 150 kDa, o que pode corresponder à faixa de tamanho das formas n-méricas da imunoglobulina (Figuras 37 e 38). Por outro lado, para a amostra com DTT, observaram-se bandas em diferentes alturas, na faixa de 23 kDa a 50 kDa (Figuras 37 e 38-A), em que a banda de aproximadamente 50 kDa apresentou maior intensidade e perfil não-linear, possivelmente se devendo à ocorrência de N-glicosilação na cadeia pesada, o que produz glicofomas cujos tamanhos geram bandas bastante próximas entre si.

Analisando-se o Western blot para IgG (Figura 38-B), foi possível observar um arraste para o controle positivo não-reduzido, de perfil semelhante ao produzido no gel corado. Porém, nas amostras vegetais, tanto de 6 dpi quanto de 12 dpi, foram detectadas bandas de alto peso molecular (aproximadamente 142 kDa), correspondendo à altura esperada para a forma heterotetramérica da imunoglobulina, embora não estivessem nítidas no gel corado ou na membrana corada. Observou-se maior intensidade da banda de alto peso na amostra de 12 dpi, sugerindo que um maior tempo de cultivo está correlacionado ao maior acúmulo desta proteína de interesse. Em nenhuma das amostras em condições redutoras, o que inclui o controle positivo, foi possível observar a presença de bandas, o que corrobora com o fato de que a detecção ocorre com base na ligação da proteína A à região Fc das imunoglobulinas, a qual em condições redutoras é desfeita pela redução dos resíduos de cisteína que estabelecem

pontes dissulfeto entre as cadeias pesadas, que permanecem, portanto, isoladas, impedindo que haja ligação e detecção.

Também não foram identificadas bandas com sinal significativo para o controle negativo no Western blot. O resultado obtido apontou que houve expressão, acúmulo e montagem da proteína de interesse na forma heterotetramérica, em folhas infiltradas com coquetéis de agroinfiltração para pBin61:IgG.

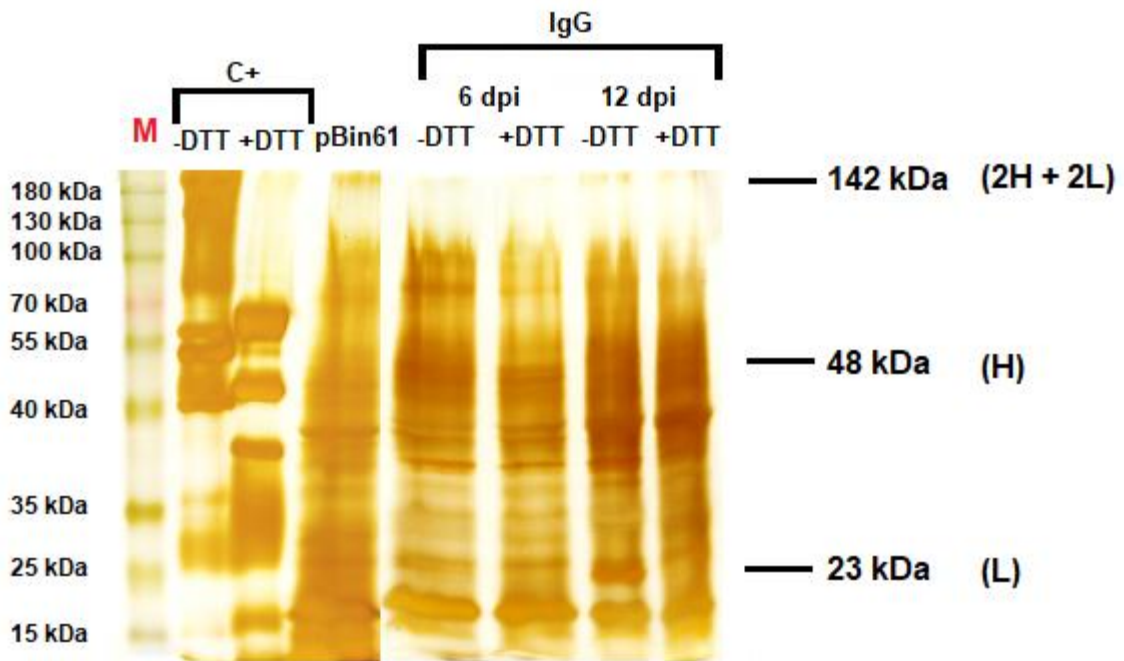


Figura 37. SDS-PAGE para análise da proteína IgG. Imagem de SDS-PAGE a 12% corado com nitrato de prata, contendo amostras de extrato para pBin61 e para pBin61:IgG de 6 dpi e 12 dpi, evidenciando bandas diferenciais de intensidade fraca e de baixo peso molecular, nas alturas esperadas para a cadeia leve (23 kDa) e pesada (48 kDa), bem como as bandas de maior peso molecular, na faixa de 100 a 150 kDa, referentes às formas n-mericas da imunoglobulina. As amostras foram comparadas com um controle positivo (C+) consistindo em IgG cunicular comercial. Para o controle positivo e para as amostras de extrato para pBin61:IgG, foi feita a análise em condições não-redutoras (sem DTT) e redutoras (com DTT).

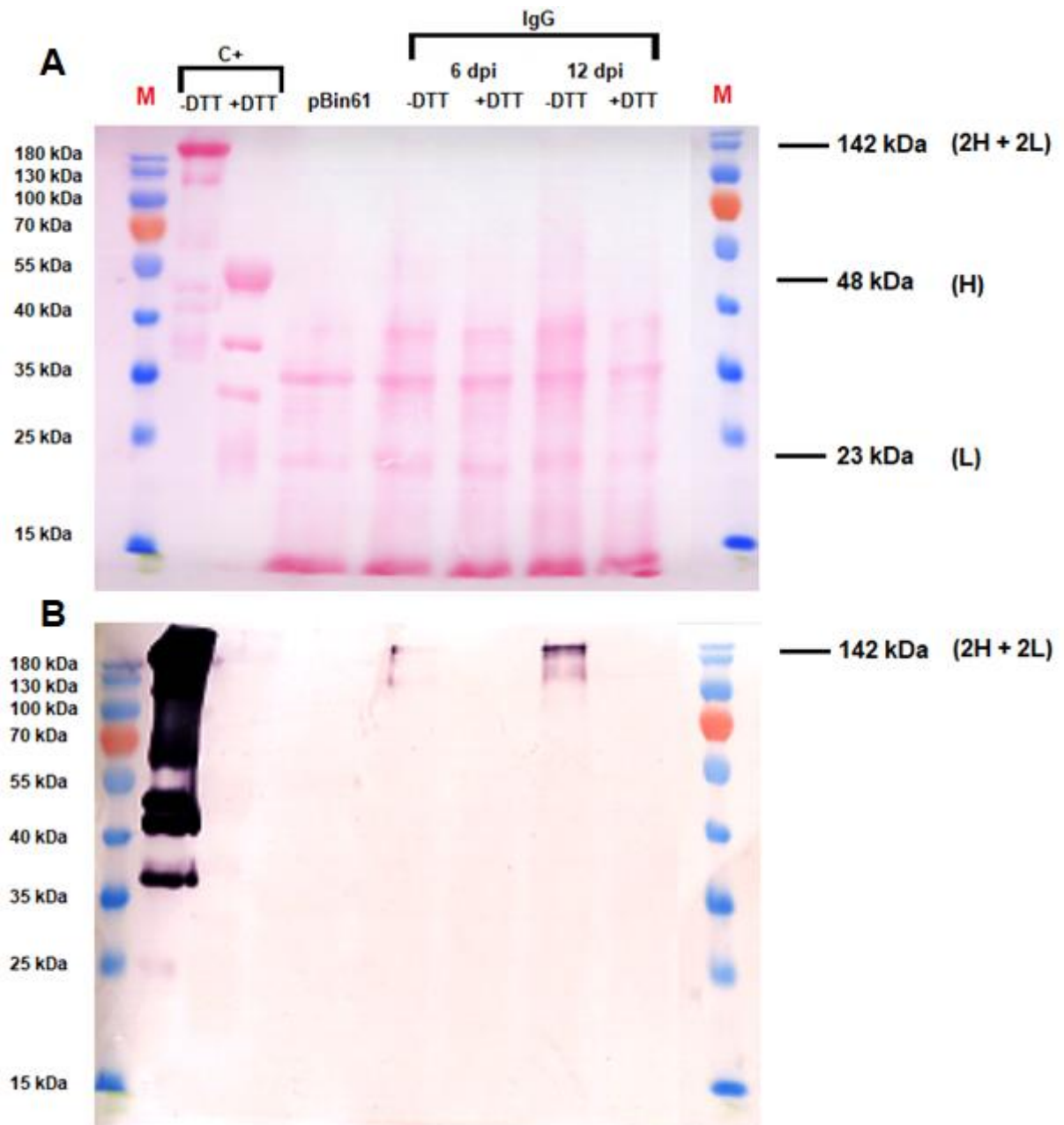


Figura 38. Revelação com Ponceau S e Western blot para análise da proteína IgG. A) Membrana de nitrocelulose após transferência de proteínas e coloração com Ponceau S, contendo amostras de extrato para pBin61 e para pBin61:IgG de 6 dpi e 12 dpi, evidenciando bandas diferenciais de baixo peso molecular, nas alturas para a cadeia leve (23 kDa) e pesada (48 kDa). As amostras foram comparadas com um controle positivo (C+) consistindo em IgG cunicular comercial. Para o controle positivo e para as amostras de extrato para pBin61:IgG, foi feita a análise em condições não-redutoras (sem DTT) e redutoras (com DTT); B) Western blot para o gel-espelho, revelado utilizando proteína A, e evidenciando bandas diferenciais de alto peso para amostras em condições não-redutoras, também observadas juntamente com o arraste do controle positivo nas mesmas condições. Não foram observadas bandas para as amostras em condições redutoras, conforme o esperado.

5.5. ANÁLISE DE RENDIMENTO DAS PROTEÍNAS DE INTERESSE

As proteínas α -AIC3 dialisada e IgG foram quantificadas a partir do extrato de proteínas solúveis totais, via ELISA indireto e direto, respectivamente, e avaliadas quanto ao rendimento. As curvas-padrão de absorvância, utilizadas como parâmetro para o cálculo de rendimento, foram obtidas com base nos controles positivos utilizados anteriormente em Western blot, e estão representadas nas Figuras 39 e 40.

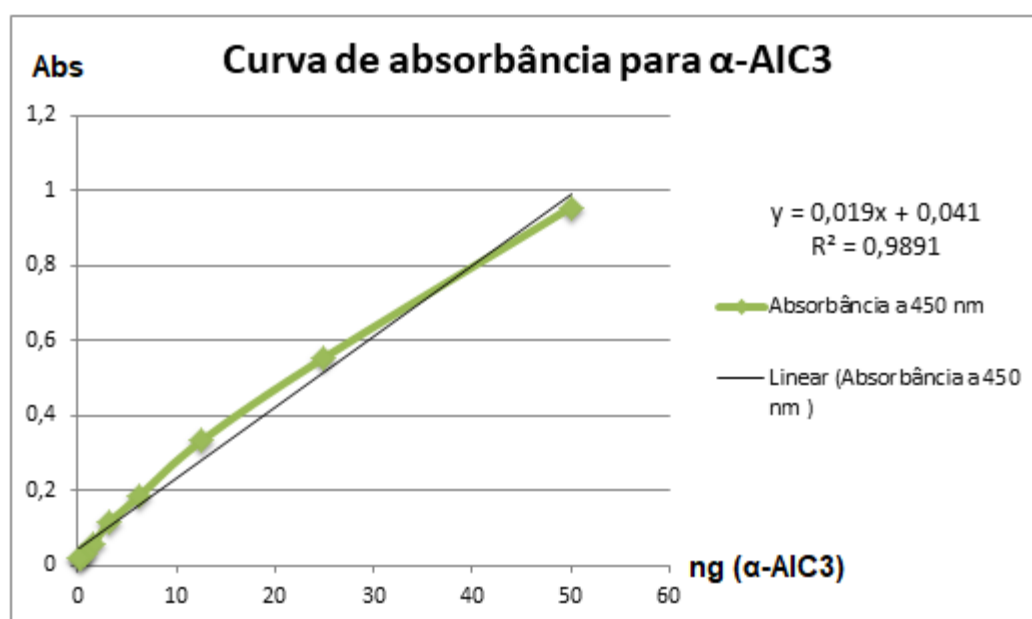


Figura 39. Curva-padrão de absorvância para a proteína α -AIC3. O gráfico de dispersão apresenta a correlação entre a quantidade de proteína α -AIC3 (em ng, no eixo x) e o valor de absorvância a 450 nm (eixo y), expressa pela regressão linear $y = 0,019x + 0,041$. A curva-padrão foi estabelecida com base em gradiente de subunidade β da proteína α -AIC3, expressa em *E. coli* e posteriormente purificada, detectada por anticorpo específico anti- α -AIC3 em ELISA, e foi utilizada para calcular o rendimento (em %TSP) da proteína de interesse no extrato de proteínas solúveis totais.

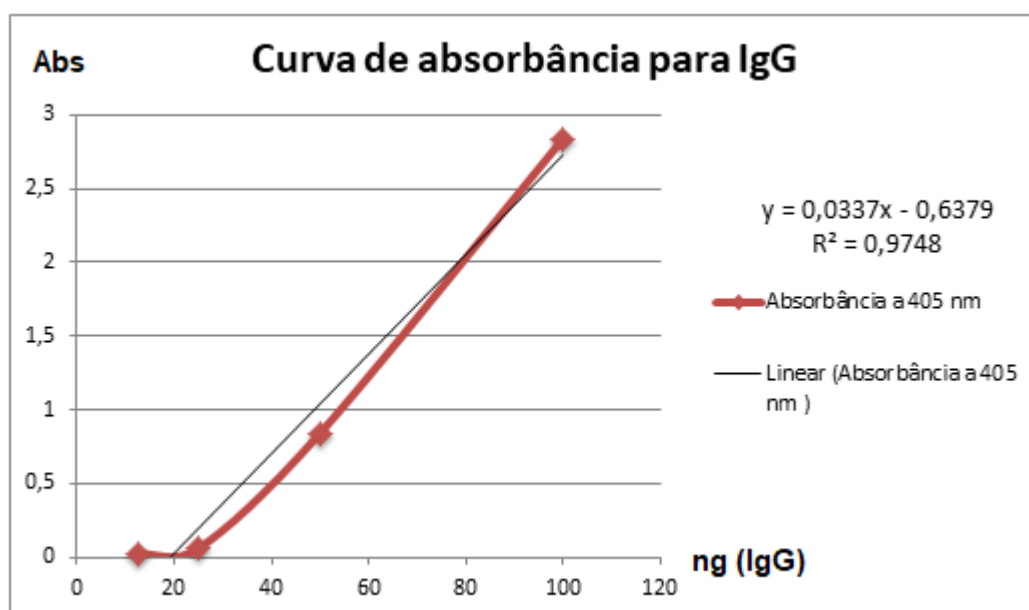


Figura 40. Curva-padrão de absorvância para a proteína IgG. O gráfico de dispersão apresenta a correlação entre a quantidade de proteína IgG (em ng, no eixo x) e o valor de absorvância a 405 nm (eixo y), expressa pela regressão linear $y = 0,0337x - 0,6379$. A curva-padrão foi estabelecida com base em gradiente de IgG cunicular comercial, detectada por proteína A em ELISA, e foi utilizada para calcular o rendimento (em %TSP) da proteína de interesse no extrato de proteínas solúveis totais.

Utilizando os valores de absorvância das respectivas curvas, as concentrações das proteínas de interesse foram primeiramente calculadas de acordo com a absorvância obtida para dada massa total de proteínas solúveis, conforme a seguir, e estão indicadas no gráfico da Figura 41, em %TSP. Os valores de absorvância para o controle negativo (pBin61) não diferiram dos valores para 0 ng de controle positivo na curva-padrão. Para a proteína α -AIC3, realizou-se o cálculo com base em 80 ng de proteínas solúveis, apenas, uma vez que o valor obtido em 160 ng de proteínas solúveis ultrapassou o valor de absorvância abrangido pela curva-padrão, inviabilizando o cálculo de rendimento com confiabilidade estatística. Sendo assim, foram estimados 35,2 ng de α -AIC3 em 80 ng de proteínas solúveis, ou seja, 44% TSP.

Para a proteína IgG de 6 dpi, foram estimados 6,85 ng de IgG em 80 ng de proteínas solúveis, ou seja, 8,56% TSP, e 8,43 ng de IgG em 160 ng de proteínas solúveis, ou seja, 5,27% TSP. O rendimento final foi obtido pela média aritmética de ambos os valores, indicando aproximadamente 7% TSP. Para a proteína IgG de 12 dpi, foram estimados 7,52 ng de IgG em 80 ng de proteínas solúveis, ou seja, 9,40% TSP, e 19,87 ng de IgG em 160 ng de

proteínas solúveis, ou seja, 12,42% TSP. O rendimento final foi igualmente obtido pela média aritmética de ambos os valores, resultando em aproximadamente 11% TSP.

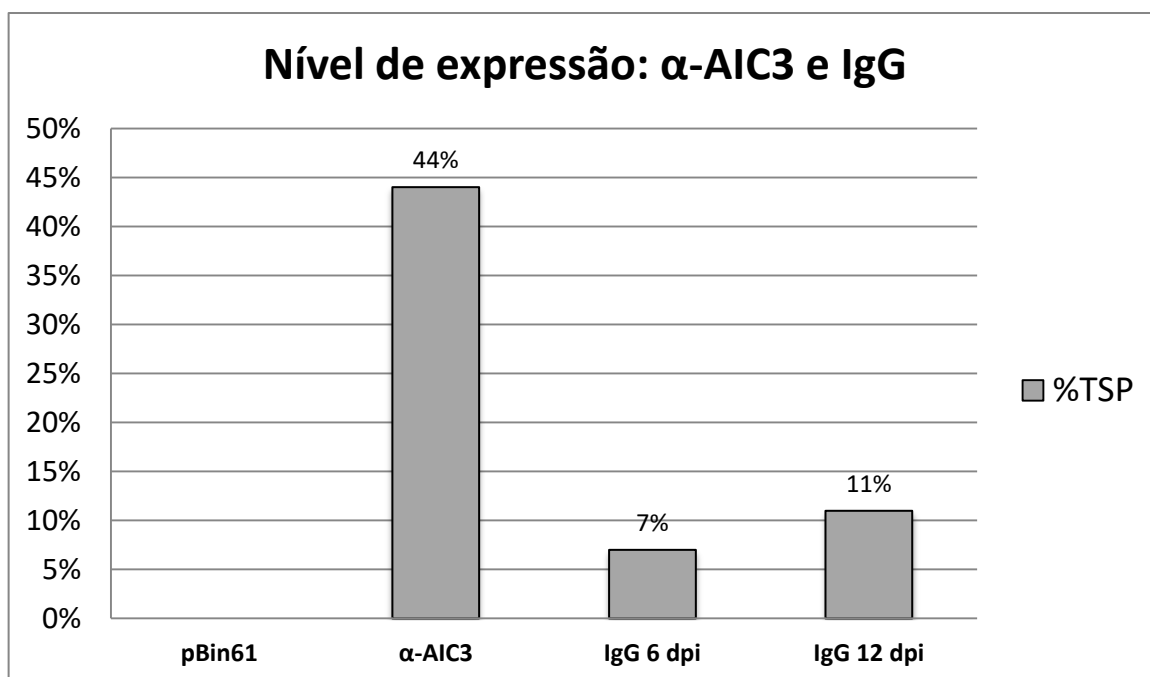


Figura 41. ELISA: nível de expressão das proteínas de interesse α -AIC3 e IgG. O gráfico de colunas apresenta o nível de expressão para cada proteína de interesse avaliada, traduzido como rendimento em %TSP, com base nas curvas-padrão estabelecidas em ELISA e comparativamente ao controle negativo (pBin61). A proteína α -AIC3 correspondeu a 44% TSP, e a proteína IgG correspondeu a 7% TSP para 6 dpi e 11% TSP para 12 dpi.

Posteriormente, os valores de rendimento em %TSP para cada proteína foram utilizados para calcular a massa de proteína de interesse existente no extrato utilizado, conhecendo-se os seus volumes e concentrações respectivos. Uma vez descobertos os valores de massa, o rendimento foliar foi calculado pela divisão por cada valor de massa fresca de tecido coletado, e ambos os rendimentos foram registrados na Tabela 2.

Para a proteína α -AIC3, foram recuperados 70 mL de extrato dialisado a 0,13 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a partir de 25,57 g de folha fresca. O extrato dialisado, portanto, continha 9,1 mg de proteínas solúveis, das quais 44% foram estimadas como sendo α -AIC3, ou seja, 4 mg de α -AIC3, o que, relacionando-se com a massa de folha fresca, indica rendimento foliar aproximado de 156 mg/kg. Para a proteína IgG de 6 dpi, foram recuperados 21 mL de extrato a 0,19 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a partir de 9,4 g de folha fresca. O extrato, portanto, continha 4 mg de proteínas solúveis, das quais 7% foram estimadas como sendo IgG, ou seja, 0,28 mg de IgG, o que, relacionando-se com a massa de folha fresca, indica rendimento foliar aproximado de 30 mg/kg. Para a

proteína IgG de 12 dpi, foram recuperados 16 mL de extrato a 0,23 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a partir de 6,71 g de folha fresca. O extrato, portanto, continha 3,68 mg de proteínas solúveis, das quais 11% foram estimadas como sendo IgG, ou seja, 0,40 mg de IgG, o que, relacionando-se com a massa de folha fresca, indica rendimento foliar aproximado de 60 mg/kg. Os resultados para IgG indicaram, portanto, que dobrar o tempo de cultivo culmina em maior acumulação da proteína de interesse, resultando no dobro de rendimento foliar. Observando-se a discrepância entre os valores de rendimento para $\alpha\text{-AIC3}$ e para IgG, reforça-se que a diálise de proteínas promoveu o enriquecimento de $\alpha\text{-AIC3}$ a ponto de refletir em um rendimento significativamente maior desta, observado após aferição por ELISA.

Tabela 2. Rendimentos relativos às proteínas de interesse $\alpha\text{-AIC3}$ e IgG, em %TSP e mg/kg de folha.

VARIÁVEL	$\alpha\text{-AIC3}$	IgG (6 dpi)	IgG (12 dpi)
%TSP (ELISA)	44%	7%	11%
Rendimento foliar	156 mg/kg	30 mg/kg	60 mg/kg

5.6. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE INTERESSE

Realizou-se a purificação da proteína $\alpha\text{-AIC3}$ dialisada via cromatografia de exclusão molecular. Ao todo, 90 frações de eluição foram coletadas, das quais o cromatograma gerado (Figura 42) demonstrou picos significativos para as frações 10 a 14, 16 a 20 e 30 a 58, sendo o intervalo 16-20 o de maior intensidade, com 16,5 mAU. Destas, as frações 12, 17, 18, 19, 37, 40 e 42, bem como a fração 26, foram selecionadas e visualizadas após eletroforese de proteínas (Figura 43). O gel, após corado, revelou que as frações 17, 18 e 19 contiveram a maior parte da proteína de interesse conforme as alturas esperadas para as bandas. O perfil das bandas foi exatamente o mesmo observado nos experimentos de Western blot das Figuras 35 e 36, confirmando a efetivação da purificação da proteína $\alpha\text{-AIC3}$. As outras frações apresentaram bandas de intensidade bastante fraca, apenas. Comparando-se a fração de lavagem com o extrato bruto, verificou-se um perfil idêntico, sugerindo que grande parte das proteínas foi eluída, exceto a $\alpha\text{-AIC3}$, que foi parcialmente retida na coluna, embora ainda houvesse bandas correspondentes para $\alpha\text{-AIC3}$ na fração de lavagem, o que pode ser devido à carga da proteína de interesse que, por ser alta, saturou a coluna cromatográfica, impedindo que todo o conteúdo da proteína se retivesse para somente depois ser eluído. No gel de tris-tricina (Figura 44), o mesmo perfil eletroforético foi observado para as frações reunidas, com bandas suficientemente distantes para se realizar a excisão de *spots*.

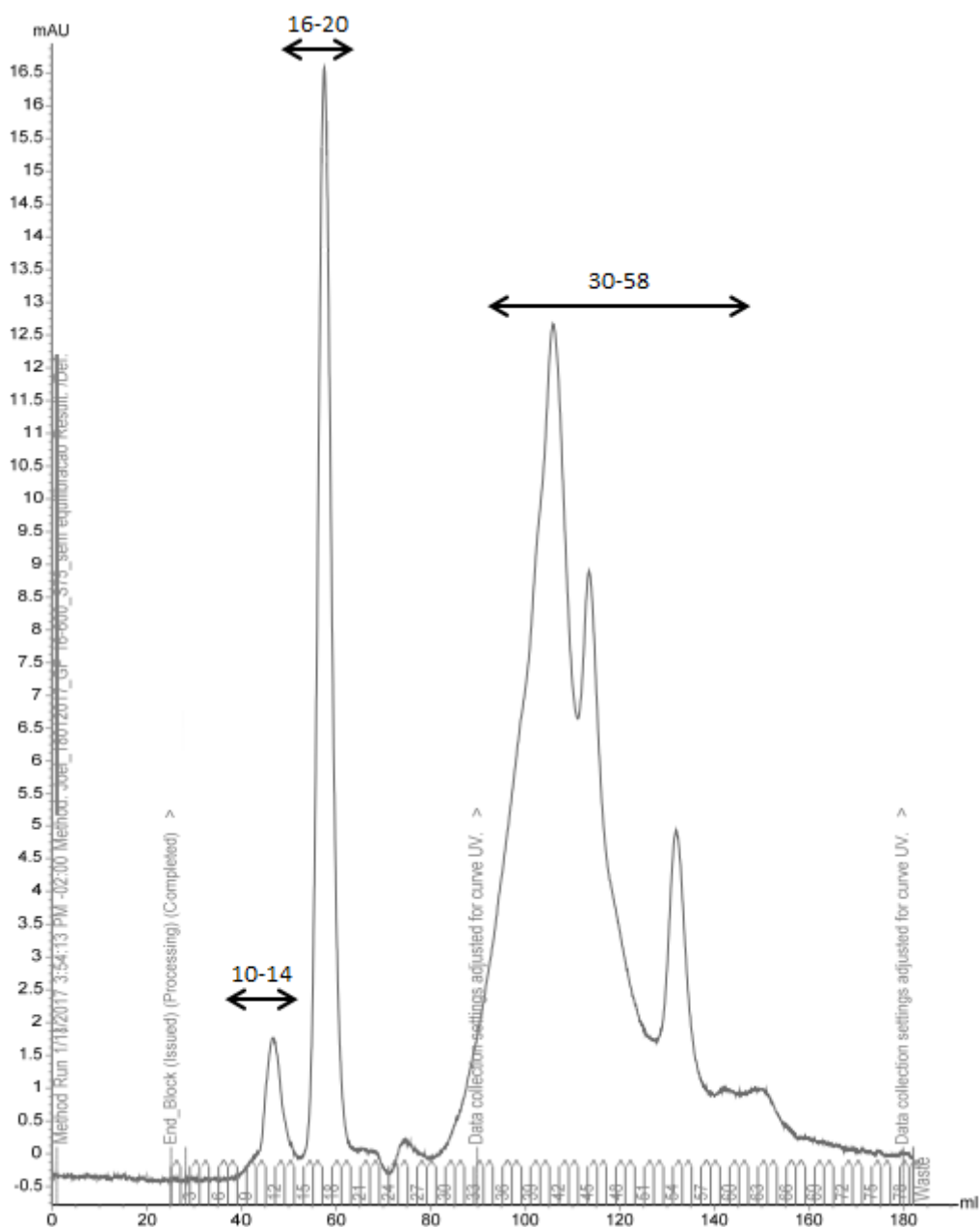


Figura 42. Cromatograma para a purificação da proteína α -AIC3. O gráfico evidencia picos de eluição da cromatografia de exclusão molecular para a amostra dialisada contendo a proteína α -AIC3. Com um total de 90 frações de eluição, as frações 10-14, 16-20 e 30-58 englobaram os picos de eluição mais evidentes, sendo o pico da faixa 16-20 o de maior intensidade, com 16,5 mAU. O cromatograma foi gerado no software UNICORN™ 6.4 (GE Healthcare®).

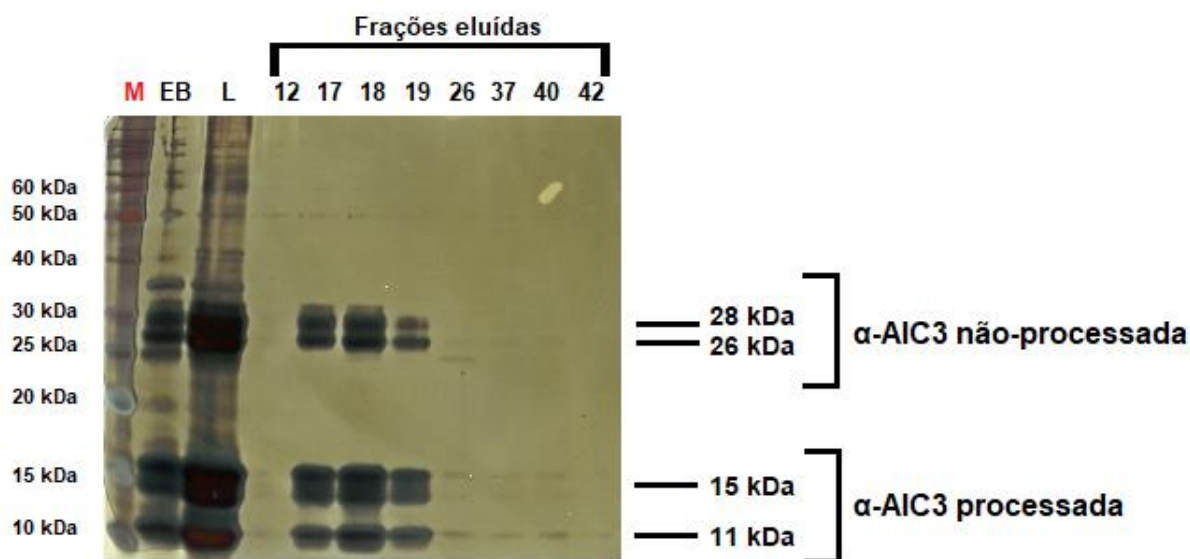


Figura 43. Análise e confirmação da purificação da proteína α -AIC3. SDS-PAGE a 15%, corado com nitrato de prata, para separação e caracterização das frações de eluição 12, 17, 18, 19, 26, 37, 40 e 42 da purificação de α -AIC3, evidenciando bandas de tamanho esperado e de alta intensidade para as frações 17, 18 e 19, cujo perfil foi o mesmo observado em Western blot. Bandas em alturas próximas, porém de baixa intensidade, também foram visualizadas nas outras frações. O experimento confirmou a efetivação da purificação da proteína de interesse. As amostras de extrato bruto (EB) e de uma fração de lavagem (L) apresentaram perfil semelhante.

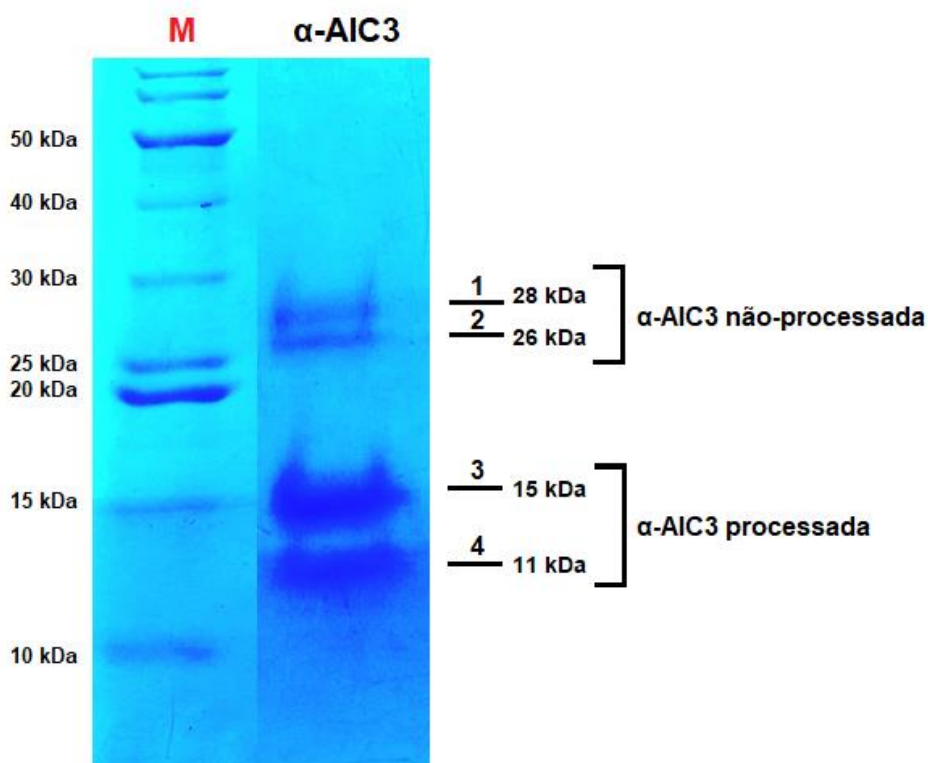


Figura 44. Gel de preparação para excisão de *spots* das bandas da proteína α -AIC3. Gel de tris-tricina a 16%, corado com Coomassie Brilliant Blue G-250, para separação das bandas de frações reunidas (17, 18, 19) contendo α -AIC3 purificada. A separação foi suficiente para permitir a excisão de *spots* respectivos para as bandas sem que houvesse contaminação cruzada.

A purificação da proteína IgG foi realizada via cromatografia de bioafinidade a partir do extrato de 12 dpi, uma vez que este apresentou o maior nível de expressão para a proteína de interesse, conforme os resultados obtidos no ELISA. Ao todo, 55 frações de eluição foram coletadas, das quais o cromatograma gerado (Figura 45) demonstrou um pico único, conforme o esperado, de 4 mAU de intensidade para as frações 25 a 27. Estas, ao serem reunidas e concentradas, foram visualizadas após eletroforese de proteínas (Figura 46). O gel, após corado, revelou uma banda de alto peso molecular e cujo perfil foi exatamente o mesmo observado no Western blot da Figura 38, confirmando a efetivação da purificação da proteína IgG na forma heterotetramérica.

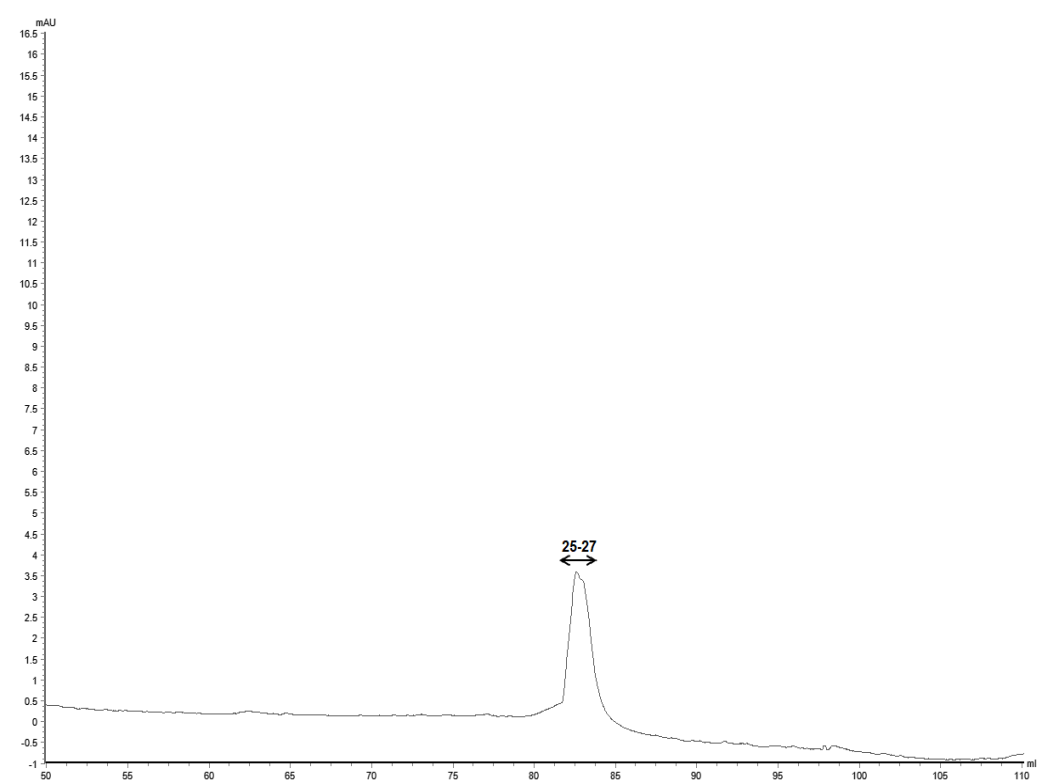


Figura 45. Cromatograma para a purificação da proteína IgG. O gráfico evidencia o pico único de eluição da cromatografia de bioafinidade para a amostra de 12 dpi contendo a IgG. Com um total de 55 frações de eluição, o pico de eluição teve intensidade de 4 mAU, e englobou as frações 25-27. O cromatograma foi gerado no software UNICORN™ 6.4 (GE Healthcare®).

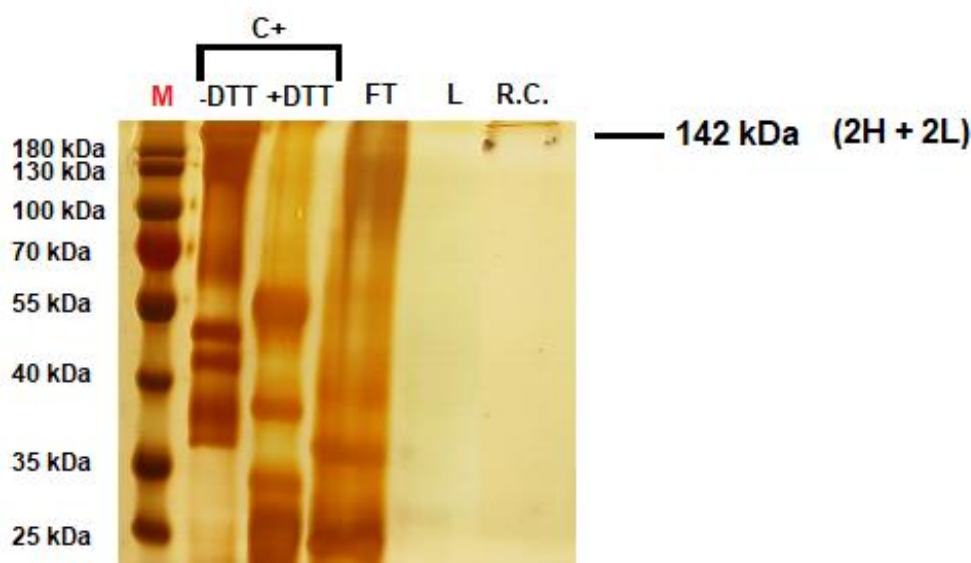


Figura 46. Análise e confirmação da purificação da proteína IgG. SDS-PAGE a 12%, corado com nitrato de prata, para separação e caracterização das frações de eluição 25, 26 e 27, reunidas e concentradas (R.C.), da purificação de IgG, evidenciando a mesma banda de alto peso molecular (142 kDa) previamente observada em Western blot. As amostras FT e L referem-se às frações de *flowthrough* e de lavagem, respectivamente. O experimento confirmou a efetivação da purificação da proteína de interesse.

5.7. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE α -AIC3

Com base no resultado observado na Figura 44, 4 bandas, ao todo, tiveram *spots* excisados para digestão *in gel* das amostras com tripsina, cujos produtos de hidrólise foram dessalinizados, concentrados e purificados antes de serem analisados por MS/MS MALDI-TOF. Os espectros dos peptídeos gerados foram adquiridos para todas as amostras, alguns dos quais corresponderam perfeitamente aos peptídeos trípticos teóricos esperados, gerados pela digestão *in silico* da cadeia polipeptídica de α -AIC3 (Apêndice C). Os peptídeos detectados foram selecionados para fragmentação, que permitiu o sequenciamento dos resíduos de aminoácidos componentes de cada íon parental. O sequenciamento de cada peptídeo está representado nas Figuras 47-52. Todos os espectros foram obtidos com intensidade de absorvância na ordem de 10^4 , o que é considerado significativo na validação para o sequenciamento manual.

Para a subunidade α , 1 dos 4 peptídeos trípticos possíveis (AFYSAPIQIR) foi detectado, sequenciado e confirmado quanto à identidade, o que correspondeu a uma cobertura de 10 dos 73 resíduos para esta subunidade, ou seja, 14%. Para a subunidade β , 5 dos 12 peptídeos trípticos possíveis (SVPWDVHDYDGQNAEVR,

VGFS AISGVHEYSFETR, GDTVTVEFD TFLSR, DVLSWSFSSK e ELDDWVR) foram identificados, correspondendo a uma cobertura de 65 dos 135 resíduos para esta subunidade, ou seja, 48%. Ao todo, 6 peptídeos foram confirmados, indicando uma cobertura de 75 dos 221 resíduos para a cadeia completa, ou seja, 34% de cobertura de sequenciamento (Figura 53).

O peptídeo referente à subunidade α foi detectado nas amostras das bandas 1, 2 e 4 (Figura 44), enquanto os peptídeos referentes às subunidades β foram detectados nas amostras das bandas 1, 2 e 3 (Figura 44). Este resultado corrobora com a hipótese de que as bandas 3 e 4 corresponderam às subunidades β e α , respectivamente, e que as bandas 1 e 2 corresponderam à cadeia polipeptídica completa e não-processada, uma vez que ambas contiveram seqüências de peptídeos para as duas subunidades.

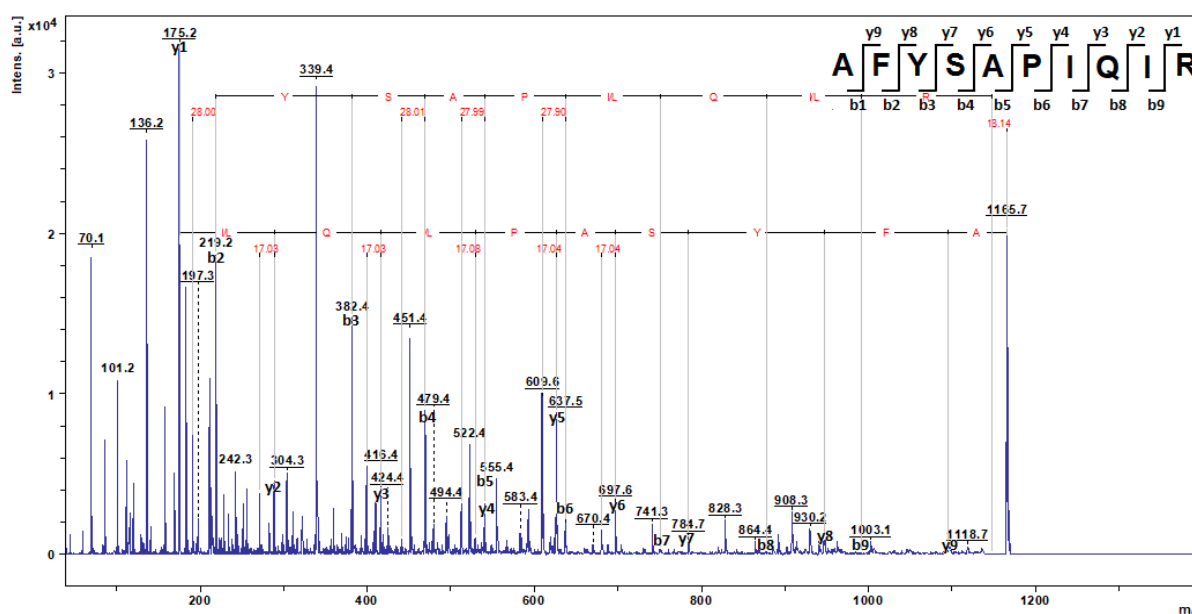


Figura 47. Espectros de fragmentação e sequenciamento do peptídeo 1 de α -AIC3 para a subunidade α . O gráfico mostra o sequenciamento, nas séries b/y, dos resíduos de aminoácidos do íon parental correspondente à subunidade α , $[M+H]^+ = 1165.7$ Da. Sequência peptídica predita: AFYSAPIQIR. Software utilizado: FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics®).

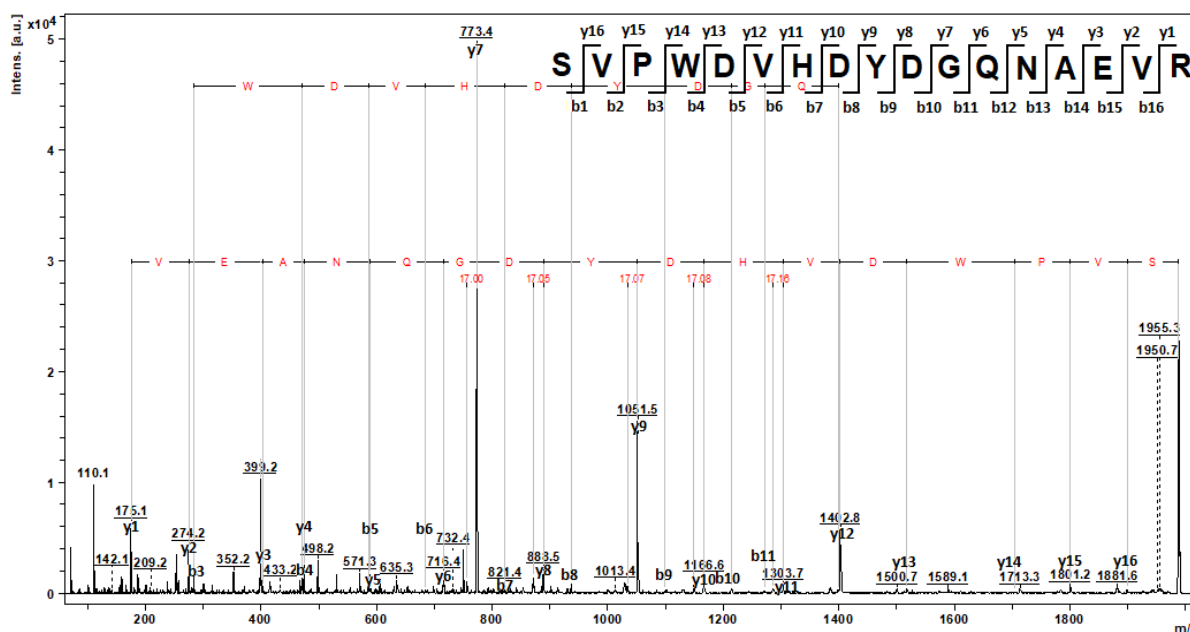


Figura 48. Espectros de fragmentação e sequenciamento do peptídeo 1 de α -AIC3 para a subunidade β . O gráfico mostra o sequenciamento, nas séries b/y, dos resíduos de aminoácidos do íon parental correspondente à subunidade β , $[M+H]^+ = 1986.7$ Da. Sequência peptídica predita: SVPWDVHDYDYGQNAEVR. Software utilizado: FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics®).

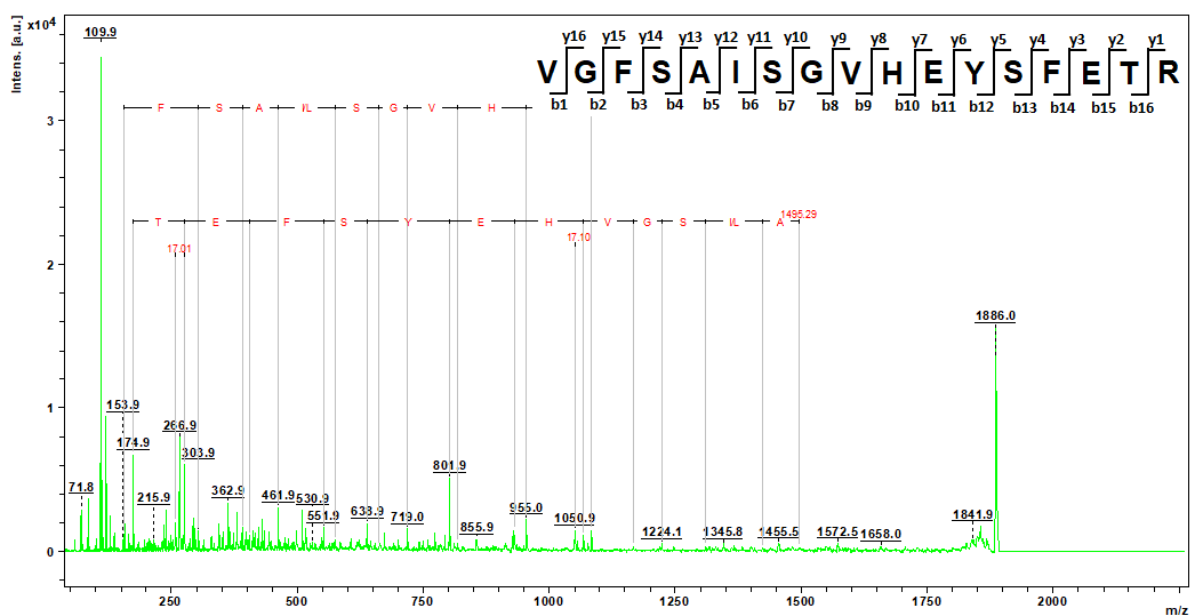


Figura 49. Espectros de fragmentação e sequenciamento do peptídeo 2 de α -AIC3 para a subunidade β . O gráfico mostra o sequenciamento, nas séries b/y, dos resíduos de aminoácidos do íon parental correspondente à subunidade β , $[M+H]^+ = 1886.0$ Da. Sequência peptídica predita: VGFS AISGVHEYSFETR. Software utilizado: FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics®).

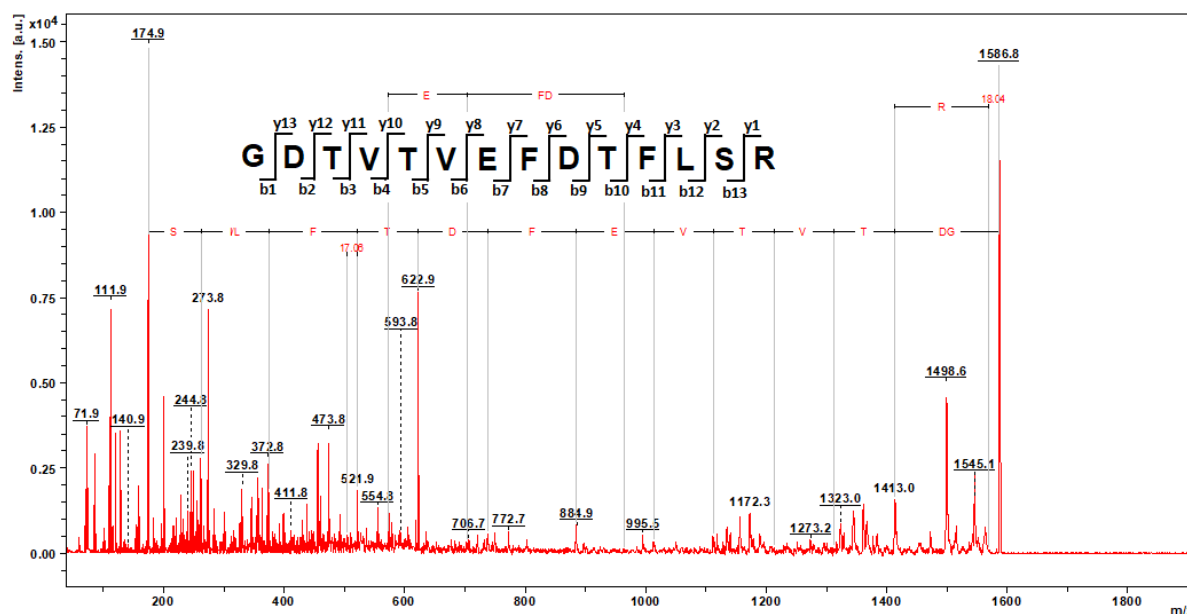


Figura 50. Espectros de fragmentação e sequenciamento do peptídeo 3 de α -AIC3 para a subunidade β . O gráfico mostra o sequenciamento, nas séries b/y, dos resíduos de aminoácidos do íon parental correspondente à subunidade β , $[M+H]^+ = 1586.8$ Da. Sequência peptídica predita: GDTVTVEFDTFLSR. Software utilizado: FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics®).

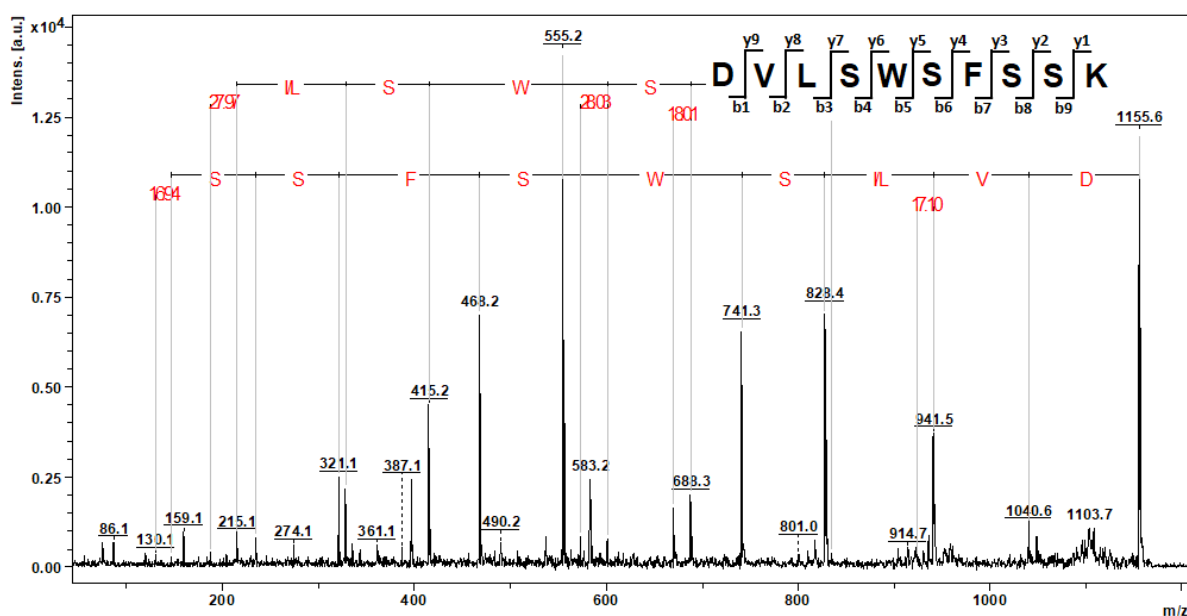


Figura 51. Espectros de fragmentação e sequenciamento do peptídeo 4 de α -AIC3 para a subunidade β . O gráfico mostra o sequenciamento, nas séries b/y, dos resíduos de aminoácidos do íon parental correspondente à subunidade β , $[M+H]^+ = 1155.6$ Da. Sequência peptídica predita: DVLSWSFSSK. Software utilizado: FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics®).

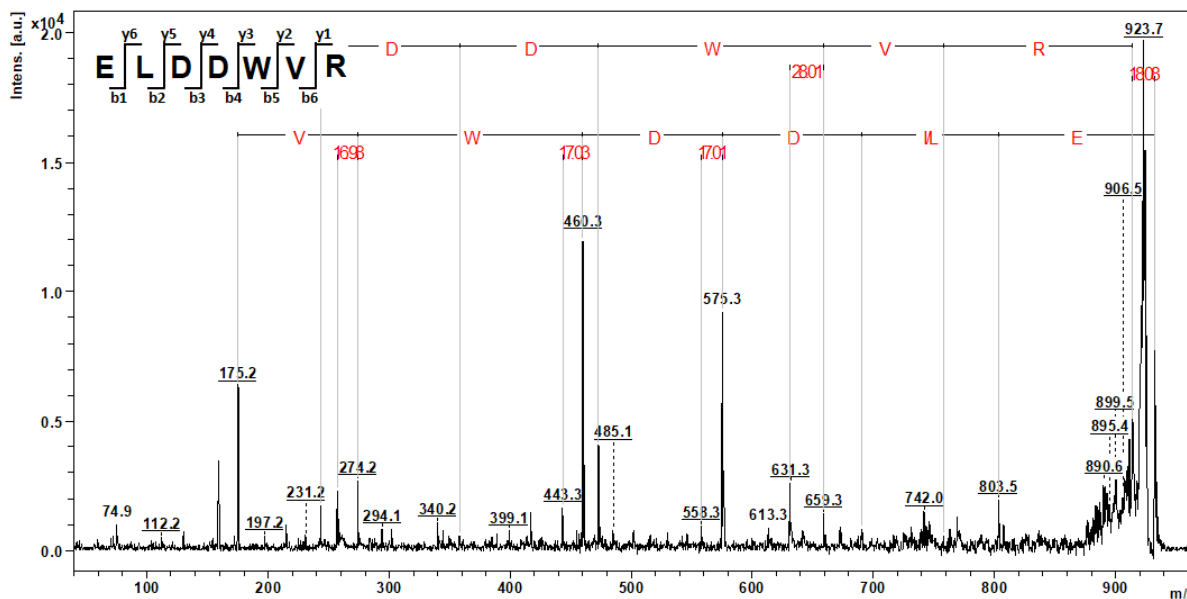


Figura 52. Espectros de fragmentação e sequenciamento do peptídeo 5 de α -AIC3 para a subunidade β . O gráfico mostra o sequenciamento, nas séries b/y, dos resíduos de aminoácidos do íon parental correspondente à subunidade β , $[M+H]^+ = 932.4$ Da. Sequência peptídica predita: ELDDWVR. Software utilizado: FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics®).

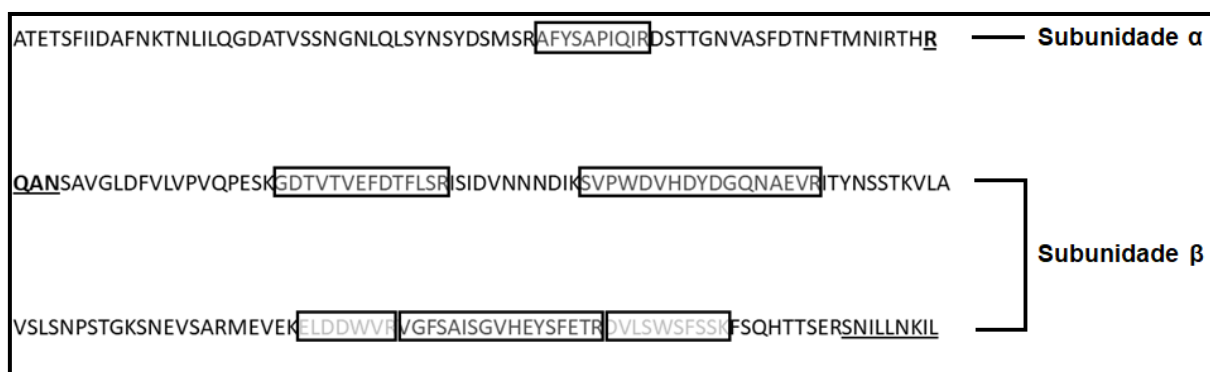


Figura 53. Cobertura de sequenciamento MS/MS MALDI-TOF para a proteína α -AIC3. Sequência completa dos resíduos de aminoácidos que compõem a proteína α -AIC3, destacando os peptídeos fragmentados e sequenciados e que apresentaram identidade à sequência nativa em MS/MS MALDI-TOF. Foram sequenciados 6 peptídeos, sendo 1 para a subunidade α e 5 para a subunidade β . As sequências sublinhadas são referentes aos resíduos clivados durante o processamento proteolítico, e, portanto, ausentes na proteína madura e ativa. A cobertura de sequenciamento para a proteína de interesse foi calculada em 34%, ou seja, 75 do total de 221 resíduos foram sequenciados.

5.8. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE α -AIC3

Baseando-se no método colorimétrico por ADNS, as amostras dialisadas de extrato de *N. benthamiana* e contendo a proteína α -AIC3 apresentaram uma média de 98,5% no nível de atividade inibitória contra a enzima AGA utilizando-se 1 U da α -amilase e 100 μ g de proteína solúvel. Este nível de inibição foi validado com sucesso, com base na média de inibição

obtida ao se utilizar a mesma quantidade de proteína de amostra de *A. thaliana* também contendo o mesmo inibidor, a qual inibiu completamente a atividade da enzima-alvo.

Adicionalmente, a mesma amostra de *N. benthamiana* foi utilizada de forma simultânea para checar o nível de atividade inibitória contra as enzimas AMA e SFA, porém não foi observada qualquer inibição de suas atividades enzimáticas. O gráfico que relaciona o nível de atividade inibitória de extratos contendo a proteína α -AIC3 para cada enzima encontra-se na Figura 54, abaixo.

Em síntese, os resultados de caracterização funcional da proteína de interesse apontaram que a proteína α -AIC3 exibiu a atividade esperada para a enzima AGA, demonstrando especificidade, a qual foi confirmada pela ausência de atividade inibitória contra enzimas-não alvo, o que reforça a biossegurança da molécula.

Atividade inibitória de α -AIC3: AGA, AMA, SFA

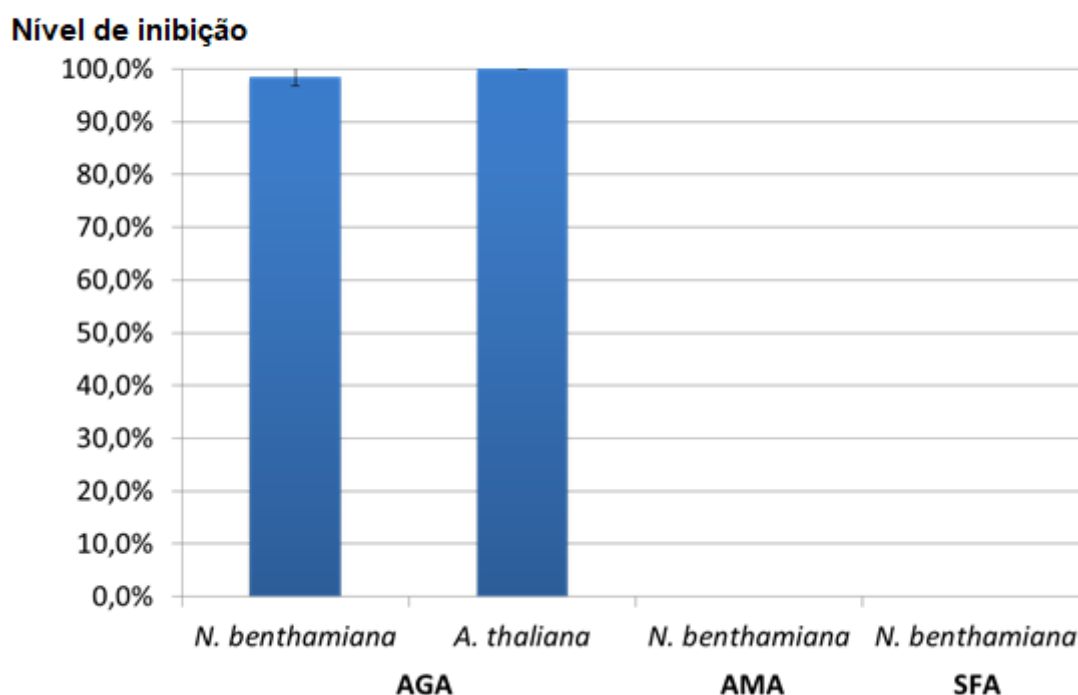


Figura 54. Nível de atividade inibitória da proteína α -AIC3 para enzimas-alvo e não alvo. O gráfico de colunas apresenta os níveis de inibição das α -amilases utilizando 100 μ g de extrato dialisado contendo proteína α -AIC3. O eixo y representa o nível de inibição. É possível observar que a enzima AGA foi inibida em até 100% da atividade amilásica por extrato obtido de *N. benthamiana*, validando-se o resultado com extrato obtido de *A. thaliana*. Por outro lado, não foi verificada qualquer atividade inibitória para as enzimas AMA e SFA. O desvio-padrão está representado por barras nas colunas. Os resultados obtidos são representados pela média da inibição de cada triplicata realizada.

5.9. ESTABELECIDAMENTO DO SISTEMA DE REPLICON VIRAL (RYMV)

Os resultados obtidos para a agroinfecção de *N. benthamiana* (Figura 55) foram validados qualitativamente pelo controle interno do experimento, o gene *housekeeping NbEIF1- α* . Isso porque os cDNAs gerados a partir dos três grupos de amostras de RNA (1, 2, 3, 1', 2', 3') e sintetizados em ambas as transcrições reversas geraram fragmentos amplificados por PCR. Neste caso, é possível observar que os cDNAs de cada grupo tiveram diferença de intensidade entre ambas as transcrições, o que corrobora com o fato de que a transcrição reversa para as amostras 1, 2 e 3 utilizaram 2 μ L de *primer* Oligo(dT)₁₅ e que a transcrição reversa para as amostras 1', 2' e 3' utilizaram 1 μ L de *primer* Oligo(dT)₁₅ e 1 μ L de *primer* GFP-*SpeI*. Uma vez que o gene *housekeeping* é encontrado apenas em amostras de RNAm contendo cauda Poli(A), apenas cDNAs sintetizados a partir do *primer* Oligo(dT)₁₅ geram amplicons para este gene.

No primeiro grupo (1, 2, 3), tem-se o dobro da concentração deste *primer* na reação de transcrição reversa em relação ao segundo grupo (1', 2', 3'), conseqüentemente com maior rendimento final de cDNAs para RNAm poliadenilado, o que é constatado pela maior intensidade das bandas para o primeiro grupo, tendo-se aproximadamente apenas a metade da intensidade das bandas no segundo grupo. As reações de controle negativo da transcrição reversa não geraram quaisquer bandas de amplificação dos cDNAs, validando-se a própria reação de transcrição.

Avaliando-se qualitativamente a amplificação viral com base no gene para GFP, observou-se a presença de bandas de amplificação de cDNAs em todas as amostras. Para analisar a ocorrência da amplificação viral, as amostras para cada vetor de expressão foram comparadas:

- (1) pCambia1300:GFP – este vetor é transcrito gerando apenas moléculas de RNAm poliadenilado para o gene *gfp*. Considerando-se que o *primer* GFP-*SpeI* também se anela no gene *gfp* existente em RNAm poliadenilado, é esperado que a transcrição reversa em ambos os grupos (1 e 1') gere quantidades indistintas de cDNA contendo o gene *gfp*, gerando também amplicons de intensidade sem diferença significativa, o que corroborou com a intensidade de bandas vistas para este par de amostras.
- (2) pCambia1300: $\Delta\Delta$ RYMV-GFP – este vetor é transcrito gerando moléculas de RNAm poliadenilado e não-polideadenilado para o gene *gfp*, uma vez que o

genoma viral de RYMV é transcrito sem que ocorra a incorporação de cauda Poli(A), o que informa sobre a ocorrência de replicação viral na célula hospedeira com uma transcrição adicional e independente do genoma nuclear. Dessa forma, é esperado que a transcrição reversa em ambos os grupos seja minimamente igual quando não houver replicação viral, conforme o padrão observado no caso (1). Entretanto, a diferença de sinal em ambos os grupos (2 e 2') evidenciou maior intensidade para 2', sugerindo que, além da transcrição ocorrida conforme o ocorrido para pCambia1300:GFP, a replicação viral adicional gera quantidades também adicionais de RNAm passíveis de amplificação com par de *primers* específicos para *gfp* a partir do cDNA correspondente reversamente transcrito. Este resultado indica, portanto, de forma qualitativa, a ocorrência de replicação do vírus RYMV em células da folha de *N. benthamiana*.

- (3) pCambia1300:ΔΔRYMV-TEV-GFP – este vetor é transcrito gerando moléculas de RNAm poliadenilado e não-poliadenilado para o gene *gfp*. Trata-se do mesmo caso observado em (2) e, embora a diferença de sinal tenha sido um pouco menor, qualitativamente observou-se uma intensidade levemente maior para 3' em relação a 3, também indicando a ocorrência de replicação do vírus RYMV.

Os resultados indicaram, portanto, que a ocorrência de replicação do genoma viral na planta hospedeira teoricamente leva à produção de vírions que viabilizam *N. benthamiana* como hospedeiro intermediário para infecção secundária de outras espécies, como as monocotiledôneas, via inoculação de seiva (*sap inoculation*).

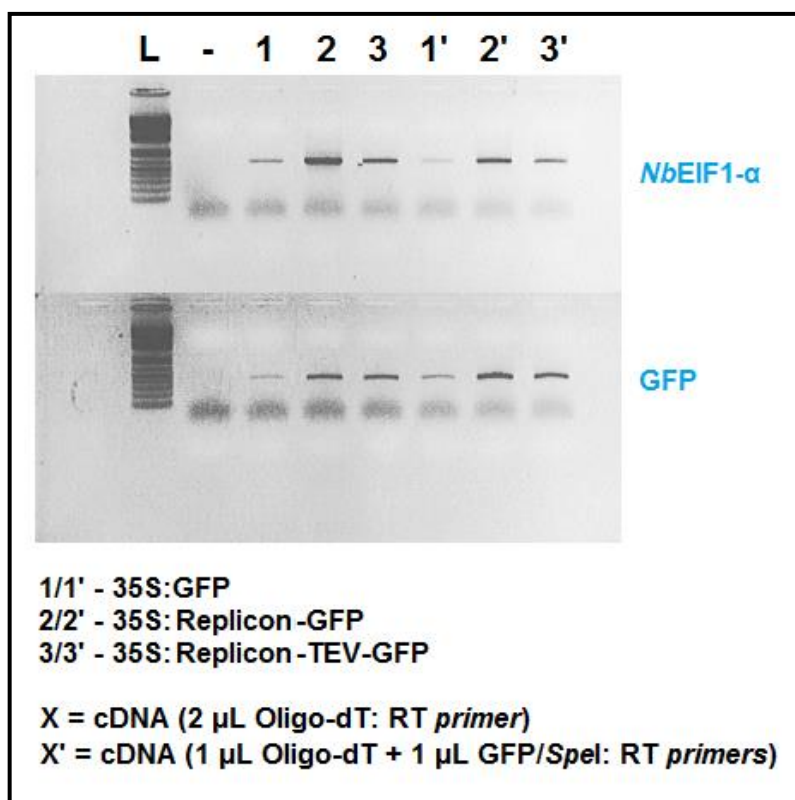


Figura 55. Replicação do vírus RYMV em *N. benthamiana*. Gel de eletroforese em agarose a 1% para verificação da amplificação de cDNA para o gene *housekeeping* de *NbEIF1- α* (controle interno), com amplicon de 732 pb, e para o gene de GFP, com amplicon de 654 pb, utilizando pares de *primers* específicos. Os respectivos cDNAs foram gerados por transcrição reversa utilizando *primers* gerais para RNAm e/ou *primers* específicos para sequências desejadas na amplificação viral. Os controles negativos de transcrição reversa (-) não geraram amplicons para cDNA. Utilizou-se o marcador de peso molecular Ladder 1 kb Plus, cujas bandas são evidenciadas na primeira coluna.

6. DISCUSSÃO

Os resultados referentes à produção e caracterização da molécula α -AIC3 sugerem que sistemas de expressão transiente baseados em *N. benthamiana* podem ser adequados para a produção de variantes de α -AIs de forma rápida, fácil e eficiente quando obtidas a partir de estratégias de evolução molecular para *screening* funcional preliminar e para estudos de biossegurança das variantes. A molécula caracterizada neste trabalho foi identificada e selecionada a partir de uma biblioteca constituída por mais de 8.000 variantes (SILVA et al., 2013). Com isso, este sistema permite a investigação de bibliotecas para a identificação de variantes apresentando funcionalidade nova ou melhorada para o controle de insetos-praga.

Embora a literatura relate poucos exemplos de proteínas de interesse agrônômico produzidas nestes sistemas de expressão heteróloga, a proteína Rx de resistência ao *Potato virus X* (PVX), codificada por um gene existente em batata (*Solanum tuberosum*), recebe grande destaque. Com isso, Farham & Baulcombe (2006) desenvolveram uma biblioteca de variantes para esta proteína, através de mutagênese randômica, a partir do gene correspondente, utilizando *N. tabacum* como sistema de expressão transiente para o *screening* de 1.920 variantes moleculares, das quais 13 apresentaram atividade biológica significativa na ligação à proteína CP de PVX. Em outro trabalho com o mesmo gene, Harris et al. (2013) realizaram o *screening* de uma biblioteca composta por 1.500 mutantes proteicos em *N. benthamiana*, também via expressão transiente, com 4 variantes sendo identificadas como promissoras por induzirem à resistência ao *Poplar mosaic virus* (PopMV). Ambos os estudos, portanto, corroboraram com o presente trabalho realizado com α -AIC3 em relação à utilidade e eficácia do sistema de expressão transiente baseada em *Nicotiana* spp. para a identificação e seleção de variantes de proteínas de resistência a estresses bióticos partindo-se de uma ampla biblioteca de mutantes.

Além disso, o uso desse sistema pode ser estendido a proteínas bioinseticidas também utilizadas comumente em engenharia genética para produzir plantas transgênicas resistentes a insetos-praga, como as toxinas Cry e inibidores de proteinase (LOMBARDO et al., 2016), a exemplo das bibliotecas de variantes mutantes desenvolvidas por Ceci et al. (2003) e Craveiro et al. (2010), respectivamente.

Considerando-se que o objetivo final do desenvolvimento destas variantes consiste na expressão destas em plantas transformadas para obter eventos transgênicos resistentes a insetos-praga, o sistema de expressão desenvolvido neste trabalho torna-se uma alternativa

para caracterizar funcionalmente um rol de variantes de forma a antever a atividade biológica destas quando forem produzidas pela planta-alvo das pragas, em comparação com os resultados de ensaios *in vitro* e *in vivo*. Os ensaios *in vivo* são, portanto, uma etapa complementar de análises que permitem a checagem dos efeitos sistêmicos das moléculas desenvolvidas, dando maior confiabilidade de que as plantas transgênicas expressando estas moléculas desencadearão efeitos similares que reflitam os resultados anteriormente observados. A vantagem desta abordagem reside, portanto, na implantação de uma etapa intermediária de filtragem para a seleção de mutantes promissores, uma vez que regenerar diretamente plantas transformadas para só então caracterizá-las aumenta a complexidade e o tempo de desenvolvimento destes produtos, se tornando uma abordagem menos prática.

Adicionalmente, deve-se considerar que o melhoramento genético de plantas via engenharia genética tem sido impulsionado significativamente com o advento da Biologia Sintética e suas ferramentas de edição genômica, que permitem a introdução de modificações genéticas de forma precisa a partir da engenharia de genoma (DING et al., 2016; QUÉTIER, 2016). No que se refere às características de importância agrícola, diversas espécies de grande impacto na Agricultura brasileira, como o algodão (*G. hirsutum*), têm sido modificadas por meio desta tecnologia (LIU et al., 2017; WANG et al., 2017). Para a aquisição de tolerância a herbicidas, por exemplo, esta tecnologia já foi utilizada para editar o genoma de soja (*Glycine max*) (LI et al., 2015), arroz (*Oryza sativa*) (SUN et al., 2016) e milho (*Zea mays*) (SVITASHEV et al., 2015).

Em relação à aquisição de tolerância a estresses bióticos, a engenharia de genoma já foi aplicada, por exemplo, ao tomate (*Solanum lycopersicum*) (NEKRASOV et al., 2017) e ao pepino (*Cucumis sativus*) (CHANDRASEKARAN et al., 2016) para desenvolvimento de resistência a fungos e vírus, respectivamente. Este cenário, portanto, permite gerar perspectivas para a aplicação desta tecnologia a diversas cultivares após o *screening* de variantes mutantes de moléculas bioinseticidas e, mais especificamente com base no exemplo deste trabalho, à produção de algodoeiro com genoma editado e expressando α -AIC3 ou outras variantes moleculares a serem desenvolvidas visando à resistência a *A. grandis*.

Quanto aos experimentos referentes à α -AIC3, foi possível inferir fenotipicamente, que a expressão heteróloga havia possivelmente ocorrido nas folhas infiltradas. Os halos de infiltração, derivados de uma reação de clorose no limbo foliar, por sua vez, possivelmente surgem devido à presença dos supressores virais P0, P1Tz3 e P19 nas células transformadas, o

que corroboraria com estudos que indicaram que outras proteínas virais supressoras de PTGS, como P22 (CAÑIZARES et al., 2008) e P23 (KUBOTA; NG, 2016), levam à ativação de reações locais de hipersensibilidade que resultam em um fenótipo de clorose e subsequente necrose das folhas. Uma hipótese para a ocorrência de clorose é a de que, de forma semelhante, as proteínas virais utilizadas neste trabalho, ao bloquearem as vias de PTGS, bloqueiam de forma geral a ação de dsRNAs vegetativos, dos quais alguns estão envolvidos na regulação da expressão de proteínas relacionadas à fotossíntese. Por fim, uma vez que a reação de clorose é indicativa da região onde ocorre a intensificação da maquinaria de expressão gênica, é esperado que nestas regiões seja também encontrada a proteína de interesse, já que as mesmas células expressando os genes para proteínas virais também devem estar transformadas com o gene de interesse inserido simultaneamente após a agroinfiltração.

Referente à detecção da proteína α -AIC3, observou-se que foram produzidas frações da proteína na forma processada e na forma não-processada, ou seja, apenas uma parcela – aproximadamente metade, conforme o nível de intensidade de bandas – do total da proteína de interesse sofreu processamento proteolítico. Uma hipótese para a explicação desse fenômeno é baseada na saturação da maquinaria molecular envolvida na produção da forma madura da proteína, ou seja, de suas subunidades. Isso porque, com o uso de uma combinação de 3 supressores virais de PTGS, é esperado que o nível da síntese proteica para α -AIC3 seja alto. E, uma vez que a proteína de interesse é expressa em grande quantidade, é necessário que os componentes celulares das folhas infiltradas tenham desempenho compatível com a demanda de processamento da proteína. Porém em condições de saturação de quaisquer maquinarias, como de endereçamento subcelular, de enovelamento proteico e de clivagem proteolítica, as proteínas envolvidas nestes processos não acompanharão a velocidade e/ou a carga da expressão heteróloga.

No caso de saturação do endereçamento subcelular, a carga de proteínas de tráfego intracelular pode ser insuficiente, e assim a proteína de interesse pode se acumular em compartimentos anteriores ao vacúolo central na via secretória, como o RER, e nos quais não há maquinaria de processamento proteolítico específico para α -AIC3; no caso da saturação da maquinaria de enovelamento proteico, a proteína pode não atingir a estrutura conformacional necessária para reconhecimento pelas enzimas proteolíticas, impedindo a formação de subunidades; no caso da saturação da maquinaria de proteólise vacuolar, a carga de enzimas hidrolíticas pode não ser suficiente para atingir-se a velocidade exigida para o completo processamento da α -AIC3. Logicamente, a saturação de uma maquinaria não exclui a

possibilidade da saturação de outra, e, dessa forma, é possível que a ausência de processamento completo se deva, ainda, a uma saturação múltipla em etapas distintas.

Esta hipótese é reforçada por outros relatos na literatura sobre a ocorrência de saturação destas maquinarias moleculares quando há superexpressão de proteínas heterólogas. Inan et al. (2007), objetivando a produção de uma vacina humana contra o nematoide *Necator americanus*, expressaram um antígeno secretório (Na-ASP1) em *P. pastoris*, e observaram que a superexpressão do antígeno por meio do aumento do número de cópias do gene correspondente ocasionou a limitação da quantidade de proteína secretada devido à saturação da maquinaria de endereçamento subcelular para secreção.

Parekh et al. (1995) realizaram a superexpressão de um inibidor de tripsina pancreática bovina em *S. cerevisiae*, também com múltiplas cópias gênicas, observando resultados similares, com acúmulo progressivo da proteína no meio intracelular concomitante ao aumento do número de cópias e da taxa de síntese proteica heteróloga, atribuindo este fenômeno à saturação de chaperonas e foldases disponíveis para o enovelamento da proteína de interesse, que na forma não-enovelada permaneceu intracelular. O mesmo fenômeno foi observado com proteínas recombinantes em plantas como *N. benthamiana* (THOMAS; WALMSLEY, 2015), relatando-se que a superexpressão de proteínas recombinantes endereçadas ao RER pode ativar mecanismos de resposta a proteínas não-enoveladas, como ocorre na saturação de chaperonas, sugerindo que esses mecanismos moleculares são universais e independentes do tipo de sistema de expressão utilizado.

Em relação aos ensaios de inibição enzimática, foi possível atingir até 100% de inibição de AGA a partir de extratos de *N. benthamiana* contendo a proteína α -AIC3, obtendo-se o mesmo resultado a partir de extratos de *A. thaliana*. Entretanto, Silva et al. (2013) haviam demonstrado atividade inibitória de apenas 77% partindo-se de 85 μ g de proteína solúvel das folhas de *A. thaliana*, cujo nível de expressão foi de apenas 0,2% TSP, o que significa que aproximadamente 170 ng de α -AIC3 são necessários para inibir 77% da atividade de AGA. Porém neste trabalho a quantidade de α -AIC3 expressa em sementes *A. thaliana* necessária para inibir 100% da atividade pode ser estimada em 200 ng, o que é logicamente aceitável se considerarmos o mesmo nível de expressão, já que um leve aumento na massa da proteína inibitória, de 170 ng para 200 ng, poderia ter levado ao aumento da atividade inibitória de 77% para 100%.

Por outro lado, neste trabalho haveria um viés científico ao se comparar estes resultados em *A. thaliana* com os resultados em *N. benthamiana*, pois, neste caso, partindo-se de 100 µg de proteína total com 44% TSP de α -AIC3, a inibição de 100% da atividade de AGA se daria com 44 µg da proteína inibitória expressa em *N. benthamiana*, o que constitui um valor muito maior que o exigido para a mesma proteína expressa em *A. thaliana*. Portanto, para isso deve-se considerar a possibilidade de saturação enzimática com a alta carga de proteína heteróloga e, neste caso, o uso de 44 µg de α -AIC3 já faria ultrapassar o limiar de inibição da enzima, a qual poderia ser inibida com uma carga inibitória ainda menor. Dessa forma, para se estabelecer a quantidade de α -AIC3 necessária para determinar o limite entre o ponto de saturação enzimática e o gradiente de inibição seria necessário repetir os ensaios de inibição *in vitro* utilizando um gradiente de quantidades menores de α -AIC3, o que demandaria mais material biológico para esta elucidação.

Além disso, não seria recomendável se basear no valor de 44 µg, uma vez que, como já foi discutido, uma parcela significativa deste total é constituída por proteína não-processada e, portanto, inativa (PUEYO et al., 1993), não participando efetivamente da inibição enzimática e não contribuindo para esta relação entre carga heteróloga e nível inibitório. Além disso, a inviabilidade desta comparação é reforçada pelo fato de que Silva et al. (2013) não detectaram frações de proteína não-processada nos extratos – possivelmente devido ao nível de expressão, que não saturaria as maquinarias moleculares conforme já hipotetizado –, o que maximiza a quantidade útil de α -AIC3 para se efetivar a inibição, já que o total da proteína de interesse corresponde inteiramente à forma biologicamente ativa da molécula.

Independentemente destas questões, o sistema de expressão transiente estabelecido para α -AIC3 ainda permanece adequado por eliminar a necessidade de regeneração direta de plantas, conforme mencionado anteriormente. Dias et al. (2010), por exemplo, utilizaram *N. tabacum* para expressar o inibidor α BIII de *Secale cereale*, ativo contra AGA, porém via expressão estável. Os extratos das plantas regeneradas atingiram, no máximo, 41% de atividade inibitória com uma quantidade relativamente grande de massa de extrato bruto (250 mg), embora os níveis de expressão (de 0,1 a 0,29% TSP) tenham sido próximos aos obtidos por Silva et al. (2013) com *A. thaliana*. O *screening* deste inibidor poderia, no entanto, ter se conduzido de forma menos trabalhosa e em menor tempo utilizando um sistema transiente.

Por sua vez, os resultados referentes à expressão da molécula IgG inferem quanto à adequação do sistema para a produção de anticorpos recombinantes anti-TNF- α .

Diferentemente do uso de sistemas de expressão transiente baseados em *N. benthamiana* utilizados para produzir moléculas de interesse agrônômico, a literatura relatando o uso de sistemas semelhantes para produzir moléculas de interesse farmacêutico é vasta (GIRITCH et al., 2006; HUANG et al., 2009; LOMBARDI et al., 2009; SAINSBURY et al., 2010; KANAGARAJAN et al., 2012; NAUSCH et al., 2012; SOUZA et al., 2013).

Quanto aos experimentos referentes à IgG, foi possível, na Figura 38, observar a presença de bandas diferenciais próximas à altura esperada para a cadeia pesada, tanto para amostras de 6 dpi quanto de 12 dpi em condições não-redutoras. Essa diferença em relação ao controle negativo (pBin61) pode, por exemplo, se dever ao fato de que as cadeias da IgG, embora tenham seus genes correspondentes localizados em um vetor de expressão único, têm suas expressões dirigidas por promotores de cassetes diferentes e adjacentes, apesar de serem o mesmo promotor (P35S). Uma vez que os cassetes são independentes entre si, a expressão gênica também se torna independente, podendo gerar um desbalanço na proporção entre as cadeias polipeptídicas que compõem o anticorpo, o qual pode ser agravado pela competição entre fatores de transcrição pelo mesmo promotor (KUNES et al., 2009). O desbalanço proporcional já havia sido observado por Giritch et al. (2006), que constataram não apenas monômeros excedentes como também homo e heterodímeros e trímeros de IgG.

Sendo assim, outras estratégias no delineamento de cassetes e vetores de expressão podem ser adotadas para contornar o desbalanço e, assim, maximizar a produção da forma tetramérica da molécula, como o uso de blocos proteicos intermediários para a produção de proteínas com estrutura quaternária, que passam a ser expressas como uma única proteína de fusão via ORF única. Para isso, Luke et al. (2015) e Gion et al. (2013) apontam o uso do peptídeo 2A de domínios proteicos do vírus da febre aftosa, bem como as inteínas de arqueobactérias, respectivamente, como candidatos adequados para promover a produção de subunidades proteicas na proporção de 1:1 por meio de um mecanismo de *splicing* proteico mediado pela autoclivagem destes blocos, que faz com que as cadeias polipeptídicas sejam liberadas separadamente da proteína de fusão.

Em relação aos níveis de expressão obtidos para a IgG, foi possível notar que, comparativamente a outros relatos na literatura também utilizando expressão transiente em *N. benthamiana*, o infliximabe foi expresso com rendimento maior que o de outras proteínas biofarmacêuticas. O rendimento de 11% TSP ou 60 mg/kg de folha obtido para a amostra de 12 dpi foi maior que o obtido por Lombardi et al. (2009) para o antígeno de HIV-1 Nef, de

apenas 1,3% TSP, com base em agroinfiltração utilizando supressores virais de PTGS. Para a interleucina-6, Nausch et al. (2012) obtiveram um rendimento máximo de 7% TSP, mesmo utilizando o sistema de agroinfeção magnICON®.

Por outro lado, o rendimento do infliximabe não superou o obtido para as seguintes moléculas, por exemplo: o anticorpo recombinante anti-HIV 2G12 (SAINSBURY et al., 2010), com rendimento de 100 mg/kg de folha; o antígeno do vírus da hepatite B e a proteína CP do vírus Norwalk (HUANG et al., 2009), com rendimentos de 800 e 340 mg/kg de folha, respectivamente; o anticorpo humano A5 (GIRITCH et al., 2006) e o anticorpo murino 6D8 (HUANG et al., 2010), ambos com rendimento de 500 mg/kg de folha. Entretanto, todas estas moléculas foram expressas em *N. benthamiana* com base em sistemas de replicon viral, cujos níveis de expressão esperados são muito maiores, o que reforça a importância do desenvolvimento de um novo sistema para a expressão do infliximabe, otimizando-se o rendimento desta molécula.

Westerhof et al. (2014), por sua vez, relataram, pela primeira vez, a expressão do infliximabe em plantas, também utilizando expressão transiente em *N. benthamiana*. Porém os autores produziram a molécula não visando à produção de um biossimilar com viabilidade industrial e comercial, mas para análises comparativas de eficiência de expressão, análise funcional e padrão de N-glicosilação com a forma IgA do mesmo princípio ativo. Ainda assim, a forma IgG do infliximabe atingiu nível máximo de expressão de 8,2% TSP, com 6 dpi, embora a proteína P19 de *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) tenha sido coexpressa como supressor de PTGS.

Finalmente, quanto ao estabelecimento do novo sistema de replicon viral baseado em RYMV, a análise comparativa das intensidades de bandas para RNA viral amplificado evidenciou o sucesso da replicação viral nas células da planta, mesmo se utilizando um vírus com tropismo para *O. sativa*. Sendo assim, pode-se concluir que *N. benthamiana* pode ser utilizada como hospedeiro intermediário para infecção secundária de monocotiledôneas como arroz e milho para expressão de proteínas heterólogas. Este sistema, uma vez estabelecido e otimizado, poderá ser acoplado às aplicações anteriormente discutidas, de forma a maximizar a produção das proteínas candidatas, contornando os obstáculos inerentes aos sistemas mais tradicionais e observados ao longo deste trabalho.

Considerando-se que o novo sistema de replicon é baseado em um único vetor viral, tem-se que o RYMV pode ser utilizado para a produção de proteínas – monoméricas ou não –

derivadas de uma única cadeia polipeptídica ou ainda proteínas hetero-oligoméricas com cadeias polipeptídicas distintas, uma vez que o genoma desconstruído permite uma carga heteróloga maior. Neste último caso, Lico et al. (2008) relataram que comumente são utilizados vetores virais duplos, independentes e não-competitivos, a exemplo dos vetores TMV e PVX, que são capazes de interagir com diferentes proteínas do hospedeiro que permitem sua replicação, de forma que tanto a sua replicação quanto o seu movimento célula-célula não interfira nos mecanismos do outro e permita a coexpressão de oligômeros.

Por outro lado, a utilidade do RYMV como vetor viral único neste caso pode ser sustentada pela adaptação do vetor viral desenvolvido por Huang et al. (2010), reforçando ser possível coexpressar oligômeros de IgG, por exemplo, a partir de um vetor único contendo cassetes de expressão referentes às diferentes cadeias de imunoglobulina, e a altos níveis.

7. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível estabelecer, com sucesso, estratégias de expressão transiente para a produção de duas moléculas, uma de interesse agrônômico, a proteína α -AIC3, e uma de interesse farmacêutico, o infliximabe recombinante. Concluiu-se que ambas foram expressas e comprovadamente purificadas de acordo com a estrutura necessária para desempenhar sua atividade biológica, constatando-se a eficácia dos vetores de expressão utilizados nos experimentos de agroinfiltração e dos próprios métodos de extração e purificação selecionados como processos de *downstream*. Com isso, o sistema heterólogo de expressão provou-se ser versátil e acurado o suficiente para realizar as modificações pós-traducionais ocorrentes nas moléculas nativas e determinantes da sua funcionalidade. O uso de uma combinação de supressores virais de silenciamento gênico como coadjuvantes de expressão também provou ser eficaz para se atingirem níveis de expressão significativos para moléculas de diferentes naturezas e aplicabilidades, tornando estas estratégias de expressão transiente ferramentas rápidas e robustas, embora igualmente simples aos métodos tradicionais de expressão transiente.

Foi possível, portanto, não apenas constatar a identidade esperada da proteína α -AIC3 como também produzi-la a um nível significativamente alto, com rendimento próximo ao obtido para outras moléculas utilizando-se vetores virais como ferramentas moleculares de expressão transiente. Esta proteína de interesse, embora tenha sido obtida nas formas não-processada e processada, rendeu quantidades suficientes de suas subunidades funcionalmente ativas, sendo capazes de inibir a atividade enzimática da α -amilase do bicudo-do-algodoeiro sem inibir α -amilases de insetos-não alvo, constituindo, portanto, uma alternativa biológica e ambientalmente segura para o controle do inseto-praga, dada a especificidade do inibidor. Adicionalmente, este trabalho descreveu, pela primeira vez, a utilização de um sistema de expressão transiente baseado em *N. benthamiana* para a produção de inibidores de α -amilase.

De forma similar, a proteína IgG foi produzida e purificada em sua conformação heterotetramérica e, portanto, compatível com o desempenho esperado da atividade biológica para imunoglobulina neutralizante de antígeno, concluindo-se que houve sucesso no processamento e na montagem da molécula nas organelas da planta. Esta proteína de interesse também apresentou rendimento consistente ao de uma expressão transiente, considerando-se que não foi realizado o enriquecimento da proteína de interesse. Com isso, trata-se de um trabalho que descreveu, também pela primeira vez, a utilização de um sistema vegetal de

expressão heteróloga para a produção do anticorpo recombinante infliximabe visando à aplicação industrial e ao mercado farmacêutico com base na forma não-imunogênica e biologicamente segura da molécula.

Por fim, foi possível estabelecer um sistema de replicon viral com base no genoma desconstruído de RYMV, tendo *N. benthamiana* como hospedeiro intermediário para monocotiledôneas. A replicação viral na planta permite que se realize uma infecção secundária em espécies recalcitrantes à agroinfiltração, utilizando os vírions produzidos no hospedeiro intermediário, o que é promissor para a otimização de uma nova estratégia biotecnológica para expressão transiente em plantas.

8. PERSPECTIVAS

- Avançar com os testes de biossegurança da proteína α -AIC3 via realização de ensaios *in vivo*, de forma que estes reflitam os resultados observados *in vitro* e que gerem a expectativa de reprodução dos mesmos resultados quando expressa na planta hospedeira e alvo do inseto-praga. Dessa forma, a molécula poderá ser incorporada em programas de melhoramento, desenvolvendo-se plantas geneticamente modificadas de algodoeiro que expressem α -AIC3 e que apresentem, portanto, níveis consideráveis e persistentes de resistência ao bicudo-do-algodoeiro ao longo das gerações subsequentes;
- Otimizar o processo de produção e intensificar o nível de expressão do infliximabe recombinante para que este possa ser caracterizado estruturalmente por espectrometria de massas, sendo sequenciado para confirmação da identidade à sequência primária de referência, bem como realizada a glicoanálise para confirmar a efetividade do peptídeo-sinal de retenção e para a verificação do perfil de N-glicanos ou variantes de N-glicosilação, os quais predirão sobre a imunogenicidade, alergenicidade e, portanto, biossegurança da molécula quando administrada em mamíferos; e caracterizá-lo funcionalmente, verificando-se *in vitro* a estabilidade da ligação antígeno-anticorpo e as constantes de associação/dissociação, que predirão sobre a capacidade neutralizante da molécula para que, só então, possam ser realizados ensaios *in vivo*;
- Complementar a análise do anticorpo recombinante com a avaliação de parâmetros farmacocinéticos da molécula, como tempo de meia-vida e biodisponibilidade;
- Uma vez confirmada a funcionalidade e biosemelhança da IgG ao biofármaco infliximabe, estimar o custo de produção e viabilidade comercial em relação à capacidade de escalonamento para níveis industriais;
- Estabelecer o sistema de agroinfecção em monocotiledôneas como arroz (*O. sativa*) ou milho (*Z. mays*), utilizando *N. benthamiana* como hospedeiro intermediário de RYMV a partir de inoculação por seiva contendo vírions, de forma a maximizar o nível da expressão transiente em relação ao tempo de produção da proteína de interesse. Para isso, é possível testar a infectividade da seiva de *N. benthamiana* em plantas de arroz ou milho com 3 semanas de idade, por exemplo, também substituindo-se o promotor do replicon por outro mais compatível com a transcrição em monocotiledôneas, como os promotores Ubi ou Act, intensificando-se o nível de amplificação viral;

- Uma vez estabelecida a melhor forma de promover a amplificação viral nas plantas hospedeiras, verificar a aplicabilidade da estratégia de recuperação de proteínas com base na clivagem por proteinase da fusão entre a proteína de interesse e a proteína do capsídeo viral, por meio do sítio de clivagem TEV, o que evitará a adoção de técnicas mais complexas de purificação de proteínas;
- Concluída a otimização do sistema de expressão, estender sua aplicação à produção de outras moléculas para diferentes finalidades, o que inclui, além das áreas abrangidas neste trabalho, moléculas de interesse ambiental e úteis para a produção de biocombustíveis. Também será possível utilizar o sistema para o *screening* e caracterização de um grande número de proteínas direcionadas contra estresses bióticos, não apenas inibidores de α -amilases, mas moléculas em geral, produzidas ou não de forma artificial por *DNA shuffling* e selecionadas por *phage display*.

REFERÊNCIAS

- Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pillai, S. Anticorpos e antígenos. In: Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pillai, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. pp. 89-108.
- ABRAPA – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE ALGODÃO. **Algodão no Brasil e no mundo**. 2017. Disponível em: <
<http://www.abrapa.com.br/Paginas/dados/ranking.aspx>>. Acesso em: 21 jan. 2018.
- Aebi, M. N-linked protein glycosylation in the ER. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1833, pp. 2430-2437, 2013.
- Ahmad, P., Ashraf, M., Younis, M., Hu, X., Kumar, A., Akram, N. A., Al-Qurainy, F. Role of transgenic plants in agriculture and biopharming. **Biotechnology Advances**. v. 30, n. 3, pp. 524-540, 2012.
- Altabella, T., Chrispeels, M. J. Tobacco plants transformed with the bean α -AI gene express an inhibitor of insect α -amylase in their seeds. **Plant Physiology**. v. 93, n. 2, pp. 805-810, 1990.
- Andrade, S. E. M.; Faleiro, F. G. Engenharia genética: princípios científicos e aplicações. In: Faleiro, F. G.; Andrade, S. R. M.; Reis Junior, F. B. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011. pp. 435-468.
- Araújo, A. E.; Suassuna, N. D. Guia de identificação e controle das principais doenças do algodoeiro no estado de Goiás. **Embrapa Documentos**. v. 113, pp. 1-40, 2003.
- Astrakhantseva, I. V.; Efimov, G. A.; Drutskaya, M. S.; Kruglov, A. A.; Nedospasov, S. A. Modern anti-cytokine therapy of autoimmune diseases. **Biochemistry (Moscow)**, 2014. doi: 10.1134/S0006297914120049
- Azambuja, R.; Degrande, P. E. Biologia e ecologia do bicudo-do-algodoeiro no Brasil. In: BELOT, J. L. **O bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* BOH., 1843) nos cerrados brasileiros: biologia e medidas de controle**. Cuiabá: IMAmt, 2015. pp. 47-60.
- Barbosa, A. E. A. D., Albuquerque, E. V. S., Silva, M. C. M., Souza, D. S. L., Oliveira-Neto, O. B., Valencia, A. α -amylase inhibitor-1 gene from *Phaseolus vulgaris* expressed in *Coffea arabica* plants inhibits α -amylases from the coffee berry borer pest. **BMC Biotechnology**, v. 10, n. 44, 2010. doi:10.1186/1472-6750-10-44
- Basso, A. M. M. (2012). **Produção de glucagon recombinante: expressão, purificação e avaliação de atividade biológica**. Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, Brasília.
- Basso, A. M. M.; Grossi-de-Sá, M. F.; Pelegrini, P. B. Biopharmaceutical and biosimilar products in Brazil: from political to biotechnological overview. **Journal of Bioequivalence and Bioavailability**, v. 5, pp. 60-66, 2013.
- Basso, A. M. M.; Prado, G. S.; Pelegrini, P. B.; Grossi-de-Sá, M. F. Biopharmaceuticals and biosimilars. In: Soccol, V. T.; Pandey, A.; Resende, R. **Current developments in Biotechnology and Bioengineering**. New York: Elsevier, 2016. pp. 23-48.

- Baumberger, N., Tsai, C. H., Lie, M., Havecker, E., Baulcombe, D. C. The Plover virus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. **Current Biology**, v. 17, n. 18, pp. 1609-1614, 2007. doi:10.1016/j.cub.2007.08.039
- Beck, A.; Wurch, T.; Bailly, C.; Corvaia, N. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, pp. 345-352, 2010.
- Bendahmane, A., Farnham, G., Moffett, P., Baulcombe, D. C. Constitutive gain-of-function mutants in a nucleotide binding site-leucine rich repeat protein encoded at the Rx locus of potato. **The Plant Journal**, v. 32, n. 2, pp. 195-204, 2002.
- Bernfeld, P. Amylases, alpha and beta. In: Colowick, S. P.; Kaplan, N. O. **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press, 1955. pp. 149–158.
- Boothe, J.; Nykiforuk, C.; Shen, Y.; Zaplachinski, S.; Szarka, S.; Kuhlman, P.; Murray, E.; Morck, D.; Moloney, M. M. Seed-based expression systems for plant molecular farming. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, pp. 588-606, 2010.
- Bosch, D.; Castilho, A.; Loos, A.; Schots, A.; Steinkellner, H. N-glycosylation of plant-produced recombinant proteins. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, pp. 5503-5512, 2013.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, pp. 248–254, 1976. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- BRASIL. **Política de Desenvolvimento da Biotecnologia**. 2007. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2007/decreto/d6041.htm>. Acesso em: 15 jan. 2018.
- Brasileiro, A. C. M.; Dusi, D. M. A. Transformação genética de plantas. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 1999. pp. 679-736.
- Burgyán, J.; Havelda, Z. Viral suppressors of RNA silencing. **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 5, pp. 265-272, 2011.
- Cañizares, M. C.; Navas-Castillo, J.; Moriones, E. Multiple suppressors of RNA silencing encoded by both genomic RNAs of the crinivirus, *Tomato chlorosis virus*. **Virology**, v. 379, pp. 168-174, 2008.
- Carreira, A. C. O.; Levin, G.; Coelho, T. M.; Belchior, G. G.; Sogayar, M. C. Biofármacos: sua importância e as técnicas utilizadas em sua produção. **Genética na Escola**, v. 8, n. 2, pp. 168-177, 2013.
- Casacuberta, J. M.; Devos, Y.; Jardin, P.; Ramon, M.; Vaucheret, H.; Nogué, F. Biotechnological uses of RNAi in plants: risk assessment considerations. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 3, pp. 145-147, 2015.
- Ceci, L. R., Volpicella, M., Rahbé, Y., Gallerani, R., Beekwilder, J., Jongsma, M. A. Selection by phage display of a variant mustard trypsin inhibitor toxic against aphids. **The Plant Journal**, v. 33, pp. 557–566, 2003. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01645.x

- Chandrasekaran, J., Brumin, M., Wolf, D., Leibman, D., Klap, C., Pearlsman, M., Sherman, A.; Arazi, T.; Gal-On, A. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. **Molecular Plant Pathology**, v. 17, n. 7, pp. 1140–1153, 2016.
- Chakravarty, V. S. K.; Reddy, T. P.; Reddy, V. D.; Rao, K. V. Current status of genetic engineering in cotton (*Gossypium hirsutum* L.): an assessment. **Current Reviews in Biotechnology**, 2012. doi:10.3109/07388551.2012.743502
- Chen, P.-J., Senthilkumar, R., Jane, W.-N., He, Y., Tian, Z., Yeh, K.-W. Transplastomic *Nicotiana benthamiana* plants expressing multiple defence genes encoding protease inhibitors and chitinase display broad-spectrum resistance against insects, pathogens and abiotic stresses. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, pp. 503–515, 2014. doi:10.1111/pbi.12157
- Choe, W., Durgannavar, T. A., Chung, S. J. Fc-binding ligands of immunoglobulin G: an overview of high affinity proteins and peptides. **Materials**, v. 9, n. 12, p. 994, 2016.
- CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Quadro de suprimentos e comércio exterior**. 2017. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1538&t>>. Acesso em: 21 jan. 2018.
- Cornelissen, B. J. C., Horowitz, J., van Kan, J. A. L., Goldberg, R. B., Bol, J. F. Structure of tobacco genes encoding pathogenesis-related proteins from the PR-1 group. **Nucleic Acids Research**, v. 15, n. 17, pp. 6799-6811, 1987.
- Craveiro, K. I., Gomes Júnior, J. E., Silva, M. C., Macedo, L. L. P., Lucena, W. A., Silva, M. S., Souza Júnior, J. D.; Oliveira, G. R.; Magalhães, M. T.; Santiago, A. D.; Grossi-de-Sá, M. F. Variant CryIIa toxins generated by DNA shuffling are active against sugarcane giant borer. **Journal of Biotechnology**, v. 145, pp. 215–221, 2010. doi: 10.1016/j.jbiotec.2009.11.011
- Daniell, H., Singh, N. D., Mason, H., Stratfield, S. J. Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 12, pp. 669-679, 2009. doi:10.1016/j.tplants.2009.09.009
- Deist, B. R., Rausch, M. A., Fernandez-Luna, M. T., Adang, M. J., Bonning, B. C. Bt Toxin Modification for Enhanced Efficacy. **Toxins**, v. 6, n. 10, pp. 3005–3027, 2014. doi:10.3390/toxins6103005
- Denecke, J.; Rycke, R.; Botterman, J. Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope. **The EMBO Journal**, v. 11, n. 6, pp. 2345-2355, 1992.
- Dias, S. C., Silva, M. C. M., Teixeira, F. R., Figueira, E. L. Z., Oliveira-Neto, O. B., Lima, L. A., Franco, O. L.; Grossi-de-Sá, M. F. Investigation of insecticidal activity of rye α -amylase inhibitor gene expressed in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) toward cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 98, pp. 39-44, 2010.
- Ding, Y., Li, H., Chen, L., Xie, K. Recent advances in genome editing using CRISPR/Cas9. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 703, 2016. doi:10.3389/fpls.2016.00703
- Echer, F. R. **O algodoeiro e os estresses abióticos**: temperatura, luz, água e nutrientes. Cuiabá: IMAmt, 2014. 123 pp.

ERNST&YOUNG – EY. **Biotechnology Reports 2017 – Beyond borders**. 2017. 100 pp. Disponível em: <[http://www.ey.com/Publication/vwLUAssets/ey-biotechnology-report-2017-beyond-borders-staying-the-course/\\$FILE/ey-biotechnology-report-2017-beyond-borders-staying-the-course.pdf](http://www.ey.com/Publication/vwLUAssets/ey-biotechnology-report-2017-beyond-borders-staying-the-course/$FILE/ey-biotechnology-report-2017-beyond-borders-staying-the-course.pdf)>. Acesso em: 15 jan. 2018.

Esposito, E.; Cuzzocrea, S. Anti-TNF therapy in the injured spinal cord. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 2, pp. 107-115, 2011.

Fardelone L. C.; Branchi, B. A. O setor de biofármacos e as oportunidades para o Brasil. **Revista da FAE**, v. 9, pp. 29-38, 2006.

Farnham, G.; Baulcombe, D. C. Artificial evolution extends the spectrum of viruses that are targeted by a disease-resistance gene from potato. **PNAS**, v. 103, n. 49, pp. 18828-18833, 2006. doi:10.1073/pnas.0605777103

Ferreira, C., Capella, A. N., Sitnik, R., Terra, W. R. Properties of the digestive enzymes and the permeability of the peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 107, n. 4, pp. 631-640, 1994. doi:10.1016/0300-9629(94)90362-X

Figueiredo, J., Sousa, M., Figueiredo, A. Subtilisin-like proteases in plant defense: the past, the present and beyond. **Molecular Plant Pathology**, 2017. doi: 10.1111/mpp.12567

Firmino, A. A. P. (2012). **Análise do transcriptoma de *Anthonomus grandis* e avaliação de um gene com potencial aplicação para controle do inseto por silenciamento gênico**. Tese de Doutorado, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Fischer, R., Vaquero-Martin, C., Sack, M., Drossard, J., Emans, N., Commandeur, U. Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 2, pp. 113-116, 1999.

Freire, E. C. **Algodão no Cerrado**. 2 ed. Brasília: ABRAPA, 2011.

Gassmann, A. J., Petzold-Maxwell, J. L., Clifton, E. H., Dunbar, M. W., Hoffmann, A. M., Ingber, D.A., Keweshan, R. S. Field-evolved resistance by western corn rootworm to multiple *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic maize. **PNAS**, v. 111, n. 14, pp. 5141–5146, 2014. doi:10.1073/pnas.1317179111

GEN – GENETIC ENGINEERING & BIOTECHNOLOGY NEWS. **Biosimilars: 11 drugs do watch**. 2014. Disponível em: <<http://www.genengnews.com/insight-and-intelligenceand153/biosimilars-11-drugs-to-watch/77900135/>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

Gion, W. R.; Davis-Taber, R. A.; Regier, D. A.; Fung, E.; Medina, L.; Santora, L. C.; Bose, S.; Ivanov, A. V.; Perilli-Palmer, B. A.; Chumsae, C. M.; Matuck, J. G.; Kunes, Y. Z.; Carson, G. R. Expression of antibodies using single open reading frame (sORF) vector design. **mAbs**, v. 5, n. 4, pp. 595-607, 2013.

Giritch, A.; Marillonnet, S.; Engler, C.; Eldik, G.; Botterman, J.; Klimyuk, V.; Gleba, Y. Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. **PNAS**, v. 103, n. 40, pp. 14701-14706, 2006.

Gleba, Y.; Klimyuk, V.; Marillonnet, S. Viral vectors for the expression of proteins in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, pp. 134-141, 2007.

Grossi-de-Sa, M. F., Mirkov, T. E., Ishimoto, M., Colucci, G., Bateman, K. S., Chrispeels, M. J. Molecular characterization of a bean α -amylase inhibitor that inhibits the α -amylase of the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. **Planta**, v. 203, pp. 295-303, 1997.

Habibi, P.; Prado, G. S.; Pelegrini, P. B.; Hefferon, K. L.; Soccol, C. R.; Grossi-de-Sá, M. F. Optimization of inside and outside factors to improve recombinant protein yield in plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 2017. doi:10.1007/s11240-017-1240-5

Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L., Baulcombe, D. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 17, pp. 4671-4679, 2002.

Harris, C. J., Slotweg, E. J., Goverse, A., Baulcombe, D. C. Stepwise artificial evolution of a plant disease resistance gene. **PNAS**, v. 110, n. 52, pp. 21189–21194, 2013. doi:10.1073/pnas.1311134110

Hefferon, K. L. Plant virus expression vectors set the stage as production platforms for biopharmaceutical proteins. **Virology**, v. 433, pp. 1-6, 2012.

Hsia, E. C.; Ruley, K. M.; Rahman, M. U. Infliximab (Remicade®): from bench to clinical practice. A paradigm shift in rheumatology practice. **APLAR Journal of Rheumatology**, v. 9, pp. 107-118, 2006.

Huang, Z.; Chen, Q.; Hjelm, B.; Arntzen, C.; Mason, H. A DNA replicon system for rapid high-level production of virus-like particles in plants. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 4, pp. 706-714, 2009.

Huang, Z.; Phoolcharoen, W.; Lai, H.; Piensook, K.; Cardineau, G.; Zeitlin, L.; Whaley, K. J.; Arntzen, C. J.; Mason, H. S.; Chen, Q. High-level rapid production of full-size monoclonal antibodies in plants by a single-vector DNA replicon system. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 106, n. 1, pp. 9-17, 2010.

Huber, R. E. The purification and study of a honey bee abdominal sucrase exhibiting unusual solubility and kinetic properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 168, n. 1, pp. 198-209, 1975. doi:10.1016/0003-9861(75)90242-8

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Prognóstico da Produção Agrícola Nacional, dos principais produtos, para safra 2018**. 2017. Disponível em: <

https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201712_12.shtm
>. Acesso em: 21 jan. 2018.

IGEA HUB. **Top 20 drugs in the world in 2017**. 2017. Disponível em: <

<https://igeahub.com/2017/08/08/top-20-drugs-in-the-world-2017/>>. Acesso em: 02 mar. 2018.

Inan, M.; Fanders, S. A.; Zhang, W.; Hotez, P. J.; Zhan, B.; Meagher, M. M. Saturation of the secretory pathway by overexpression of a hookworm (*Necator americanus*) protein (Na-ASP1). In: Cregg, J. M. **Pichia Protocols**. 389 ed. Humana Press, 2007.

James, C. ISAAA Brief 49–2014: Executive summary. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2014. **International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications**, 2017.

- Joga, M.; Zotti, M. J.; Smagghe, G.; Christiaens, O. RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: what we know so far. **Frontiers in Physiology**, v. 7, n. 553, 2016. doi:10.3389/fphys.2016.00553
- Kanagarajan, S.; Tolf, C.; Lundgren, A.; Waldentrom, J.; Brodelius, P. E. Transient expression of hemagglutinin antigen from low pathogenic avian Influenza A (H7N7) in *Nicotiana benthamiana*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0033010
- Karg, S. R.; Kallio, P. T. The production of biopharmaceuticals in plant systems. **Biotechnology Advances**, v. 27, pp. 879-894, 2009.
- Knight, D. M.; Trinh, H.; Le, J.; Siegel, S.; Shealy, D.; McDonough, M.; Scallon, B.; Moore, M. A.; Vilcek, J.; Daddona, P.; Ghayeb, J. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. **Molecular Immunology**, v. 30, pp. 1443-1453, 1993.
- Ko, K.; Ahn, M.; Song, M.; Choo, Y.; Kim, H. S.; Ko, K.; Joung, H. Glyco-engineering of biotherapeutic proteins in plants. **Molecules and Cells**, v. 25, n. 4, pp. 494-503, 2008.
- Komarova, T. V.; Baschieri, S.; Donini, M.; Marusic, C.; Benvenuto, E.; Dorokhov, Y. L. Transient expression systems for plant-made biopharmaceuticals. **Expert Review of Vaccines**, v. 9, n. 8, pp. 859-876, 2010.
- Koudamiloro, A.; Nwilene, F. E.; Togola, A.; Akogbeto, M. Insect vectors of *Rice yellow mottle virus*. **Journal of Insects**, v. 2015. doi:10.1155/2015/721751.
- Kozak, M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. **Cell**, v. 44, n. 2, pp. 283-292, 1986. doi:10.1016/0092-8674(86)90762-2.
- Kubota, K.; Ng, J. C. K. *Lettuce chlorosis virus* P23 suppresses RNA silencing and induces local necrosis with increased severity at raised temperatures. **Phytopathology**, v. 106, n. 6, pp. 653-662, 2016.
- Kunes, Y. Z.; Gion, W. R.; Fung, E.; Salfeld, J. G.; Zhu, R.; Sakorafas, P.; Carson, G. R. Expression of antibodies using single-open reading frame vector design and polyprotein processing from mammalian cells. **American Institute of Chemical Engineers**, v. 25, n. 3, pp. 735-744, 2009.
- Lacombe, S., Bangratz, M., Vignols, F., Brugidou, C. The rice yellow mottle virus P1 protein exhibits dual functions to suppress and activate gene silencing. **The Plant Journal**, v. 61, pp. 371-382, 2010.
- Lacombe, S., Bangratz, M., Brizard, J., Petitdidier, E., Pagniez, J., Séréme, D., Lemesre, J., Brugidou, C. Optimized transitory ectopic expression of promastigote surface antigen protein in *Nicotiana benthamiana*, a potential anti-leishmaniasis vaccine candidate. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2017. In press.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, pp. 680-685, 1970.
- Lassner, M., and Bedbrook, J. Directed molecular evolution in plant improvement. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, n. 2, pp. 152-156, 2001.

- Lee, C.; Jeong, M.; Lee, J. J.; Seo, S.; Cho, S. C.; Zhang, W.; Jaquez, O. Glycosylation profile and biological activity of Remicade compared with Flixabi and Remsima. **mAbs**, v. 9, n. 6, pp. 968–977, 2017.
- Li, Z., Liu, Z., Xing, A., Moon, B. P., Koellhoffer, J. P., Huang, L., Ward, R. T.; Clifton, E.; Falco, S. C.; Cigan, A. M. Cas9-Guide RNA directed genome editing in soybean. **Plant Physiology**, v. 169, pp. 960–970, 2015.
- Liang, S., Dai, J., Hou, S., Su, L., Zhang, D, Guo, H. Structural basis for treating tumor necrosis factor alpha (TNF- α)-associated diseases with the therapeutic antibody infliximab. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 19, pp. 13799-13807, 2013.
- Liang, C., Sun, B., Meng, Z., Meng, Z., Wang, Y., Sun, G., Zhu, T.; Lu, W.; Zhang, W.; Malik, W.; Lin, M.; Zhang, R.; Guo, S. Co-expression of GR79 EPSPS and GAT yields herbicide-resistant cotton with low glyphosate residues. **Plant Biotechnology Journal**, 2017. doi:10.1111/pbi.12744
- Lico, C.; Chen, Q.; Santi, L. Viral vectors for production of recombinant proteins in plants. **Journal of Cellular Physiology**, v. 216, pp. 366-377, 2008.
- Liu, X., Wu, S., Xu, J., Sui, C., Wei, J. Application of CRISPR/Cas9 in plant biology. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 7, n. 3, pp. 292-302, 2017.
- Lombardi, R.; Circelli, P.; Villani, M. E.; Buriani, G.; Nardi, L.; Coppola, V.; Bianco, L.; Benvenuto, E.; Donini, M.; Marusic, C. High-level HIV-1 Nef transient expression in *Nicotiana benthamiana* using the P19 gene silencing suppressor protein of *Artichoke mottled crinkle virus*. **BMC Biotechnology**, v. 9, n. 96, 2009. doi:10.1186/1472-6750-9-96
- Lombardi, R., Donini, M., Villani, M. E., Brunetti, P., Fujiyama, K., Kajiura, H., Paul, M.; Ma, J. K.; Benvenuto, E. Production of different glycosylation variants of the tumour-targeting mAb H10 in *Nicotiana benthamiana*: influence on expression yield and antibody degradation. **Transgenic Research**, v. 21, pp. 1005-1021, 2012.
- Lombardo, L., Coppola, G., Zelasco, S. New technologies for insect-resistant and herbicide-tolerant plants. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 1, pp. 49–57, 2016. doi:10.1016/j.tibtech.2015.10.006
- Luke, G. A.; Roulston, C.; Tilsner, J.; Ryan, M. D. Growing uses of 2A in Plant Biotechnology. **InTechOpen**, pp. 165-193, 2015. <http://dx.doi.org/10.5772/59878>
- Ma, J. K-C.; Drake, P. M. W.; Christou, P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, pp. 794-805, 2003.
- Ma, X., Zhu, Z., Li, Y., Yang, G., Pei, Y. Expressing a modified cowpea trypsin inhibitor gene to increase insect tolerance against *Pieris rapae* in Chinese cabbage. **Horticulture, Environment and Biotechnology**, v. 58, n. 2, pp. 195-202, 2017. doi: 10.1007/s13580-017-0188-z
- Macedo, L.L.P. (2012). **Silenciamento gênico de quitina sintases de *Anthonomus grandis*: potencial biotecnológico no controle de insetos-praga**. Tese de Doutorado, Universidade Católica de Brasília, Brasília.

Madeira, L.M. (2008). **Expressão de cyanovirin-N, um microbicida anti-HIV, em plantas.** Dissertação de mestrado, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.

Mallory, A. C.; Parks, G.; Endres, M. W.; Baulcombe, D.; Bowman, L. H.; Pruss, G. J.; Vance, V. B. The amplicon-plus system for high-level expression of transgenes in plants. **Nature Biotechnology**, v. 20, pp. 622-625, 2002.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO.

Agropecuária puxa o PIB de 2017. 2017. Disponível em: <

<http://www.agricultura.gov.br/noticias/agropecuaria-puxa-o-pib-de-2017>>. Acesso em: 21 jan. 2018.

McCafferty, H. R., Moore, P. H., Zhu, Y. J. Improved *Carica papaya* tolerance to carmine spider mite by the expression of *Manduca sexta* chitinase transgene. **Transgenic Research**, v. 15, n. 3, pp. 337–347, 2006. doi:10.1007/s11248-006-0005-4

Morton, R. L., Schroeder, H. E., Bateman, K. S., Chrispeels, M. J., Armstrong, E., Higgins, T. J. Bean α -amylase inhibitor 1 in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under field conditions. **PNAS**, v. 97, n. 8, pp. 3820-3825, 2000. doi:10.1073/pnas.070054597

Munro, S., Pelham, H. R. B. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. **Cell**, v. 48, pp. 899-907, 1987.

Murphy, K.; Travers, P.; Walport, M. Autoimunidade e transplante. In: Murphy, K.; Travers, P.; Walport, M. **Imunobiologia de Janeway**. 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. pp. 597-652.

Nausch, H.; Mikschofsky, H.; Koslowski, R.; Meyer, U.; Broer, I.; Huckauf, J. High-level transient expression of ER-targeted human interleukin 6 in *Nicotiana benthamiana*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0048938

Nekrasov, V., Wang, C., Win, J., Lanz, C., Weigel, D., Kamoun, S. Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 482, 2017.

OCDE – ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO. **Key biotechnology indicators**. 2015. Disponível em:

<<http://www.oecd.org/sti/inno/keybiotechnologyindicators.htm>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

Palladino, M. A.; Bahjat, F. R.; Theodorakis, E. A.; Moldawer, L. L. Anti-TNF- α therapies: the next generation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, pp. 736-746, 2003.

Parekh, R.; Forrester, K.; Wittrup, D. Multicopy overexpression of bovine pancreatic trypsin inhibitor saturates the protein folding and secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. **Protein Expression and Purification**, v. 6, pp. 537-545, 1995.

Pimentel, V.; Gomes, R.; Landim, A.; Maciel, M.; Pieroni, J. P. O desafio de adensar a cadeia de P&D de medicamentos biotecnológicos no Brasil. **BNDES Setorial**, v. 38, pp. 173-212, 2013.

Pogue, G. P.; Vojdani, F.; Palmer, K. E.; Hiatt, E.; Hume, S.; Phelps, J.; Long, L.; Bohorova, N.; Kim, D.; Pauly, M.; Velasco, J.; Whaley, V.; Zeitlin, L.; Garger, S. J.; White, E.; Bai, Y.; Haydon, H.; Bratcher, B. Production of pharmaceutical-grade recombinant aprotinin and a

monoclonal antibody product using plant-based transient expression systems. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, pp. 638-654, 2010.

Prado, G.S. (2013). **Transformação genética do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) para obtenção de resistência ao mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*)**. Trabalho de Conclusão de Curso, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

Pueyo, J. J., Dale, D. C., Chrispeels, M. J. Activation of bean (*Phaseolus vulgaris*) α -amylase inhibitor requires proteolytic process of the proprotein. **Plant Physiology**, v. 101, pp. 1341-1348, 1993.

Quétier, F. The CRISPR-Cas9 technology: closer to the ultimate toolkit for targeted genome editing. **Plant Science**, v. 242, pp. 65-76, 2016.

Quilis, J., López-García, B., Meynard, D., Guiderdoni, E., San Segundo, B. Inducible expression of a fusion gene encoding two proteinase inhibitors leads to insect and pathogen resistance in transgenic rice. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, pp. 367–377, 2014. doi:10.1111/pbi.12143

Reis, C.; Capanema, L. X. L.; Palmeira Filho, P. L.; Pieroni, J. P.; Barros, J. O.; Silva, L. G. Biotecnologia para saúde humana: tecnologias, aplicações e inserção na indústria farmacêutica. **BNDES Setorial**, v. 29, pp. 359-392, 2009.

Ribeiro, T. P.; Arraes, F. B. M.; Lourenço-Tessutti, I. T.; Silva, M. S.; Lisei-de-Sá, M. E.; Lucena, W. A.; Macedo, L. L. P.; Lima, J. N.; Amorim, R. M. S.; Artico, S.; Alves-Ferreira, M.; Silva, M. C. M.; Grossi-de-Sá, M. F. Transgenic cotton expressing Cry10Aa toxin confers high resistance to the cotton boll weevil. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, pp. 997-1009, 2017.

Rosenberg, Y., Sack, M., Montefiori, D., Forthal, D., Mao, L., Hernandez-Abanto, S., Urban, L.; Landucci, G.; Fischer, R.; Jiang, X. Rapid high-level production of functional HIV broadly neutralizing monoclonal antibodies in transient plant expression systems. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0058724.

Rothbard, M. **Ciência, Tecnologia & Governo**. 1 ed. Campinas: Vide Editorial, 2017.

Sack, M.; Hofbauer, A.; Fischer, R.; Stoger, E. The increasing value of plant-made proteins. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 32, pp. 163-170, 2015.

Sainsbury, F.; Sack, M.; Stadlmann, J.; Quendler, H.; Fischer, R.; Lomonosoff, G. P. Rapid transient production in plants by replicating and non-replicating vectors yields high quality functional anti-HIV antibody. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11, 2010. doi:10.1371/journal.pone.0013976

Sales, P. M.; Souza, P. M.; Simeoni, L. A.; Silveira, D. α -amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 1, pp. 141-183, 2012.

Santos, M. D. M.; Torres, A. C. Transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*. In: Torres, A. C.; Dusi, A. N.; Santos, M. D. M. **Transformação genética de plantas via *Agrobacterium***. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2007. pp. 31-58.

- Santos, W. J. Medidas estratégicas de controle do bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* BOH., 1843). In: Belot, J. L. **O bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* BOH., 1843) nos cerrados brasileiros: biologia e medidas de controle**. Cuiabá: IMAmt, 2015. pp. 76-91.
- Schroeder, H. E., Gollasch, S., Moore, A., Tabe, L. M., Craig, S., Hardie, D. C. Bean α -amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil (*Bruchus pisorum*) in transgenic peas (*Pisum sativum* L.). **Plant Physiology**, v. 107, pp. 1233-1239, 1995.
- Schulze, K.; Koppka, N.; Lutter, F.; Brandhorst, G.; Schreiber, S.; Helwig, U. CT-P13 (Inflectra™, Remsima™) monitoring in patients with inflammatory bowel disease. **Biologicals**, v. 44, n. 5, pp. 463-466, 2016.
- Shulman, M.; Wilde, C. D.; Kohler, G. A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. **Nature**, v. 276, pp. 269-270, 1978.
- Silva, M. C. M., Del Sarto, R. P., Lucena, W. A., Rigden, D. J., Teixeira, F. R., Bezerra, C. A., Albuquerque, E. V.; Grossi-de-Sá, M. F. Employing *in vitro* directed molecular evolution for the selection of α -amylase variant inhibitors with activity toward cotton boll weevil enzyme. **Journal of Biotechnology**, v. 167, n. 4, pp. 377-385, 2013. doi:10.1016/j.jbiotec.2013.07.016
- Siré, C., Bangratz-Reyser, M., Fargette, D., Brugidou, C. Genetic diversity and silencing suppression effects of *Rice yellow mottle virus* and the P1 protein. **Virology Journal**, v. 5, n. 55, 2008. doi:10.1186/1743-422X-5-55
- Sluys, M. A. V. *Agrobacterium*: um vetor genético natural para transformação de plantas. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 1999. pp. 737-760.
- Smigocki, A. C., Ivic-Haymes, S., Li, H., Savic, J. Pest protection conferred by a *Beta vulgaris* serine proteinase inhibitor gene. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0057303
- Souza, A. C.; Vasques, R. M.; Inoue-Nagata, A. K.; Lacorte, C.; Maldaner, F. R.; Noronha, E. F.; Nagata, T. Expression and assembly of Norwalk virus-like particles in plants using a viral RNA silencing suppressor gene. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, pp. 9021-9027, 2013.
- Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J., Holle, A. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, p. 952, 2003. doi: 10.1007/s00216-003-2057-0
- Sujii, E. R.; Pires, C. S. S. Plantas hospedeiras do bicudo-do-algodoeiro. In: Belot, J. L. **O bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* BOH., 1843) nos cerrados brasileiros: biologia e medidas de controle**. Cuiabá: IMAmt, 2015. pp. 61-78.
- Sun, Y., Zhang, X., Wu, C., He, Y., Ma, Y., Hou, H., Guo, X.; Du, W.; Zhao, Y.; Xia, L. Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase. **Molecular Plant**, v. 9, pp. 628-631, 2016.
- Svitashev, S., Young, J. K., Schwartz, C., Gao, H., Falco, S. C., Cigan, A. M. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. **Plant Physiology**, v. 169, pp. 931-945, 2015.

- Switzer R. C., Merrill, C. R., Shifrin, S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 98, pp. 231–237, 1979.
- Thomas, D. R.; Walmsley, A. M. The effect of the unfolded protein response on the production of recombinant proteins in plants. **Plant Cell Reports**, v. 34, pp. 179-187, 2015.
- Udpa, N.; Million, R. P. Monoclonal antibody biosimilars. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 1, pp. 13-14, 2016.
- Vachon, V., Laprade, R., Schwartz, J. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 111, n. 1, pp. 1–12, 2012. doi:10.1016/j.jip.2012.05.001
- Vandenborre, G., Smagghe, G., Van Damme, E. J. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, pp. 1538–1550, 2011. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.02.024
- Viana, A. A. B.; Pelegrini, P. B.; Grossi-de-Sá, M. F. Plant biofarming: novel insights for peptide expression in heterologous systems. **Biopolymers**, v. 98, n. 4, pp. 416-427, 2012.
- Villalobos, A., Ness, J. E., Gustafsson, C., Minshull, J., Govindarajan, S. Gene Designer: a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments. **BMC Bioinformatics**, v. 7, n. 285, 2006. doi:10.1186/1471-2105-7-285
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., Baulcombe, D. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. **The Plant Journal**, v. 33, n. 5, pp. 949-956, 2003.
- Walsh G.; Jefferis, R. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. **Nature Biotechnology**, v. 24, pp. 1241-1252, 2006.
- Walsh G. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. **Drug Discovery Today**, v. 15, pp. 773-780, 2010.
- Wang, J., Chen, Z., Du, J. Novel insect resistance in Brassica napus developed by transformation of chitinase and scorpion toxin genes. **Plant Cell Reports**, v. 24, n. 9, pp. 549–555, 2005. doi:10.1007/s00299-005-0967-3
- Wang, P., Zhang, J., Sun, L., Ma, Y., Xu, J., Liang, S., Deng, J.; Tan, J.; Zhang, Q.; Tu, L.; Daniell, H.; Jin, S.; Zhang, X. High efficient multisites genome editing in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) using CRISPR/Cas9 system. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, 2017. doi: 10.1111/pbi.12755.
- Westerhof, L. B.; Wilbers, R. H. P.; Raaij, D. R.; Nguyen, D.; Goverse, A.; Henquet, M. G. L.; Hokker, C. H.; Bosch, D.; Bakker, J.; Schots, A. Monomeric IgA can be produced *in planta* as efficient as IgG, yet receives different N-glycans. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, pp. 1333-1342, 2014.
- Wilken, L. R.; Nikolov, Z. L. Recovery and purification of plant-made recombinant proteins. **Biotechnology Advances**, v. 30, pp. 419-433, 2012.
- Wise, A. A., Liu, Z., Binns, A. N. Three methods for the introduction of foreign DNA into *Agrobacterium*. In: Wang, K. **Agrobacterium Protocols. Methods in Molecular Biology**. 343 ed. Totowa: Humana Press, 2006 pp. 47-48.

Young, N. M., Thibault, P., Watson, D. C., Chrispeels, M. J. Post-translational processing of two α -amylase inhibitors and an arcelin from the common bean, *Phaseolus vulgaris*. **FEBS Letters**, v. 446, pp. 203-206, 1999.

Yuan, L., Kurek, I., English, J., Keenan, R. Laboratory-directed protein evolution. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 3, pp. 373–392, 2005.
doi:10.1128/MMBR.69.3.373-392.2005

APÊNDICES

Apêndice A. Soluções-tampão e meios de cultivo utilizados.

Meio de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido

Composto	Massa/volume
Triptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
NaCl	10 g
Água destilada	q.s.p. 1 L
Total	1 L

Meio de cultivo Luria-Bertani (LB) sólido

Composto	Massa/volume
Triptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
NaCl	10 g
Ágar	20 g
Água destilada	q.s.p. 1 L
Total	1 L

Tampão de extração de proteínas vegetais solúveis (A) (pH 7,4)

Substância	Concentração final
Tris-HCl (pH 7,4)	20 mM
NaCl	10 mM
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	10 mM
D-glicose	25 mM
Triton X-100	0,1% (v/v)
EGTA	5 mM
Glicerol	5% (v/v)
DTT	5 mM
PMSF	1 mM

Tampão de extração de proteínas vegetais solúveis (B) – PBS-T 1x (pH 8,0)

Substância	Concentração final
KCl	2,7 mM
NaCl	137 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM
Tween 20	0,1% (v/v)
PMSF	1 mM

Solução corante – Coomassie Brilliant Blue G-250

Substância	Concentração final
Coomassie G-250	1 g/L
Metanol	50% (v/v)
Ácido acético	10% (v/v)

Solução descorante

Substância	Concentração final
Metanol	40% (v/v)
Ácido acético	10% (v/v)

Tampão de transferência de proteínas

Substância	Concentração final
Tris base	20 mM
Glicina	150 mM
Metanol	20% (v/v)

Tampão TBS-T 1x (pH 7,5)

Substância	Concentração final
Tris base	20 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,1% (v/v)

Tampão de amostras para ELISA (pH 9,6)

Substância	Concentração final
NaHCO ₃	50 mM
Na ₂ CO ₃	50 mM

Tampão PBS-T 1x (pH 7,4)

Substância	Concentração final
NaCl	136 mM
KCl	3 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM
Tween 20	0,05% (v/v)

Tampão de revelação para HRP (pH 5,0)

Substância	Concentração final
Ácido cítrico	24,3 mM
H ₂ O ₂	0,06%
Na ₂ HPO ₄	51,4 mM
TMB	0,1 mg/mL

Tampão de revelação para AP (pH 9,8)

Substância	Concentração final
Dietanolamina	1 M
MgCl ₂	0,5 mM
pNPP	1 mg/mL

Tampão de equilíbrio para α -AIC3 (pH 7,4)

Substância	Concentração final
NaCl	136 mM
KCl	3 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
DTT	1 mM

Tampão AGA (pH 5,0)

Substância	Concentração final
Ácido succínico	150 mM
CaCl ₂	20 mM
NaCl	60 mM
PMSF	1 mM

Tampão AMA (pH 6,5) (HUBER, 1975)

Substância	Concentração final
Ácido succínico	150 mM
CaCl ₂	20 mM
NaCl	60 mM
PMSF	1 mM

Tampão SFA (pH 9,0) (FERREIRA et al., 1994)

Substância	Concentração final
Tris-HCl	500 mM
CaCl ₂	20 mM
NaCl	60 mM
PMSF	1 mM

Apêndice B. Afinidades das proteínas A/G de *Staphylococcus aureus* para imunoglobulinas de diferentes espécies (New England Biolabs®).

Species	Immunoglobulin	Binding to Protein A	Binding to Protein G
Human	IgG (normal)	++++	++++
	IgG1	++++	++++
	IgG2	++++	++++
	IgG3	-	++++
	IgG4	++++	++++
	IgM	-	-
	IgA	-	-
	IgE	-	-
Mouse	IgG1	+	++++
	IgG2a	++++	++++
	IgG2b	+++	+++
	IgG3	++	+++
Rat	IgG1	-	+
	IgG2a	-	++++
	IgG2b	-	++
	IgG2c	+	++
Goat	IgG	+/-	++
Rabbit	IgG	++++	+++
Sheep	IgG	+/-	++

Apêndice C. Digestão triptica teórica de α -AIC3 na ferramenta PeptideMass.

PeptideMass

The entered sequence is:

```

      10      20      30      40      50      60
ATETSFIIIDA FNKTNLILQG DATVSSNGNL QLSYNSYDSM SRAFYSAPIQ IRDSTTGNVA

      70      80      90      100     110     120
SFDTNFTMNI RTHRQANSAV GLDFVLVPVQ PESKGDVTVT EFDTFLSRIS IDVNNNDIKS

      130     140     150     160     170     180
VPWDVHDYDG QNAEVRITYN SSTKVLAVSL SNPSTGKSNE VSARMEVEKE LDDWVRVGFS

      190     200     210     220
AISGVHEYSF ETRDVLWSWF SSKFSQHTTS ERSNILLNKI L

```

The selected enzyme is: Trypsin

Maximum number of missed cleavages (MC): 0

All cysteines in reduced form.

Methionines have not been oxidized.

Displaying peptides with a mass bigger than 500 Dalton.

Using monoisotopic masses of the occurring amino acid residues and giving peptide masses as $[M+H]^+$.

The peptide masses from your sequence are:

[Theoretical pI: 4.86 / Mw (average mass): 24560.06 / Mw (monoisotopic mass): 24545.08]

mass	position	#MC	modifications	peptide sequence
3148.4851	14-42	0		TNLILQGDATVSSNGNLQLS YNSYDSMSR
2098.1178	75-94	0		QANSAVGLDFVLVPVQPESK
2090.9447	53-71	0		DSTTGNVASFDTNFTMNIR
1986.8940	120-136	0		SVPWDVHDYDGGQNAEVR
1885.9079	177-193	0		VGFS AISGVHEYSFETR
1586.7696	95-108	0		GDTVTV EFDTFLSR
1456.7318	1-13	0		ATETSFII DAFNK
1272.7158	145-157	0		VLAVSL SNPSTGK
1244.6481	109-119	0		ISIDVNNNDIK
1165.6364	43-52	0		AFYSAPIQIR
1155.5680	194-203	0		DVLSWSFSSK
1092.5068	204-212	0		FSQHTTSER
932.4472	170-176	0		ELDDWVR
913.4625	137-144	0		ITYNSSTK
801.4829	213-219	0		SNILLNK
762.3740	158-164	0		SNEVSAR
635.3069	165-169	0		MEVEK

ANEXOS

Anexo A. Publicações geradas ao longo do período de Doutorado (2014-2018).

Plant Mol Biol
DOI 10.1007/s11103-014-0240-7

Analysis of BAC-end sequences in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) towards the development and characterization of long motifs SSRs

Bárbara Salomão de Faria Müller · Tetsu Sakamoto · Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes ·
Guilherme Souza Prado · Wellington Santos Martins · Claudio Brondani ·
Everaldo Gonçalves de Barros · Rosana Pereira Vianello

Received: 20 November 2013 / Accepted: 14 August 2014
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Abstract The increasing volume of genomic data on the *Phaseolus vulgaris* species have contributed to its importance as a model genetic species and positively affected the investigation of other legumes of scientific and economic value. To expand and gain a more in-depth knowledge of the common bean genome, the ends of a number of bacterial artificial chromosome (BAC) were sequenced, annotated and the presence of repetitive sequences was determined. In total, 52,270 BESs (BAC-end sequences), equivalent to 32 Mbp (~6 %) of the genome, were processed. In total, 3,789 BES-SSRs were identified, with a distribution of one SSR (simple sequence repeat) per 8.36 kbp and 2,000 were suitable for the development of SSRs, of which 194 were evaluated in low-resolution screening. From 40 BES-SSRs based on long motifs SSRs

(≥trinucleotides) analyzed in high-resolution genotyping, 34 showed an equally good amplification for the Andean and for the Mesoamerican gene pools, exhibiting an average gene diversity (H_E) of 0.490 and 5.59 alleles/locus, of which six classified as Class I showed a $H_E \geq 0.7$. The PCoA and structure analysis allowed to discriminate the gene pools ($K = 2$, $F_{ST} = 0.733$). From the 52,270 BESs, 2 % corresponded to transcription factors and 3 % to transposable elements. Putative functions for 24,321 BESs were identified and for 19,363 were assigned functional categories (gene ontology). This study identified highly polymorphic BES-SSRs containing tri- to hexanucleotides motifs and bringing together relevant genetic characteristics useful for breeding programs. Additionally, the BESs were incorporated into the international genome-sequencing project for the common bean.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11103-014-0240-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

B. S. F. Müller · E. G. Barros
Laboratório de Genética Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brazil

B. S. F. Müller · G. S. Prado · C. Brondani · R. P. Vianello (✉)
Laboratório de Biotecnologia, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, Brazil
e-mail: rosana.vianello@embrapa.br

T. Sakamoto
Laboratório de Biodados, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil

I. P. P. Menezes
Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Departamento de Biologia, Instituto Federal Goiano (IF Goiano), Urutaf, GO, Brazil

W. S. Martins
Instituto de Informática, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO, Brazil

E. G. Barros
Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brazil

E. G. Barros
Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília (UCB), Brasília, DF, Brazil



Biopharmaceuticals and Biosimilars

A.M.M. Basso^{1,3}, G.S. Prado^{2,3}, P.B. Pelegrini^{3,4},
M.F. Grossi-de-Sa^{2,3,*}

¹UNIVERSITY OF BRASÍLIA (UNB), BRASÍLIA-DF, BRAZIL; ²CATHOLIC UNIVERSITY OF BRASÍLIA (UCB), BRASÍLIA-DF, BRAZIL; ³EMBRAPA – GENETIC RESOURCES AND BIOTECHNOLOGY, BRASÍLIA-DF, BRAZIL; ⁴DIAGENE DIAGNÓSTICOS MOLECULARES LTDA, BRASÍLIA-DF, BRAZIL

2.1 Introduction

Until the 19th century, pharmaceuticals provided to the population were based on plant-derived natural compounds and were applied in the form of infusions, teas, and creams. In 1885, Louis Pasteur attenuated the rabies virus in the laboratory and applied it to a boy who was bitten by a dog with rabies disease, thereby saving his life [1]. It was the first report of virus manipulation as medicine in the history of human health sciences.

Later, in 1928, Alexander Fleming developed the penicillin antibiotic. Immediately, pharmaceutical companies such as Pfizer, Squibb, and Merck tried to synthesize it for large-scale production without success. Hence, the North Agriculture Regional Search Laboratory in the United States developed a methodology to produce penicillin but did not have a specific application. The need for the large-scale production of penicillin occurred during the Second World War (1939–45), because the number of American soldiers dying from bacterial infections and gangrene, accounting for 12–15% of all men. The administration of penicillin to wounded soldiers reduced mortality to 3%, saving hundreds of lives [2,3].

The post–Second World War period was the beginning of the biopharmaceutical industry, when the production of large-scale antibiotics started, as did the development of novel drugs from animal sources [4]. During the 1970s, researchers developed DNA recombinant technology, which facilitated the production of recombinant proteins. One of the first molecules produced by this technology was somatostatin [5]. Through genetic engineering techniques, the gene coding for somatostatin was inserted into *Escherichia coli* cells, which expressed a recombinant protein with activity similar to the human hormone [5]. In 1982, the same procedure was applied for the production and commercialization of the first recombinant insulin [6].

Over the ensuing years, other heterologous systems were introduced for producing recombinant human molecules, including yeasts, insects, and mammalian cells. The new

*Corresponding Author.



REVIEW

Optimization of inside and outside factors to improve recombinant protein yield in plant

Peyman Habibi^{1,2} · Guilherme Souza Prado^{2,3} · Patrícia Barbosa Pelegrini⁴ · Kathleen Laura Hefferon⁵ · Carlos Ricardo Soccol¹ · Maria Fatima Grossi-de-Sa^{2,3,6}

Received: 11 January 2017 / Accepted: 28 May 2017
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2017

Abstract The use of plant systems as factories for recombinant protein production became a prominent alternative for pharmaceutical industries due to their high potential for protein accumulation. In the last decades, the application of plants for protein production has gained more attention, as plants represent an economic strategy that leads to high levels of purified and active proteins for the pharmaceutical sector. Currently, FDA approval of the first generation of recombinant proteins produced in carrot cells, taliglucerase alfa, demonstrated that plant cells have a significant capacity to express complex proteins for therapeutic use. Although plant systems still have technical and economic barriers that require improvements in future years, the optimization of upstream and downstream components affecting protein accumulation is considered a key feature in the development of new pharmaceutical proteins. Therefore,

an improvement of critical features, including transcription, translation and post-translational modifications, in plant cells could make plant systems a safe and economical alternative for biopharmaceutical production. Hence, in this review, the most recent advances influencing the upstream and downstream processes involved in recombinant protein accumulation in plant cells are described. We also discuss how plant systems are becoming the benchmark for the production of several biopharmaceuticals.

Keywords Heterologous expression · Host systems · Post-translational modifications · Plant-based pharmaceuticals · Recombinant protein

Introduction

Plant molecular pharming is the term related to the ability of plant materials to produce therapeutic proteins (Habibi et al. 2017). The emergence of molecular pharming as a reliable and novel production technology in recent decades is the result of years of work, opening new paths to minimizing the technical problems involved in yeast, bacterial, and mammalian platforms. Moreover, the identification and characterization of a promising regulatory pathway for the large-scale production of biopharmaceuticals could strongly contribute to the benefits of this system (Fischer et al. 2012). Molecular pharming technology presents several advantages, including (a) the production of low-cost biomass; (b) end-products lacking human toxicity; (c) the accumulation of complex proteins with correct and proper folding; and (d) straightforward methods for protein purification (Moustafa et al. 2015). Furthermore, molecular pharming offers a flexible, scalable and diverse alternative method for producing new,

Communicated by Sergio Rosales-Mendoza.

✉ Peyman Habibi
peymanhabibi89@gmail.com

✉ Maria Fatima Grossi-de-Sa
fatima.grossi@embrapa.br

¹ Department of Bioprocess Engineering and Biotechnology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

² Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, PqEB-Final W5 Norte, CP 02372 Brasília, DF, Brazil

³ Catholic University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

⁴ Diogene Molecular Diagnostics and Biotechnology, Brasília, DF, Brazil

⁵ Department of Cell Biology and Genetics, Cornell University, Ithaca, USA

⁶ Post Graduation Program in Biotechnology, University Potiguar, Natal, RN, Brazil

Artigo submetido ao periódico Plant Cell Reports

1 *Nicotiana benthamiana* is a suitable transient system for high-level heterologous expression of
2 an active inhibitor of cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) α -amylase

3 Guilherme Souza Prado^{1,2*}, Pingdwende Kader Aziz Bamogo^{3,4}, Joel Antônio Cordeiro de
4 Abreu^{1,2}, François-Xavier Gillet¹, Vanessa Olinto dos Santos¹, Maria Cristina Mattar Silva¹,
5 Jean-Paul Brizard³, Marcelo Porto Bemquerer¹, Martine Bangratz^{3,4}, Christophe Brugidou^{3,4},
6 Drissa Sérémé⁴, Maria Fatima Grossi-de-Sa^{1,2*} Séverine Lacombe^{3,4*}

7 ¹Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, DF, Brazil

8 ²Catholic University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

9 ³IRD, CIRAD, Université Montpellier, Interactions Plantes Microorganismes et Environnement
10 (IPME), Montpellier, France

11 ⁴INERA/LMI Patho-Bios, Institut de L'Environnement et de Recherches Agricoles (INERA),
12 Laboratoire de Virologie et de Biotechnologies Végétales, Ouagadougou, Burkina Faso

13

14 *Correspondence:

15 Maria Fátima Grossi-de-Sa, fatima.grossi@embrapa.br

16 Séverine Lacombe, severine.lacombe@ird.fr

17 Guilherme Souza Prado, gsprado25@gmail.com

18

19 **Abstract 250 words**

20 Insect resistance in crops represents a main challenge for agriculture. Transgenic approaches based
21 on proteins displaying insect resistance properties are widely used as efficient breeding strategies. To
22 extend the spectrum of target pathogens and overtake the development of insect resistance, molecular
23 evolution strategies have been used on genes encoding these proteins to generate thousands of
24 variants with new or improved functions. The cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) is one of the
25 major pests of cotton cultivation in the Americas. A α -amylase inhibitor (α -AIC3) variant previously
26 developed via *in vitro* molecular evolution showed inhibitory activity against *A. grandis* α -amylase
27 (AGA). In this study, we produced in few days high amounts of α -AIC3 using an optimised transient
28 heterologous expression system in *Nicotiana benthamiana*. This high α -AIC3 accumulation level
29 allowed its structural and functional characterizations. We demonstrated via the MALDI-TOF
30 MS/MS technique that the protein was correctly processed as expected for proteolytic cleavage. The
31 α -AIC3 protein could inhibit up to 100% of AGA biological activity whereas it did not act on α -
32 amylase of two non-pathogenic insects. These complete data confirmed that *N. benthamiana* is a
33 suitable and simple host system for high-level production of biologically active α -AIC3 and its
34 complete characterization. Moreover, our data showed that α -AIC3 is a very promising candidate for
35 the production of transgenic crops resistant to cotton boll weevil with reduced concerns about
36 biosafety. We propose this transient expression system can be complementary to molecular evolution

Anexo B. Declaração de titulação (Doutorado Sanduíche 2015 – CAPES/Agrópolis).

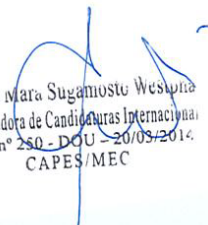
Ministério da Educação
Coordenação de Aperfeiçoamento
de Pessoal de Nível Superior

A QUEM POSSA INTERESSAR

Declaramos para os devidos fins que GUILHERME SOUZA PRADO – UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA, foi bolsista da CAPES/AGRÓPOLIS, no período de março de 2015 a outubro de 2015 na INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DÉVELOPPEMENT MONTPELLIER - FRANÇA, onde realizou Doutorado Sanduíche em Biotecnologia.

Brasília, 20 de Janeiro de 2015.

Atenciosamente,


Angeli Mara Sugamoto Westphal
Coordenadora de Candidaturas Internacionais
Port. nº 280 - DOU - 20/03/2014
CAPES/MEC

Anexo C. Carta de aprovação na Associação Mensa Brasil, obtida em 2017.



Associação Mensa Brasil

Prezado Guilherme Souza Prado,
gsprado25@gmail.com

Parabéns, você foi aprovado para ingressar na Mensa!

Temos a satisfação de informar que o seu teste de admissão foi corrigido e seu desempenho atingiu o percentil necessário para fazer parte da Mensa, segundo nosso instrumento de avaliação.

Esperamos que você se decida por juntar-se a nós e contribua para construirmos juntos uma sociedade ainda mais interessante e forte. Para efetuar sua inscrição, basta pagar via depósito bancário ou transferência a taxa de R\$ 100,00, referente a filiação e primeira anuidade:

Associação Mensa Brasil - CNPJ: 05.544.091/0001-40

Banco: 341 - Itaú

Agência: 1608 - Conta corrente: 20187-5

Para composição do cadastro e confecção de sua carteirinha, por favor, envie os dados abaixo juntamente com o comprovante de pagamento para o e-mail da secretaria (secretaria@mensa.org.br):

Nome: *Guilherme Souza Prado*

UF: DF

Cidade: *Brasília*

Endereço: *ACOl Conjunto F, lote 6*

Bairro: *Santa Maria*

CEP: *72535-060*

Data de nascimento: *25/08/1992*

e-mail: *gsprado25@gmail.com*

Profissão: *Biotecnologista*

Fone Res: —

Fone Com: —

Fone Cel: *(61) 9 9668-8486*



Em sua região, o Coordenador da Mensa local é o Cadu Fonseca (e-mail df@mensa.org.br).

Após receber seu número Mensa Brasil, para interagir com seus colegas e fazer parte de nossos grupos de debate, acesse o link <http://mensa.org.br/solicitacao-de-acesso-a-grupos.html>

Seja bem vindo!

Equipe Mensa Brasil

www.mensa.org.br

www.mensa.org.br
Associação Mensa Brasil
Avenida Paulista, 1765
13º andar – Cerqueira César
São Paulo (SP) – CEP 01311-930