

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Marinna Gomes

**USO DE *Nicotiana benthamiana* PARA PRODUÇÃO DO
FRAGMENTO scFvBaP1, UM ANTICORPO ANTAGONISTA A
METALOPROTEINASES DE SERPENTES DO GÊNERO *Bothrops***

Dissertação

Juiz de Fora

2018

MARINNA GOMES

**USO DE *Nicotiana benthamiana* PARA PRODUÇÃO DO
FRAGMENTO scFvBaP1, UM ANTICORPO ANTAGONISTA A
METALOPROTEINASES DE SERPENTES DO GÊNERO *Bothrops***

Dissertação de Mestrado do curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Genética e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos

Juiz de Fora

2018

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Gomes, Marinna.

USO DE *Nicotiana benthamiana* PARA PRODUÇÃO DO FRAGMENTO scFvBaP1, UM ANTICORPO ANTAGONISTA A METALOPROTEINASES DE SERPENTES DO GÊNERO *Bothrops* / Marinna Gomes. -- 2018.

79 p. : il.

Orientador: Marcelo de Oliveira Santos

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2018.

1. Biofármacos. 2. *Bothrops*. 3. *Nicotiana benthamiana*. 4. scFvBaP1. I. Santos, Marcelo de Oliveira, orient. II. Título.

Marinna Gomes

**USO DE *Nicotiana benthamiana* PARA PRODUÇÃO DO FRAGMENTO
scFvBaP1, UM ANTICORPO ANTAGONISTA A METALOPROTEINASES DE
SERPENTES DO GÊNERO *Bothrops***

Aprovada em:

21 de fevereiro

de 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos
UFJF

Prof^a Dr^a María Alejandra Alvarez
Universidad Maimónides

Prof^a. Dr^a Jacy Gameiro
UFJF

Dr. Leonardo Ramos Quellis (suplente)
UFJF

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais, a quem dedico mais essa conquista, agradeço por todo o esforço realizado; por todo o apoio nos momentos mais difíceis; por despertarem em mim a vontade de crescer; por abrirem mão dos seus sonhos em busca dos meus e por caminharem comigo ao longo de todo o percurso.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Santos, pela oportunidade; orientação, na vida e na ciência; por ter confiado a mim este trabalho; por ser um grande exemplo de pesquisador e pela amizade construída.

Às Prof^a. Dra. Alejandra Alvarez e Prof^a. Dra. Juciane Castro pelas orientações; ensinamentos; experiências compartilhadas e contribuição ao longo do trabalho.

Aos pesquisadores do Instituto Butantan por me receberem tão bem; pela contribuição para os experimentos; pelas toxinas gentilmente cedidas e pela parceria.

Ao Dr. Leonardo Quellis, por todos os ensinamentos; por compartilhar toda sua experiência ao longo de todos esses anos, desde a minha primeira Iniciação e por ser um grande amigo.

Aos amigos do Laboratório de Genética e Biotecnologia – UFJF, pela convivência nesses anos; por todo o carinho e intercâmbio de conhecimentos. Em especial às amigas Elisandra e Laura, pela amizade dentro e fora da pesquisa; por dividirem os momentos de alegria e os de desespero e por tornarem mais leve essa caminhada.

Aos professores do programa de pós-graduação em ciências biológicas, em especial ao Prof. Dr. Raul García *in memoriam* por ter sido um exemplo de professor

e pesquisador; por estar sempre presente, empolgado com nossos experimentos e sempre nos dando força.

Às minhas queridas irmãs, pelo incentivo e carinho de sempre; por estarem sempre na torcida, sonhando comigo os meus sonhos; por compreenderem as minhas ausências quando elas precisam e por todo o amor de sempre.

Ao Lucas, quem dividiu comigo os melhores e os piores momentos, por estar comigo desde o início me apoiando e incentivando; por toda a compreensão; pelo carinho e paciência; pelos experimentos nos fins de semana; pela dedicação e amor de sempre.

Aos meus amigos, os da vida e os que a universidade me deu, pelo apoio; incentivo; carinho; por compreenderem as ausências e impaciências, e por dividir comigo as conquistas e as angústias.

Aos meus familiares pelo carinho; incentivo e torcida sempre. Cada um que contribuiu de certa forma ao longo de todo esse tempo.

À CAPES pelo suporte financeiro para o desenvolvimento da pesquisa e pela bolsa concedida.

A todos, o meu muito obrigada!

“A ignorância gera mais frequentemente confiança do que o conhecimento: são os que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que afirmam de uma forma tão categórica que este ou aquele problema nunca será resolvido pela ciência.”

Charles Darwin

RESUMO

Acidentes ofídicos representam um grave problema de saúde pública devido a sua alta incidência e a gravidade dos seus efeitos. No Brasil, o gênero *Bothrops* é responsável por 85% dos casos de acidentes. A principal forma de tratamento para tais acidentes é feita através da soroterapia, utilizando-se anticorpos eqüinos, porém os mesmos não são capazes de neutralizar os efeitos sistêmicos do envenenamento e podem causar reações adversas. Uma nova perspectiva para o tratamento de acidentes ofídicos é a utilização de anticorpos recombinantes, mais precisamente a porção scFv. O fragmento scFvBap1 é oriundo de um anticorpo monoclonal, produzido em *Escherichia coli* foi capaz de neutralizar os efeitos hemorrágicos do envenenamento. Atualmente as plantas vêm sendo amplamente utilizadas na produção de proteínas recombinantes de interesse farmacêutico. Neste estudo, objetivou-se a expressão do fragmento scFv em *Nicotiana benthamiana*, a fim de avaliar seu potencial para ser utilizado como soro antiofídico. Foram avaliadas a expressão transiente do fragmento scFvBap1 em folhas de *N. benthamiana*, bem como a expressão estável na mesma planta. Os fragmentos produzidos foram capazes de reconhecer e neutralizar as toxinas BaP1 de *B. asper*, BnP1 de *B. newidae* e ATX de *B. atrox*, demonstrando seu potencial para ser utilizado na terapia contra envenenamentos ofídicos. O sistema de produção estável apresentou-se maior rendimento de proteínas (270 µg/g) quando comparado ao sistema de produção transiente (43 µg/g). Por fim, o sistema mostrou-se uma ótima alternativa para produção do fragmento de anticorpo quando comparado ao sistema bacteriano.

Palavras chave: Biofármacos. *Bothrops*. *Nicotiana benthamiana*. scFvBaP1.

ABSTRACT

Ophidian accidents are a global health problem due to its high incidence and gravity of its effects. In Brazil, the genus *Bothrops* is responsible for 85% of the cases of accidents. The main form of treatment for snake envenoming is serum therapy using equine antibodies, however, they are not able to neutralize the local effects of the toxin and may also cause adverse reactions. A new perspective for the treatment of snakebite envenoming has emerged with the use of recombinant antibodies, particularly the Fv fragment (scFv). The scFvBap1, is an efficient antibody capable of neutralizing the hemorrhagic effects and proteolytic activity caused by metalloproteinases. Currently the plants have been widely used in the production of recombinant proteins of pharmaceutical interest. In this study, we aimed the expression of the scFv fragment in *Nicotiana benthamiana*, in order to evaluate its potential as an antiophiidic serum. The transient expression of the scFvBap1 fragment in leaves of *N. benthamiana*, as well as the stable expression in the same plant, were evaluated. The fragments produced were able to recognize and neutralize the toxins BaP1 from *B. asper*, BnP1 from *B. newidae* and ATX from *B. atrox*, demonstrating their potential to be used in therapy against ophidian poisoning. The stable production system presented higher protein yield (270 µg / g) when compared to the transient production system (43 µg / g). Finally, the system proved to be a good alternative for producing the antibody fragment when compared to the bacterial system.

Keywords: Biopharmaceuticals. *Bothrops*. *Nicotiana benthamiana*. scFvBaP1.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Cassete de expressão – clonagem fragmento scFvBaP1.....	34
Figura 2 - Inserção do fragmento scFvBaP1 no vetor de expressão pK7WG2DGFP.....	45
Figura 3- Expressão transiente do gene repórter GFP.....	46
Figura 4 – Imunoensaio Dot Blotting.....	47
Figura 5 – Planta transgênica (P4) em meio de seleção.....	48
Figura 6 – Confirmação da inserção do gene scFvBaP1 em <i>N. benthamiana</i>	48
Figura 7 – Detecção da expressão do fragmento scFvBaP1 por Western Blotting.....	49
Figura 8- Concentração de proteínas (mg/ml) eluidas em cada fração do gradiente de imidazol (mM).....	50
Figura 9- Análise estatística comparando a produção de proteínas na presença e ausência do supressor de silenciamento.....	51
Figura 10 - Detecção do fragmento scFvBaP1 – amostras purificadas expressão transiente.....	51
Figura 11- SDS PAGE 10% azul de coomassie – Fragmento scFvBaP1 purificado.....	53

Figura 12- Comparação entre o rendimento de produção de proteínas (mg/g peso fresco) entre os sistemas utilizados.....	53
Figura 13 – Rendimento de produção expressão transiente VS transformação estável.....	54
Figura 14- Rendimento de produção precipitado VS sobrenadante....	55
Figura 15 – Reconhecimento das toxinas testadas pelo fragmento scFvBaP1.....	56
Figura 16- Neutralização da atividade fibrinolítica da toxina BaP1- Veneno Total.....	57
Figura 17- Neutralização da atividade fibrinolítica da toxina BnP1.....	58
Figura 18- Neutralização da atividade fibrinolítica da toxina ATX.....	58
Figura 19 – Avaliação da neutralização da atividade fibrinolítica pelo fragmento scFvBaP1 –Toxina BaP1- Veneno total.....	59
Figura 20 – Avaliação da neutralização da atividade fibrinolítica pelo fragmento scFvBaP1 – toxinas BnP1 e ATX.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre alguns dos métodos de obtenção de plantas transgênicas para expressão de proteínas recombinantes.....28

Tabela 2- Comparação entre algumas espécies de plantas utilizadas para produção de proteínas recombinantes.....30

Tabela 3- Rendimento e produtividade do fragmento scFvBap1.....52

LISTA DE ABREVIATURAS

ATTE- *Agrobacterium tumefaciens transient expression*.

CP- *coat protein*

DNA- *deoxyribonucleic acid* – ácido desoxirribonucleico

Fab- *fragment antigen-binding* - Fragmento de ligação ao antígeno

GFP- *green fluorescent protein* – proteína verde fluorescente

LB- Luria- Bertani

mRNA- *messenger RNA* –RNA mensageiro

MS – Murashige e Skoog

ORF – Open reading frame - sequencias abertas de leitura

pH – potencial de hidrogênio

PTGS - *post-transcriptional gene silencing* - silenciamento gênico pós- transcricional

RNA- *ribonucleic acid* – ácido ribonucleico

RNAi- RNA interferente

scFv- *single chain fragment variable* – Fragmento variável de cadeia simples

sgRNA – RNA subgenômico

SVMP – *snake venom metalloproteinase* – Metaloproteinase de veneno de serpentes

TCV-*Turnip crinkle virus*

UV – ultra -violeta

VH- *Variable Heavy* - região variável, cadeia pesada

VL- *Variable Light* - região variável, cadeia leve

SUMÁRIO

Sumário

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 ACIDENTES OFÍDICOS	17
2.2 SOROTERAPIA	20
2.3 BIOFÁRMACOS E PROTEÍNAS TERAPÊUTICAS	22
2.4 SISTEMAS DE EXPRESSÃO	24
2.5 TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS	26
2.5.1 ESPÉCIES DE PLANTAS UTILIZADAS PARA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	29
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 CLONAGEM DO FRAGMENTO scFvBaP1	33
4.2 EXPRESSÃO TRANSIENTE	34
4.2.1 MATERIAL VEGETAL	34
4.2.2 AGROILFILTRAÇÃO	35
4.2.3 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	35
4.2.4 DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS	36
4.2.5 DOT – BLOTTING	36
4.3 TRANSFORMAÇÃO ESTÁVEL	36
4.3.1 EXTRAÇÃO DE DNA	38
4.3.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	38
4.3.3 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	38
4.3.5 INDUÇÃO DE SUSPENSÕES CELULARES	39
4.4 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	39
4.4.1.1 DOSAGEM DE PROTEÍNAS PURIFICADAS	40
4.4.1.2 SDS- PAGE	40
4.4.1.3 WESTERN BLOTTING	40

4.4.2 TRANSFORMAÇÃO ESTÁVEL	41
4.5.1 ELISA	42
4.5.2 ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA	42
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	43
5 RESULTADOS	44
5.1 CLONAGEM DO VETOR DE EXPRESSÃO	44
5.2 EXPRESSÃO TRANSIENTE	45
5.2.1 DOT- BLOTTING	46
5.3 TRANSFORMAÇÃO ESTÁVEL	46
5.3.1 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	47
5.3.2 WESTERN BLOTTING	48
5.4 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	49
5.4.1 EXPRESSÃO TRANSIENTE	49
5.4.2 TRANSFORMAÇÃO ESTÁVEL	51
5.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA	54
5.5.1 ELISA	54
5.5.2 ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA	55
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1 INTRODUÇÃO

Acidentes com serpentes representam um problema de saúde pública, devido a sua alta incidência e a gravidade dos seus efeitos. Eles são considerados um problema negligenciado, devido ao fato de acometerem, em sua grande maioria, populações rurais de países subdesenvolvidos, situados em áreas tropicais como Ásia, África e América Latina (SACHETT et al.,2016; ESTEVÃO-COSTA et al.,2016; CAMACHO et al.,2014).

No Brasil, são reconhecidos nove gêneros de serpentes peçonhentas, sendo as serpentes do gênero *Bothrops* responsáveis por 85% dos casos de envenenamentos relatados (FENWICK et al., 2009; DELGADO et al.,2017).

As serpentes do gênero *Bothrops* compreendem cerca de 30 espécies, e são amplamente distribuídas ao longo de todo o país (PINHO; PEREIRA, 2001). Seu envenenamento é caracterizado, dentre outras manifestações clínicas, por mionecrose, hemorragia, edema, dermonecrose e formação de bolhas (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000). A atividade hemorrágica do veneno se deve à ação das metaloproteinases, enzimas zinco dependentes, capazes de hidrolisar a membrana basal dos vasos sanguíneos, levando a sua ruptura (DE TONI et al., 2015).

A soroterapia é a única forma de tratamento utilizada contra acidentes ofídicos, sendo baseada na administração de anticorpos purificados, produzidos em animais hipersensibilizados com o veneno da serpente, comumente equinos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012). Uma alternativa ao tratamento convencional é a utilização de anticorpos monoclonais recombinantes, mais precisamente o fragmento variável (scFv) (ZHANG et al., 2014). O scFvBaP1 é um fragmento scFv recombinante, proposto por Castro e colaboradores (2014), obtido através de clones de hibridomas (FERNANDES et al., 2010). O fragmento se mostrou capaz de reconhecer a toxina Bap1, presente no veneno de *Bothrops asper* e neutralizar suas propriedades hemorrágica, fibrinolítica, miotóxica e pró-inflamatória (CASTRO et al., 2014).

Dentre os sistemas de produção de proteínas de interesse farmacêutico,

destaca-se a utilização de sistemas vegetais (FISHER et al., 2004). Quando comparadas a outros sistemas de produção de proteínas recombinantes, as plantas se destacam por apresentarem algumas vantagens, como a fácil manipulação genética, alta biomassa, realização de modificações pós traducionais, baixo custo de produção, e possibilidade de escalonamento de produção através da utilização de biorreatores industriais (XU et al., 2011; MOUSSAVOU et al., 2015).

Neste panorama, o objetivo deste trabalho foi a produção do fragmento scFvBaP1, utilizando-se a espécie *Nicotiana benthamiana*, como reator vegetal e também a avaliação da sua atividade biológica frente as toxinas BaP1 de *B. asper*, Bnp1 de *B. neuwiedi* e uma metaloproteinase (ATX) isolada do veneno de *B. atrox*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ACIDENTES OFÍDICOS

Acidentes com serpentes representam um problema de saúde pública, devido a sua alta incidência e a gravidade dos seus efeitos. Podem ser encaixados no quadro de problemas negligenciados devido ao fato de ocorrerem, em sua grande maioria, em áreas rurais de países pobres ou em desenvolvimento, situados principalmente em regiões tropicais como Ásia, África e América Latina. Anualmente, são relatados no Brasil, cerca de 20.000 casos de envenenamento, sendo eles mais frequentes na região Amazônica, porém acredita-se que um grande número de casos de acidentes não seja reportado, devido à dificuldade de acessibilidade à saúde que ocorre em algumas comunidades (SACHETT et al.,2016; ESTEVÃO-COSTA et al.,2016; CAMACHO et al.,2014).

No Brasil, são reconhecidos nove gêneros de serpentes peçonhentas: *Bothrops*, *Bothropoides*, *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Rhinocerothis*, *Crotalus*, *Lachesis*, *Leptomicrurus* e *Micrurus* (FENWICK et al., 2009). Os casos mais graves de envenenamento são causados por espécies da família *Viperidae*, gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, sendo que as serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por 85% dos casos de acidentes (DELGADO et al.,2017).

As serpentes do gênero *Bothrops* compreendem cerca de 30 espécies, e são amplamente distribuídas ao longo de todo o país. Como características morfológicas, apresentam cauda lisa, ausência de chocalho e cores variadas, levando-se em consideração a espécie e a região onde se encontram. Popularmente,são denominadas jararaca, jararacuçu, urutu-cruzeiro, jararaca do rabo branco, dentre outras. Quanto aos seus hábitos, são geralmente encontradas em zonas rurais e periferias de grandes cidades, estando preferencialmente emambientes úmidos como matas e áreas cultivadas e locais onde se encontram roedores, uma vez que estes podem ser predados pelas serpentes.Tem hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares (PINHO; PEREIRA, 2001).

Dentre as espécies que compõe o gênero *Bothrops* algumas apresentam relevante importância médica, e isso se deve, principalmente a grande ocorrência de determinada espécie em algumas localidades e também as consequências desencadeadas pelo seu envenenamento. Neste panorama, podem ser destacadas as espécies *Bothrops asper*, *Bothrops atrox* e *Bothrops neuwiedi* (GOIS et al., 2017).

Bothrops asper, popularmente conhecida por Terciopelo, é uma espécie amplamente distribuída ao longo da América Central e norte da América do Sul, sendo responsável por grande parte dos casos de acidentes relatados nessas localidades. A espécie é comumente distribuída em ambientes úmidos, porém apresentam alta versatilidade ecológica podendo se adaptar facilmente a condições ambientais diversas, sendo encontradas em florestas primárias, campos agrícolas e próximas a moradias (FARR e LASCANO, 2017; VÉLEZ et al., 2017; ALAPE-GIRÓN et al., 2008).

A grande maioria dos casos de acidentes ofídicos relatados na região Amazônica (~80%), no Brasil e nos demais países, é atribuída a espécie *Bothrops atrox* (Jararaca do norte, Jararaca do rabo branco). A espécie é largamente distribuída ao longo da região, sendo preferencialmente residente de regiões de floresta tropical, no entanto, apresenta grande plasticidade, podendo se localizar em ambientes diversos. Devido a esta capacidade adaptativa, a espécie apresenta grande variedade intra-específica, que pode acarretar uma variação na composição do seu veneno. É considerada uma espécie altamente perigosa, sendo a ela atribuída alta porcentagem de letalidade e ocasionamento de sequelas (MOREIRA et al., 2016; SILVA et al., 2016; SCHNEIDER et al., 2014; NÚÑEZ et al., 2009; GUÉRCIO et al., 2006).

Já na região sul e sudeste do Brasil, grande parte dos casos de envenenamento por serpentes é atribuído a espécie *Bothrops neuwiedi*, conhecida por Urutu ou Jararaquinha, devido ao pequeno comprimento das serpentes desta espécie. São encontradas em regiões de floresta decídua e são consideradas abundantes componentes da fauna local. Por apresentar extensa distribuição ao longo das regiões sudeste e sul do Brasil, e também em países como Uruguai e Argentina, a espécie engloba 12 subespécies que apresentam variações morfológicas pertinentes e também variações em relação aos constituintes e a ação do seu veneno. Os acidentes causados por tais serpentes apresentam grande relevância, e isso se dá primariamente à presença de neurotoxinas e miotoxinas que podem levar um

indivíduo a óbito (HARTMANN; MARQUES e ALMEIDA-SANTOS, 2004; RODRIGUES et al., 2004; IZIDORO et al., 2003).

De modo geral, o envenenamento causado por serpentes do gênero *Bothrops* é caracterizado, dentre outras manifestações clínicas, por grave dano tecidual no local de lesão. A ação do veneno pode desencadear uma série de efeitos danosos, como necrose muscular, hemorragia, edema, dermonecrose, formação de bolhas, desequilíbrio homeostático, grave inflamação, dentre outros (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000).

Na maioria dos casos, os danos ocorrem apenas no local da picada, porém em casos de envenenamento grave, as manifestações podem ocorrer de forma sistêmica. A hemorragia é o efeito mais relevante observado como consequência de envenenamentos ofídicos (OWNBY et al., 1982), não se limitando apenas ao local da picada, mas podendo se difundir para órgãos distantes, como o coração, rins, pulmão e cérebro (ASEGA et al., 2014).

Em alguns casos, os locais das picadas, podem sofrer ação das bactérias residentes na microbiota bucal dos animais, levando a formação de abscessos e outras complicações devido à infecção secundária (SILVA; VILELA; POSSA, 2016). Além disso, o processo inflamatório desencadeia uma resposta mediada pela ativação do sistema complemento e produção de citocinas, o que pode acentuar o dano tecidual local (RUCAVADO et al., 2002).

Os venenos produzidos pelas serpentes são complexas misturas de proteínas, lipídeos, carboidratos e compostos inorgânicos. Dentre as muitas proteínas presentes em sua composição, podemos citar as serino proteinases, fosfolipases A2, enzimas proteolíticas, hialuronidases, lectinas e metaloproteinases (MENALDO et al., 2015).

As metaloproteinases (*Snake Venom Metalloproteinases- SVMPs*) são enzimas zinco-dependentes com potencial hemorrágico. O processo de hemorragia é desencadeado pela hidrólise da membrana basal dos vasos sanguíneos, reduzindo sua estabilidade mecânica, levando assim à ruptura, e também da matriz extracelular, o que leva ao extravasamento do plasma e infiltração leucocitária, resultando em uma resposta inflamatória. Tais enzimas também podem ser consideradas “fatores de difusão”, devido a sua atividade proteolítica que é capaz de facilitar a difusão de outras toxinas na circulação (SOUZA, 2016; DE TONI et al., 2015).

As SVMPs podem ser classificadas em quatro classes, dependendo da composição dos seus domínios: (1) PI- inclui enzimas que possuem apenas o domínio

metaloproteinase; (2) PII- possuem metaloproteinases e um domínio de desintegrinas; (3) PIII- possuem ambos os domínios e um domínio de cisteínas (*high-cysteine*); (4) PIV- enzimas que compreendem todos os domínios anteriores e são ligadas, por pontes de dissulfureto, a uma subunidade de lectina tipo C (WATANABE et al.,2003).

A BaP1 é uma metaloproteinase isolada do veneno de *Bothrops asper*. Possui 202 aminoácidos, resultando em uma conformação de cadeia simples, e peso molecular igual a 22.7 kDa. Em comparação com outras metaloproteinases hemorrágicas, a BaP1 apresenta atividade relativamente baixa, porém ela se destaca por ser um constituinte abundante do veneno de *B. asper*, chegando a corresponder a 10% do peso fresco total. Além da atividade hemorrágica, apresenta também propriedades miotóxicas, dermonecróticas e pró- inflamatórias, sendo que estas são mediadas pela ativação do sistema do complemento (FRASKY, 2000; RUCAVADO; NUÑES; GUTIÉRREZ, 1998; WATANABE, 2003; ALAPE-GIRÓN et al., 2009; RUCAVADO; NUÑES; GUTIÉRREZ, 1998).

A BnP1 é uma proteína análoga à neuwiedase, uma metaloproteinase constituinte do veneno de *Bothrops neuwiedi*. Possui 22kDa e é considerada uma toxina não- hemorrágica; apresenta atividade miotóxica, sendo capaz de degradar fibrinogênio, fibrina, colágeno do tipo 1 e laminina, além de desencadear uma reação inflamatória (RODRIGUES et al.,2000; BALDO et al., 2008; BALDO et al., 2010).

2.2 SOROTERAPIA

Soros antiofídicos são comumente utilizados para neutralizar os efeitos causados pelos envenenamentos (GUTIÉRREZ et al.,2009). A soroterapia é principal alternativa utilizada no tratamento contra o envenenamento por picadas de cobras, sendo baseada na administração de anticorpos purificados, produzidos em animais hipersensibilizados com o veneno da serpente, comumente se utilizam equinos, mas também podem ser utilizados caprinos e ovinos. Os soros consistem em imunoglobulinas, ou fragmentos das mesmas (Fab) extraídos do plasma do animal, e isolados por cromatografia (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012).

A sensibilização do animal pode ser realizada a partir da inoculação do veneno de uma espécie, ou com uma mistura de venenos obtidos a partir de espécies

diferentes. O objetivo dessa imunização é obter altos níveis de anticorpos capazes de reconhecer e neutralizar as toxinas que compõe os venenos, porém, a partir dessa técnica podem ser produzidos anticorpos indesejáveis que não possuem efeito terapêutico esperado, podendo assim, adquirir um potencial alergênico, e, além disso, tais moléculas são capazes apenas de minimizar os danos locais, não tendo ação no combate aos efeitos sistêmicos (FRAUCHES et al., 2013). Outro problema associado à soroterapia é a “doença do soro”, que se trata de uma reação de hipersensibilidade do tipo 3 que ocorre devido aos acúmulos dos complexos antígeno – anticorpo em locais indesejados, como as articulações e os rins. A doença pode se manifestar num período de 4 -15 dias após a administração do soro ou de forma tardia, sendo esse tipo mais frequente em pacientes que fazem uso constante das imunoglobulinas exógenas (HUANG; HUNG; CHEN, 2010; RYAN et al.,2015).

A fim de se minimizar os efeitos colaterais causados pela soroterapia algumas formas alternativas de tratamento vêm sendo utilizadas, como por exemplo, a utilização de anticorpos monoclonais murinos. Tais moléculas são capazes de reconhecer sítios específicos presentes nos antígenos e neutralizar suas propriedades (FERNANDES et al.,2010; FRAUCHES et al.,2013).

Anticorpos monoclonais são imunoglobulinas secretadas por células híbridas, obtidas a partir de um único clone de um linfócito B, fusionado com uma célula com características tumorais, resultando em células híbridas, chamadas hibridomas (KOHLE & MILSTEIN, 1975).

Quando utilizados em humanos, os anticorpos monoclonais podem gerar uma resposta devida à presença de moléculas de origem murina. Com isso, vem se buscado moléculas com baixo potencial alergênico, o que pode ser obtido através da humanização dos anticorpos, onde, geralmente, é realizada uma recombinação entre as porções conservadas humanas e as porções variáveis murinas, por meio de tecnologias como a do DNA recombinante, propiciando uma diminuição das reações adversas e uma melhora na interação antígeno-anticorpo (YUSIBOV; KUSHNIR; STREATFIELD, 2016).

Dentro desta vertente da utilização de moléculas engenheiradas, destacam-se os anticorpos monoclonais recombinantes, mais precisamente o fragmento variável (*Single chain variable fragment- scFv*). A utilização dos scFvs apresenta algumas vantagens, quando comparado aos sistemas que utilizam porções maiores dos anticorpos (Fab), como a alta especificidade, rápida difusão nos tecidos lesados, baixa

imunogenicidade e fácil eliminação (ZHANG et al., 2014; LEE et al., 2016). Estes anticorpos apresentam os domínios VL e VH, unidos por um polipeptídeo flexível, (G4S)₃, por uma ponte dissulfídica (dsFv) ou ambos (sc-dsFv) (WORN; PLUCKTHUN, 2001).

Quando o anticorpo monoclonal de especificidade desejada já é conhecido, os fragmentos scFvs podem ser adquiridos a partir do mRNA, isolado dos hibridomas (AZZAZY; HIGHSMITH, 2002). Um fragmento scFv de anticorpo monoclonal recombinante anti-Bap1, foi produzido por Castro e colaboradores (2014), e expresso em *Escherichia coli*. O fragmento foi construído a partir de um anticorpo monoclonal contra a toxina Bap1 (MABap1), secretado por um clone de hibridoma (FERNANDES et al., 2010).

O fragmento foi capaz de reconhecer a toxina BaP1, e também de neutralizar as suas propriedades fibrinolítica, hemorrágica, miotóxica e pró-inflamatória. Além disso, demonstrou efeito similar contra a toxina BnP1 de *B. neuwiedi*, demonstrando assim, que o fragmento possui eficiência e tem potencial para ser utilizado na terapia contra acidentes ofídicos (CASTRO et al., 2014).

Por se tratar de um fragmento construído por meio de técnicas de engenharia genética, e por sua aplicação terapêutica o fragmento scFvBaP1 (CASTRO et al., 2014) pode ser considerado um biofármaco.

2.3 BIOFÁRMACOS E PROTEÍNAS TERAPÊUTICAS

As proteínas terapêuticas são aquelas obtidas por extração direta de uma fonte como exemplo, a insulina extraída do tecido pancreático de animais e os fatores de coagulação sanguínea extraídos diretamente do sangue. Já os biofármacos podem ser definidos como uma proteína ou fármaco baseado em ácido nucléico, utilizado para fins terapêuticos ou para fins de diagnóstico in vivo, e que é produzido por processos que não utilizam etapa de extração direta de uma fonte biológica (WALSH, 2002).

Os primeiros produtos biotecnológicos disponibilizados para comércio, provenientes de DNA recombinante, consistiam em produtos de interesse farmacêuticos como insulina, interferons, eritropoietina e o hormônio do crescimento

(PORRO et al., 2011). Sendo que a insulina humana recombinante foi o primeiro medicamento biológico produzido pela engenharia genética, autorizado para comercialização, em 1982, nos Estados Unidos (CARDOSO, 2013).

Devido à alta especificidade, a utilização de proteínas e peptídeos como moléculas terapêuticas, é de suma importância no tratamento de várias doenças, e, além disso, apresentam atividade em concentrações relativamente baixas, quando comparadas aos fármacos convencionais. Desde o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, nos anos de 1980, o número de novas moléculas de origem biotecnológico estudadas vem crescendo grandemente (MELO, 2010).

As primeiras proteínas terapêuticas aprovadas para uso na medicina se tratavam de proteínas de reposição, ou seja, aquelas que os indivíduos não expressavam ou apresentavam carência (ex. insulina recombinante e fatores sanguíneos). Desde a década de 90, tem-se observado um aumento progressivo dos biofármacos desenvolvidos, muitos deles apresentam modificações estruturais a fim de se alterar as propriedades das proteínas, tais como a eficácia, a estabilidade, a especificidade, a imunogenicidade e a farmacocinética, buscando assim, a melhoria terapêutica (BUCKEL, 1996).

Muitas proteínas terapêuticas apresentam estrutura química complexa. Deste modo, as modificações pós-traducionais são geralmente necessárias na síntese dessas moléculas. A modificação mais comumente realizada é a glicosilação, esse processo requer grandes etapas de processamento, que são realizadas no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi. Essas modificações são realizadas pelas células eucarióticas, tornando-as mais propícias a serem utilizadas como sistema de produção de medicamentos biológicos (MADEIRA, 2013).

Devido às altas técnicas de aprimoramento das moléculas, atualmente, os biofármacos são utilizados no tratamento de várias de doenças, tais como o câncer e doenças auto-imunes. Apesar de possuírem inúmeras vantagens frente aos fármacos químicos, os processos de obtenção dos biofármacos são processos altamente minuciosos, fazendo com que tais produtos adquiram um alto valor comercial o que pode dificultar o seu comércio e distribuição para a população de forma mais homogênea. Deste modo, é necessário se buscar sistemas de produção adequados a fim de se produzir tais moléculas com eficácia e em baixo custo (HERNANS et al., 2017; VELAGA et al., 2017; MEHTA et al., 2017).

2.4 SISTEMAS DE EXPRESSÃO

Define-se como sistema de expressão o conjunto formado por um vetor de expressão e uma célula hospedeira. Onde o vetor é uma molécula de DNA ou RNA, capaz de carrear um ácido nucléico exógeno e introduzi-lo no hospedeiro. Já o hospedeiro, deve ser capaz de reproduzir o material genético exógeno, e expressá-lo a fim de se obter o produto de interesse (MARQUES, 2005).

Visando a melhor produção da proteína de interesse, um sistema de expressão deve ser escolhido mediante alguns critérios. O sistema deve possibilitar o controle e monitoramento das condições de produção; deve se expressar a proteína de interesse respeitando suas necessidades, tais como as glicosilações; deve ser capaz de obter um alto rendimento com baixos custos de produção, dentre outros. Além disso, a fisiologia da célula hospedeira deve ser bem conhecida, a fim de esclarecer, por exemplo, o local de armazenamento da proteína produzida (GOMÉZ et al., 2016; KRAUSE; NEUBAUER; NEUBAUER, 2016; ZHANG; SUN; MA, 2017).

As bactérias são usualmente utilizadas como sistema de expressão de proteínas recombinantes, sendo os organismos pioneiros para tal função (SCHLEGEL; GENEVAUX; GIER, 2017).

O sistema possui características vantajosas em relação a outros, devido a sua fácil manipulação de genes, genética e fisiologia bem conhecidas, alto rendimento de proteínas produzidas em pequenas quantidades de meio de cultura, rápida taxa reprodutiva, fácil manejo em laboratório e baixo custo (MOUSSAVOU et al., 2015).

Porém, não são capazes de produzir proteínas com altos níveis de complexidade, devido ao fato de não realizarem modificações pós-traducionais. Além disso, apresentam outra desvantagem que é a formação de corpos de inclusão, que se tratam de agregados de proteínas acumulados intracelularmente, dificultando o processo de purificação do produto (PANDA, 2003).

Por outro lado, as leveduras, por serem organismos eucariotos, apresentam grande potencial como sistema de produção de proteínas recombinantes. Apresentam grande densidade celular, sendo capazes de se reproduzir em meio de cultura simples e barato; secretam as proteínas para o meio extracelular, facilitando sua purificação; realizam as devidas modificações pós-traducionais e não produzem endotoxinas. No entanto, devido a processos fermentativos, podem produzir em baixa escala a

proteína de interesse e gerar contaminantes oriundos do metabolismo secundário (PARK et al., 2006; WANG; HUANG; NIELSON, 2017).

Os sistemas de expressão baseados em células de mamíferos são os mais adequados, por se tratarem de células eucarióticas fisiologicamente similares às células humanas, são amplamente utilizadas para a produção de proteínas terapêuticas. Além disso, realizam as modificações pós-traducionais necessárias. Porém é um sistema desvantajoso devido aos custos elevados da cultura de células de mamíferos; a instabilidade, onde as modificações das condições de cultura, como pH, temperatura, concentração de CO₂ podem influenciar na produção da proteína de interesse; e por apresentarem baixa velocidade de crescimento e baixas taxas de produção (MADEIRA, 2013; EIBL et al., 2009; GIFRE et al., 2017).

Todavia, uma nova plataforma de produção de proteínas de interesse farmacêutico, é a utilização de sistemas vegetais. Essa aplicação, dentro da biotecnologia, pode ser chamada de “molecular pharming” e consiste na produção de proteínas recombinantes utilizando a maquinaria de reatores vegetais (FISCHER et al., 2004; GHAG et al., 2017).

O potencial das plantas como sistema para produção de fármacos recombinantes foi estabelecido entre 1986 e 1990 com o sucesso da expressão da proteína de fusão do hormônio de crescimento humano, de um interferon e da albumina sérica humana (BARTA et al., 1986). Logo após outro avanço crucial foi a expressão de anticorpos humanos em plantas transgênicas em 1989 (HIATT et al., 1989) e 1990 (DÜRING et al., 1990). Esses trabalhos foram essenciais para elucidar a capacidade das plantas produzirem proteínas complexas de forma correta, segura, barata e em grande escala (FISCHER et al., 2004; SINGHABAHU; HEFFERON; MAKHZOUM, 2016).

Quando comparadas a outros sistemas de expressão, as plantas apresentam grandes vantagens, das quais podemos ressaltar um baixo custo de produção, devido à sua alta biomassa e fácil manejo; são capazes de produzir e acumular moléculas complexas, como anticorpos monoclonais; promovem modificações pós-traducionais; são semelhantes às células animais, de acordo com a sua maquinaria proteica e, além disso, podem ser facilmente manipuláveis geneticamente (MOUSSAVOU et al., 2015; XU et al., 2011).

As plantas transgênicas requerem algumas práticas de cultivo, que são associadas visando à melhor produção de proteínas recombinantes. Tais condições

são denominadas “good manufacturing practices”, e englobam as condições específicas necessárias para se cultivar tais organismos, como temperatura e luminosidade adequadas (TIWARI et al., 2009; JHA et al., 2016).

Outro fator relevante que determinam a viabilidade comercial de um medicamento biológico produzido em plantas transgênicas é a taxa de expressão, ou seja, o rendimento de proteínas obtidas, e esse fator é determinado pela espécie de planta utilizada, da construção do cassete de expressão e do tipo de transformação utilizado para transgenia (TWYMAN et al., 2003; TSCHOFEN et al., 2016).

2.5 TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS

Dentre as técnicas empregadas para transformação de plantas transgênicas, e obtenção da proteína de interesse, destacam-se basicamente as técnicas de transformação transiente e a transformação estável, que visa a integração do gene de interesse ao genoma do indivíduo.

Os primeiros biofármacos recombinantes oriundos de plantas foram produzidos por transformação nuclear e regeneração das linhagens transgênicas (FISCHER et al., 2004). A transformação nuclear consiste na integração do gene exógeno no genoma da planta hospedeira, possibilitando a transmissão do mesmo para a progênie, resultando assim, em uma expressão estável (SHARMA; NEMA; SHARMA, 2009).

Os principais métodos utilizados para a transformação estável de plantas são a transformação mediada por *Agrobacterium*, a qual utiliza o mecanismo natural de transferência de genes de *Agrobacterium tumefaciens*, para as plantas e a biobalística, na qual microprojéteis revestido pelo DNA de interesse são acelerados sobre o tecido vegetal. Também pode-se utilizar a transferência por eletroporação e a microinjeção de DNA (BRASILEIRO; CARNEIRO, 1998).

O uso de plantas transgênicas, como qualquer outro sistema de produção, apresenta vantagens e desvantagens. Dentre as vantagens dessa técnica podemos ressaltar que com uma única transformação podem ser obtidos frutos, sementes e folhas contendo a proteína recombinante desejada; apresentam baixo custo na produção e possibilitam o escalonamento de produção. Porém existem desafios a serem minimizados, como os mecanismos de silenciamento gênico e demora na

padronização de uma linhagem apta à produção comercial (Xu et al., 2012; FISCHER et al., 2012).

Outra grande vantagem deste método de transformação é a obtenção de suspensões celulares. Estas apresentam inúmeras vantagens, das quais se destacam principalmente o total controle das condições de cultura e a possibilidade de escalonamento, ambos com o auxílio de biorreatores (COLLENS; MASON; CURTIS, 2007).

O fato de haver controle das condições e uma produção asséptica, ou seja, livre de contaminantes, faz com que esse método seja o ideal para produção de proteínas de interesse farmacêutico (FISCHER et al., 2004).

As suspensões são constituídas de agregados de células vegetais, cultivadas em meio de cultura contendo hormônios que propicie a proliferação e diferenciação celular. As células são provenientes da degradação de calos friáveis oriundos de plantas transgênicas. Em escalas de produção, assemelham-se as culturas de células de mamíferos e microorganismos, porém apresentam custos menores, quando comparadas aos mesmos (XU et al., 2012).

As proteínas recombinantes produzidas em suspensões são usualmente secretadas para o meio de cultivo, facilitando o processo de purificação, e barateando o processo de produção, uma vez que são eliminadas algumas etapas para obtenção do produto (MAGY et al., 2014).

Diversas espécies podem ser utilizadas para a produção de suspensões celulares, como tabaco, cenoura, arroz, *Arabidopsis thaliana*, soja, alfafa e tomate (YOSHIKAWA, 2016).

Um eficiente sistema de expressão de proteínas em plantas é a denominada expressão transiente, que é considerado como um mecanismo rápido de expressão, pois produz uma quantidade considerável de proteínas em poucos dias (XU et al., 2011).

As técnicas que utilizam o sistema de *A. tumefaciens*, denominadas agroinfiltração, foram desenvolvidas na década de 90 e se baseiam na infiltração (manual ou a vácuo) de uma suspensão contendo a respectiva bactéria nas folhas da planta hospedeira (OMBEBE et al., 2011). Esta técnica também denominada de *Agrobacterium tumefaciens transient expression* (ATTE), é eficiente, pois se baseia na capacidade natural destas bactérias de transferirem uma parte do seu material

genético para a planta hospedeira (CIRCELLI et al., 2010; WANG et al., 2016; VOTJA et al., 2015).

A expressão de genes fora dos cromossomos é também a base de outras técnicas utilizadas para a produção de proteínas, como o “gene gun” e a expressão em protoplastos vegetais (NARASIMHULU et al., 1996; GOMORD et al., 1998).

O sistema de expressão transiente destaca-se por ser capaz de produzir proteínas complexas, como anticorpos, antígenos e enzimas, em um curto período de tempo, sendo eficaz na produção em larga escala em casos de ameaças pandêmicas (PHOOLACHAROEN et al., 2011; OCAMPO et al., 2016).

Dentre as vantagens da técnica incluem a facilidade de manipulação, tempo de obtenção de proteínas, baixo custo, elevado rendimento proteico, escalonamento e controle de produção (CHEBOLU; DANIELL, 2009).

Segundo Ma et al. (2003), a expressão transiente utilizando o sistema de agroinfiltração tem alcançado um alto rendimento devido a otimização dos vetores utilizados. As desvantagens deste sistema, Circelli et al. (2010) apontam o baixo rendimento na produção de proteínas, devido ao mecanismo natural de silenciamento gênico mediado por RNA interferente (RNAi), que é denominado em plantas como silenciamento gênico pós transcricional (PTGS).

O silenciamento gênico pós transcricional (PTGS) é um processo de degradação de RNA mensageiro, que leva a sua eliminação ou perda de função (BAULCOMBE, 2002; JOHANSEN; CARRINGTON, 2001). Esse fenômeno foi primeiramente observado, em estudos utilizando sistemas vegetais.

Os supressores virais de PTGS podem reduzir o silenciamento gênico, aumentando as taxas de expressão da proteína desejada. Os supressores podem estar incorporados no cassete de expressão de alguns vetores binários, ou podem estar em um outro vetor, em outra bactéria, e ser co-infiltrado ao gene de interesse (CIRCELLI et al., 2010).

O *Turnip crinkle virus* (TCV) é um vírus icosaédrico, que possui como material genético RNA fita simples, de sentido positivo de 4kb. É capaz de infectar diversas espécies de plantas. Seu genoma possui cinco sequências abertas de leitura (ORF), sendo algumas necessárias para a replicação do vírus, e outras duas ORFs internas p8 e p9 funcionam como proteínas de movimento e são traduzidas como RNA subgenômico (sgRNA) e também é traduzido durante a replicação viral. Um segundo sgRNA menor, derivado da porção 3' do genoma, serve como mRNA para a proteína

de revestimento viral (*coat protein*- CP). Embora a sua principal função seja estrutural, estudos anteriores demonstraram um importante papel na relação vírus-hospedeiro (HEANTON; LAASKSO, 1995). Qu e colaboradores em 2003 demonstraram que o TCV-CP pode ser utilizado como supressor de silenciamento, uma vez que se mostrou capaz de suprimir RNAs silenciadores em *Nicotiana benthamiana*, aumentando os níveis de expressão do gene GFP quando comparado ao controle.

Tabela 1 - Comparação entre alguns dos métodos de obtenção de plantas transgênicas para expressão de proteínas recombinantes

Sistema	Vantagens	Desvantagens
Transformação estável	Rendimento, estabelecimento de linhagens permanentes.	Tempo de produção, regulamentação
Agroinfiltração	Tempo de produção, baixa toxicidade, direcionamento da proteína para local específico.	Silenciamento gênico
Suspensões celulares	Escalonamento, livre de contaminantes, secreção da proteína para o meio de cultura (purificação), regulamentação.	Custo

Fonte: Adaptado de Fischer et al., 2004

2.5.1 ESPÉCIES DE PLANTAS UTILIZADAS PARA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Existe uma gama de espécies de plantas que vêm sendo utilizadas como reatores vegetais para produção de proteínas recombinantes. Algumas espécies são preferencialmente utilizadas como o tabaco, arroz, milho, alface, alfafa, trevo e musgo, a escolha do tipo de planta depende principalmente da proteína a ser produzida, bem como sua finalidade (BOEHM, 2007). Os aspectos biológicos relacionados à planta também deve ser um fator relevante na escolha da espécie a ser utilizada, como por exemplo: seu ciclo de vida, o rendimento relacionado à biomassa, fatores geográficos, acúmulo e qualidade na produção da proteína recombinante (SHARMA; NEMA; SHARMA, 2009).

O tabaco é um alotetraplóide natural, formado pela hibridização entre dois progenitores diplóides ($2n=24$), *N. sylvestris* e *N. tomentosiformis*. O gênero *Nicotiana* (família Solanaceae: Linnaeus 1753) possui 76 espécies, sendo elas amplamente distribuídas ao longo da América do Sul e Austrália (OKAMURO; GOLDBERG, 1985).

O tabaco (*Nicotiana sp.*) têm se mostrado como um sistema bem-sucedido de expressão de proteínas recombinantes, e, por esse motivo, vêm sendo amplamente utilizado quando o objetivo é se produzir medicamentos biológicos em escalas comerciais (MENASSA et al., 2012). Esse fato se deve à tecnologia bem estabelecida de transferência e expressão de genes, alta produção de biomassa, potencial de aumento da massa devido à produção de sementes férteis e disponibilidade de infraestrutura de processamento em larga escala, além de não se tratar de uma espécie utilizada para alimentação (MA et al., 2003; TWYMAN et al., 2003; MENASSA et al., 2012).

Porém, um desafio a ser minimizado é a alta concentração de alcaloides produzidos pela espécie, que influenciam na expressão de proteínas recombinantes, podendo levar a sua degradação; no entanto há cultivares com baixa produção desses metabólitos e que apresentam potencial para a produção de proteínas de interesse farmacêutico, tais como a *Nicotiana benthamiana* (TWYMAN et al., 2003).

Tabela 2- Comparação entre algumas espécies de plantas utilizadas para produção de proteínas recombinantes

Espécies	Vantagens	Desvantagens	Referência
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Facilidade de transformação genética	Baixa biomassa	Yoshikawa, 2016
Tabaco	Alto rendimento, alta biomassa, transformação genética bem estabelecida, não utilizado para alimentação humana	Presença de alcaloides	Ocampo et al., 2016; Stoger et al., 2014
Alface	Alta biomassa, métodos de transformação bem estabelecidos	Baixa estabilidade protéica	Chen et al., 2016

Arroz	Estabilidade protéica, fácil transformação e manipulação	Armazenamento de proteínas nas sementes (purificação)	Nam et al.,2017; Yang et al.,2014
Soja	Alta biomassa	Armazenamento de proteínas nas sementes (purificação)	Cunha et al.,2013

Fonte: Elaborado pelo autor

Visto que os acidentes ofídicos representam um problema de saúde pública relevante, a incidência dos envenenamentos ocasionados por serpentes do gênero *Bothrops* e a precariedade da forma de tratamento atualmente utilizada, torna-se necessário a busca por formas alternativas de tratamento visando-se minimizar os efeitos colaterais do mesmo. Atualmente, com a crescente vertente dos biofármacos, as terapias que se baseiam na administração de tais moléculas vêm ganhando destaque entre as pesquisas da área de biotecnologia e se mostrando promissoras quando utilizadas para diferentes finalidades. As plantas transgênicas, quando utilizadas como reatores vegetais, apresentam uma série de vantagens principalmente em relação à qualidade do produto a ser produzido e em relação aos custos de produção, que é um fator determinante dentro da biotecnologia. Deste modo, tornam-se promissores sistemas de produção de biofármacos, abrindo portas para o desenvolvimento de novas formas de terapia visando à produção em larga escala e com minimização dos custos. Desta forma, neste trabalho se buscou, a produção de um fragmento scFv capaz de reconhecer e neutralizar toxinas presentes no veneno de serpentes, em plantas transgênicas a fim de se propor uma terapia a base de moléculas biotecnológicas a ser utilizada em casos de envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Expressão do fragmento scFvBaP1 recombinante em *Nicotina benthamiana* visando a obtenção de uma terapia alternativa em casos de acidentes ofídicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonar o vetor de expressão pK7WG2D-GFP scFvBaP1
- Expressar de forma transiente o fragmento em folhas de *N. benthamiana* pelo método da agroinfiltração
- Obter plantas transgênicas, via *Agrobacterium*, expressando o fragmento scFvBaP1
- Induzir a formação de suspensões celulares a partir das plantas transgênicas
- Obter fragmentos de anticorpos purificados por cromatografia de afinidade
- Avaliar a atividade biológica do fragmento scFvBaP1, verificando sua capacidade de reconhecer e neutralizar as toxinas BaP1, BnP1 e ATX

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CLONAGEM DO FRAGMENTO scFvBaP1

A sequência do fragmento scFvBaP1 (Castro et al, 2014) inicialmente expressa em *E. coli*, foi otimizada para expressão em *Nicotiana benthamiana*, utilizando o site Integrated DNA Technologies (IDT- <https://www.idtdna.com/site>).

O cassete de expressão foi sintetizado, conforme o esquema a baixo, pela IDT Technologies contendo na porção N- terminal um sítio de restrição NcoI e o peptídeo sinal S2, que possui função de direcionar a proteína para o espaço periplasmático ; a sequência scFvBaP1 otimizada para *Nicotiana benthamiana* ; uma tag de Histidina e um sítio de restrição XhoI na porção C- terminal.

```

GTACCACCATGGcgaacaaactgttctgggtgctgcgcgaccttgcgctgtgcttctgctgaccaacgcgGTA
ATTACAAGAATCTGGGCCAGAGCTCGTAAAGCCTGGGGCATCTGTTAATTCTTG
CAAGGCTAGCGGATATACCTTTACTAACTTTGATATAAATTGGGTTAACAACGAC
CTGGACAGGGTCCAGAGTGGATTGGGTGGATCAATCCCAGAGATGTTCAACAA
AGTATAATGAGAAGTTTAAGGGCAAAGCAACACTGACAGTTGATCCCTCATCCA
GTACTGCTTATATGGAGATTCACTCTTTAACAAGTGAAGATTCTGCCGTTTACTTT
TGTGTCCGTTGGGATTTAGTATACTGGGGACAGGGAACACTACCGTAACTGTCAGT
TCTGGTGGAGGGGGTTCTGGAGGCGGTGGTTCCGGTGGAGGTGGCAGTGATA
TTGTGCTTACACAGAGTCCTGCTACTCTTTCCGTGACCCCTGGTGATAGCGTCA
GTCTCAGTTGCAGGGCCAACCAAAGTATTACAAACAATCTACAGTGGTACCAGC
AGAAGAGTCACGGATCCCCCAGGCTTCTGATAAAGTACTCAAGTCAGTCAGTCT
CTGGCATCCCGTCCAGATTTTCAGGCTCTGGCTCAGATACTGATTTTTCACTATC
TATAAACAGTGTTGAGACTGAAGACTTCGGAATGTA CTCTGCCAGCAATCAAAT
TCATGGCCATTTACATTTGGCTCAGGTACCAAGCTTGAAATTAAGAcatcaccatc
accacTGActcgagcc

```

Figura 1 – Cassete de expressão – clonagem fragmento scFvBaP1
amarelo – sítio NcoI. rosa – peptídeo sinal. verde- sequência do scFvBaP1.marrom- cauda de
histidina e azul- sítio XhoI.

Após a síntese, a sequência foi digerida com as enzimas de restrição NcoI e XhoI. Realizou-se então, a ligação do fragmento scFvBaP1 com o vetor de clonagem pENTR4 (Invitrogen). A ligação ocorreu a 4 °C, overnight. O produto de ligação foi inserido em *E. coli Top 10 OneShot*, por eletroporação, e para selecionar a transformação, as células foram plaqueadas em meio LB contendo 50 mg/ L de canamicina.

A Clonagem LR do vetor de expressão foi realizada através da ligação pENTR4 com o vetor de destino PK7WG2D-GFP, na presença da enzima LR clonase (Invitrogen). A reação ocorreu a 25° por 1 hora, e foi interrompida com a adição de proteinase K. Posteriormente, transformamos *E. coli Top 10 OneShot*, com o produto da reação, por eletroporação. E a fim de selecionar as células que receberam o plasmídeo, as células foram plaqueadas em meio LB suplementado com 50 mg/L de espectinomicina. O plasmídeo pK7WG2D-GFP scFvBaP1, foi inserido, por eletroporação (2,5v) em *Agrobacterium tumefaciens* da linhagem GV3101, eletrocompetentes. As células transformadas foram selecionadas com o 50 mg/L de espectinomicina.

4.2 EXPRESSÃO TRANSIENTE

4.2.1 MATERIAL VEGETAL

Sementes de *Nicotiana benthamiana* foram esterilizadas com álcool 70%, 2 % de hipoclorito de sódio e Tween-20. Posteriormente foram colocadas em frascos tipo magenta® contendo meio MS (meio MS basal 4,4g/L, sacarose 30g/L, ágar 7g/L) para germinação. Após quatro semanas, as plântulas foram transferidas para vasos com capacidade de 10 kg, contendo terra autoclavada. Foram mantidas em sala de cultura vegetal, com temperatura de 25° C e fotoperíodo de 16hs.

4.2.2 AGROILFILTRAÇÃO

Foi realizado um pré- inoculo a partir de uma colônia de *Agrobacterium GV3101* contendo o plasmídeo pK7WG2D-GFP scFvBap1, em 5 ml de meio LB contendo 50 mg/L Rifamicina, 50 mg/L Gentamicina e 50 mg/L Espectinomicina. O pré- inoculo foi mantido a temperatura de 28°C, sob agitação de 210 rpm por 24hs. Posteriormente, foram transferidos 100 µl de suspensão bacteriana para 7,5ml de meio LB contendo 10mM MES, 20 µM de Acetoseríngona e os devidos antibióticos em pH= 5,6. O inoculo foi mantido nas mesmas condições também por 24hs. O mesmo procedimento foi realizado com *Agrobacterium EHA101* contendo o plasmídeo pPZP212 contendo o anti-silenciador TCV-CP (*capisid protein from Turnip Crinkle Virus*).

As suspensões bacterianas foram centrifugadas a 5.000 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente. O pellet foi então ressuspendido em 20 ml de meio MMA (MS (5 g/l) + MES (1,95 g/l), sacarose (20 g/l), acetoseríngona (200 µM), pH= 5.6. As suspensões foram incubadas em temperatura ambiente, por 3hs sem agitação até que alcançassem O.D₆₀₀ entre 0.4 e 0.8.

Posteriormente, as folhas de *N. benthamiana* foram infiltradas usando seringas de 1 ml, seguindo os seguintes tratamentos: Suspensão bacteriana *Agrobacterium GV3101* pK7WG2DscFvBaP1; Suspensão bacteriana *Agrobacterium GV3101* pK7WG2D-GFP scFvBaP1 + *Agrobacterium EHA101* pPZP212 TCV-CP; e meio MMA como forma de controle, a fim de se avaliar o stress causado pela técnica de infiltração nas plantas.

Foram coletadas folhas de *N. benthamiana* entre os dias 3-9 após a agroinfiltração, e a expressão do gene repórter GFP foi monitorada durante esse período sob iluminação UV a 480nm.

4.2.3 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Folhas de *N. benthamiana* infiltradas com *Agrobacterium* foram inicialmente pesadas. Posteriormente, foram pulverizadas em graal com nitrogênio líquido. O pó foi solubilizado em solução de sacarose (8%) contendo os inibidores de proteases

leupeptina 10 ug/ml e PMSF 1 mM. O sobrenadante recuperado foi armazenado a -20° C.

4.2.4 DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS

A partir do extrato bruto, foi realizada uma dosagem de proteínas totais de acordo com Bradford, (1976). A leitura das amostras foi realizada a 595 nm, em leitor de microplacas Varioskan Flash Thermo Scientific.

4.2.5 DOT – BLOTTING

. Para detecção do fragmento scFvBap1 realizou-se o imunoenensaio Dot-Blotting. À membrana de nitrocelulose foram adicionados 20 µg de proteínas de cada amostra, em forma de pontos. A membrana foi bloqueada com PBS 1x, 0,1% de Tween-20 e 2% de caseína durante 1:30h. Após o bloqueio, adicionou-se o anticorpo primário Anti-His de coelho na proporção de 1:1000 por 1:30h. Posteriormente a esse período a membrana foi lavada em tampão de lavagem (tampão de bloqueio na ausência de caseína) por seis vezes durante 5 minutos cada. Incubou-se a membrana com anticorpo secundário Anti-His peroxidase de coelho por 1:30h. A membrana foi novamente lavada, e posteriormente revelada com a utilização do substrato ECL, em câmara escura (GE Healthcare).

4.3 TRANSFORMAÇÃO ESTÁVEL

Suspensão bacteriana - Foi realizado um inóculo em 5 ml de meio LB, a partir de uma colônia de *Agrobacterium tumefaciens* linhagem GV3101 contendo o plasmídeo pK7WG2D-GFP scFvBaP1, utilizando como forma de seleção, os antibióticos Rifamicina 50 mg/L; Gentamicina 50 mg/L e Espectinomicina 50mg/L. A cultura foi mantida a 28° C, sob agitação de 150 rpm, durante 16h. Utilizou-se a

suspensão com O.D₆₀₀ igual a 0,6, sendo que 1 ml de suspensão bacteriana foi transferido para um tubo estéril de microcentrífuga e, posteriormente centrifugada a 5.000rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e as células ressuspendidas em 1 ml de NaCl 0,85% e 20 µM de Acetoseríngona. Material vegetal – Foram obtidos 100 fragmentos foliares, provenientes de plântulas micropropagadas *in vitro*, com seis semanas de idade. Os explantes, após o corte, foram transferidos para uma placa de Petri contendo 20 ml de meio MS líquido (4,4g/L MS Sigma; 20g/L glicose; pH 5.8), acrescido de 200 µl da suspensão bacteriana, obtida anteriormente, e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente.

Os explantes foram então, transferidos para placas de Petri contendo meio MS sólido (4,4 g/L MS meio basal Sigma; 20 g/L glicose; 7 g/L Agar; pH 5,8), suplementados com 1 mg/L de BAP e 200 mg/L de Timentin. Ficaram incubados por 48h, no escuro, a uma temperatura de 26°C. Após a incubação, os explantes foram lavados em água autoclavada e secos em papel filtro estéril, para remoção do excesso de bactérias. Posteriormente, foram transferidos 10 explantes para cada placa de petri contendo meio MS sólido (4,4 g/L MS meio basal Sigma; 20 g/L glicose; 7 g/L Agar; 50 mg/L Canamicina; pH 5,8), sendo que, o antibiótico foi adicionado a fim de se selecionar as células transformadas. As placas foram mantidas em sala de cultura, com fotoperíodo de 16 h e temperatura igual a 26°C. Foram realizados sucessivos subcultivos no mesmo meio de cultura, a cada 15 dias. Os explantes que sobreviveram à seleção, foram colocados em frascos tipo magenta contendo meio MS sólido (4,4 g/L MS meio basal Sigma; 20 g/L glicose; 7 g/L Agar; 50 mg/L pH 5.8), suplementado com 120 mg/L BAP; 4,8 mg/L ANA e 60 mg/L Canamicina, a fim de promover o desenvolvimento dos brotos e alongação das plântulas transformadas. Novamente, foram realizados sucessivos subcultivos no mesmo meio de cultura, a cada 15 dias (Brasileiro; Carneiro, 1998).

4.3.1 EXTRAÇÃO DE DNA

Foi retirada amostras de aproximadamente 500 ng de cada um dos brotos. Foram então, macerados em tubo de microcentrífugada, e ao macerado adicionou-se 1ml de tampão CTAB (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 100 mM TrisHCl pH 8; 20 mM EDTA; 0,2% β - mercaptoetanol) e 400 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). As amostras foram submetidas a incubação sob agitação, a 55° durante 10 min, e centrifugadas a 12000 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga, e a ele adicionado 1,2 volumes de isopropanol, sendo novamente centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante, e o precipitado foi lavado com 1 ml de álcool 70%. Após a secagem, o precipitado foi eluído em 50 μ l de água ultra-pura. As amostras foram quantificadas em gel de agarose 1% (Brasileiro; Carneiro, 1998).

4.3.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A fim de se confirmar a transformação estável de *N. benthamiana* com o gene scFvBaP1, foi realizada uma reação em cadeia da polimerase, utilizando a enzima *Easy Taq DNA polimerase* (LGC Biotecnologia), de acordo com as recomendações do fabricante. Os *primers* utilizados para amplificação do fragmento foram, respectivamente, F 5' TACCCGGGGATCCTCTAGAG e R 5'CGGCCGCACTAGTGATACA.

4.3.3 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Foi realizada uma extração de proteínas totais, a partir das folhas das plantas transgênicas micropropagadas *in vitro*. A extração de proteínas se deu do mesmo modo relatado no item 4.2.3. A quantidade de proteínas totais foi determinada pelo método proposto por Bradford e colaboradores, (1976).

4.3.4 INDUÇÃO DE CALOS

Explantos foliares provenientes das plantas que se confirmaram transgênicas (P2, P3 e P4), foram colocados em placas de Petri contendo 20 ml de meio MS (MS basal 4,4 g/L; sacarose 30 g/L e Agar 7 g/L) suplementado com 0,5 mg/L 2,4-D e 0,2 mg/L cinetina. Os explantes foram submetidos a sucessivos subcultivos, sendo estes realizados a cada 15 dias ao longo de seis semanas. As placas foram mantidas em sala de crescimento vegetal, com foto período de 16h. Foi realizada uma extração de proteínas totais para análise da expressão do fragmento scFvBaP1.

4.3.5 INDUÇÃO DE SUSPENSÕES CELULARES

Após as seis semanas de cultivo os calos friáveis, induzidos a partir das plantas transgênicas, foram transferidos separadamente para erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml do mesmo meio de cultura utilizado para indução de calos, porém na ausência de ágar. As suspensões foram mantidas em mesa agitadora a 120 rpm, em sala de cultura vegetal com temperatura e luminosidade controladas durante 8 dias. Após esse período o líquido em suspensão foi coletado e posteriormente centrifugado por 10 minutos, a 2000 rpm em centrífuga refrigerada (4° C), sendo as frações (precipitado e sobrenadante) separadas para posterior análise de proteínas.

4.4 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

4.4.1 EXPRESSÃO TRANSIENTE

As proteínas totais do extrato obtido através das folhas infiltradas foram concentradas com a utilização de coluna de concentração Amicon®Ultra da Millipore. As colunas foram centrifugadas a 4,000 rpm, por 30 minutos e a 4° C. Após a centrifugação, o concentrado foi aplicado em coluna HisTrapHP 5ml (GE Healthcare), para purificação do fragmento scFVBap1, por cromatografia de afinidade de acordo com as orientações do fabricante, utilizando-se para eluição um gradiente de concentrações de imidazol (80 mM, 100 mM, 250 mM e 500 mM) pH8.3, a fim de se padronizar a melhor concentração utilizada para obtenção das proteínas purificadas.

4.4.1.1 DOSAGEM DE PROTEÍNAS PURIFICADAS

A dosagem das proteínas purificadas foi realizada, de acordo com o método proposto por Lowry e colaboradores, (1951). A leitura das amostras foi realizada a 595nm, em leitor de microplacas Varioskan Flash Thermo Scientific.

4.4.1.2 SDS- PAGE

Amostras contendo quantidades conhecidas de proteínas, foram adicionadas a igual volume de tampão de amostra (glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5%, SDS 2,3%, Tris-HCl pH 6,8), foram fervidas, suspensas com vortex e aplicadas em gel de poliacrilamida (gel de empilhamento 4%; gel de separação 18%). Após a corrida, o gel foi submetido a eletrotransferência para membrana de nitrocelulose, a 100 v durante 30 min.

4.4.1.3 WESTERN BLOTTING

Após a transferência, incubou-se a membrana com solução bloqueadora (PBS 1x, 3% de caseína, 0,1% Tween-20) por 1h. A membrana foi incubada com anticorpo primário Anti-His de coelho na proporção 1:1000 overnight. Posteriormente a esse

período a membrana foi lavada em tampão de lavagem (tampão de bloqueio na ausência de caseína) por seis vezes durante cinco minutos cada. Incubou-se com anticorpo secundário Anti-His peroxidase de coelho por 1h. Após esse período, a membrana foi novamente lavada nas condições descritas acima e em seguida revelada com a utilização de substrato ECL (kit western blotting, GE Healthcare).

4.4.2 TRANSFORMAÇÃO ESTÁVEL

Após o teste de padronização da concentração de imidazol ideal para eluição do fragmento scFvBap1, foi adotado um tampão de eluição (20 mM de fosfato de sódio; 500 mM de cloreto de sódio) com 500 mM de imidazol. A fim de obter um maior rendimento de proteínas purificadas, evitando que houvesse precipitação das mesmas, também se alterou o pH do tampão de eluição, sendo adotado pH = 6,71 (ponto isoelétrico scFvBap1 = 7,21). A partir disso, foram realizadas outras purificações utilizando as seguintes amostras: 1. extrato total das folhas de plantas transgênicas; 2. extrato total dos calos induzidos a partir das plantas transgênicas; 3. extrato total suspensão celular (precipitado); 4. extrato total suspensão celular (sobrenadante). Para purificação foi utilizada coluna de níquel HisTrapHP 5ml (GE Healthcare) (vide item 4.4.1). A fim de retirar o excesso de imidazol utilizado na eluição, as amostras foram dialisadas utilizando-se as colunas de concentração Amicon®Ultra da Millipore. As colunas foram centrifugadas em centrífuga refrigerada (4°C) por 20 min/4000 rpm. As proteínas purificadas foram armazenadas a 4°C. A concentração de proteínas obtidas, em cada uma das amostras, foi determinada pelo método de dosagem proposto por Lowry e seus colaboradores, (1951).

4.4.2.1 SDS- PAGE

Amostras contendo quantidades conhecidas de proteínas, foram adicionadas a igual volume de tampão de amostra (glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5%, SDS 2,3%, Tris-HCl pH 6,8), foram fervidas, suspensas com vortex e aplicadas em gel de

poliacrilamida (gel de empilhamento 4%; gel de separação 10%). Após a corrida, o gel foi corado com *Coomassie brilliant blue*.

4.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA DO FRAGMENTO scFvBaP1

Para verificação da atividade biológica do fragmento scFvBaP1 foram utilizados, para realização dos devidos experimentos, o veneno total de *B. asper*, a toxina BnP1 de *B. neuwiedi* e uma metaloproteinase (ATX) isolada do veneno de *B. atrox* (dados não publicados). As toxinas foram gentilmente cedidas pelo Instituto Butantan.

4.5.1 ELISA

A fim de se avaliar a especificidade do fragmento scFv foi utilizado o *Enzyme-Linked Immuno Absorbent Assay*-ELISA. Placas de poliestireno foram previamente sensibilizadas com 2 µg/mL de veneno total de *B. asper*, toxina BnP1 de *B. neuwiedi* e toxina ATX de *B. atrox* e posteriormente incubadas a 4°C, overnight. Em seguida foram lavadas 3X com PBS/Tween 0,05% e bloqueadas com BSA 3%, por 2 h a 37°C. As placas foram novamente lavadas com mesma solução, foi então adicionado o fragmento scFvBaP1 (100 µg) e as placas incubadas por 1h a 37°C. A reação antígeno-anticorpo foi detectada utilizando anti-His peroxidase de coelho seguido do substrato *ortho-phenylenediamine* (OPD) e H₂O₂. A reação foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ e a absorbância lida a 492 nm em sistema Varioskan (Thermo ®).

4.5.2 ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA

Para se verificar a atividade biológica do fragmento scFvBap1, além do reconhecimento antígeno-anticorpo (ELISA) foi avaliada a sua capacidade de neutralizar os efeitos das toxinas BaP1 (veneno total), BnP1 e ATX. O teste foi

realizado em placas de fibrina-agarose, de acordo com Jespersen & Astrup (1993), 10 mg de fibrinogênio humano (Calbiochem) (1 mg/mL de proteína coagulável) foram diluídos em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,3 contendo 0,2 M NaCl e 0,05 M CaCl₂. A esta solução foram adicionados trombina bovina (Sigma) na concentração final de 2 U/mL e 10 mL de solução de agarose *low melting* 2 % (AMPRESKO) diluída no mesmo tampão. A mistura foi colocada em uma placa de Petri, e incubada durante 40 min/TA para a formação de rede de fibrina. Após a polimerização foram feitos poços nas placas com auxílio de uma pipeta de 1000 ul. Foram utilizados 5 ug de cada uma das toxinas para aplicação nos poços, e para verificação da neutralização de suas propriedades foram incubadas com scFvBap1 na proporção 20:1 (scFvBap1: toxina) por 15 minutos a 37° C. Após a incubação as amostras foram aplicadas nos poços e incubadas a 37° por 48h. A atividade fibrinolítica das toxinas, bem como a capacidade de neutralização do fragmento scFv será determinada pela aferição da área dos halos formados nos tempos de 24h e 48h.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa Graph Prism 6, utilizando o teste de comparação de médias, adotando nível de confiabilidade $p > 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 CLONAGEM DO VETOR DE EXPRESSÃO

A Clonagem LR do vetor de expressão foi confirmada a partir da realização de uma PCR, utilizando os *primers* F 5' TACCCGGGGATCCTCTAGAG e R 5'CGGCCGCACTAGTGATACA, que flanqueiam a região onde o fragmento scFvBaP1 foi inserido. As bandas se apresentaram na altura esperada, correspondendo ao tamanho do fragmento scFvBaP1 mais a região de flanqueio do plasmídeo (Figura 2).

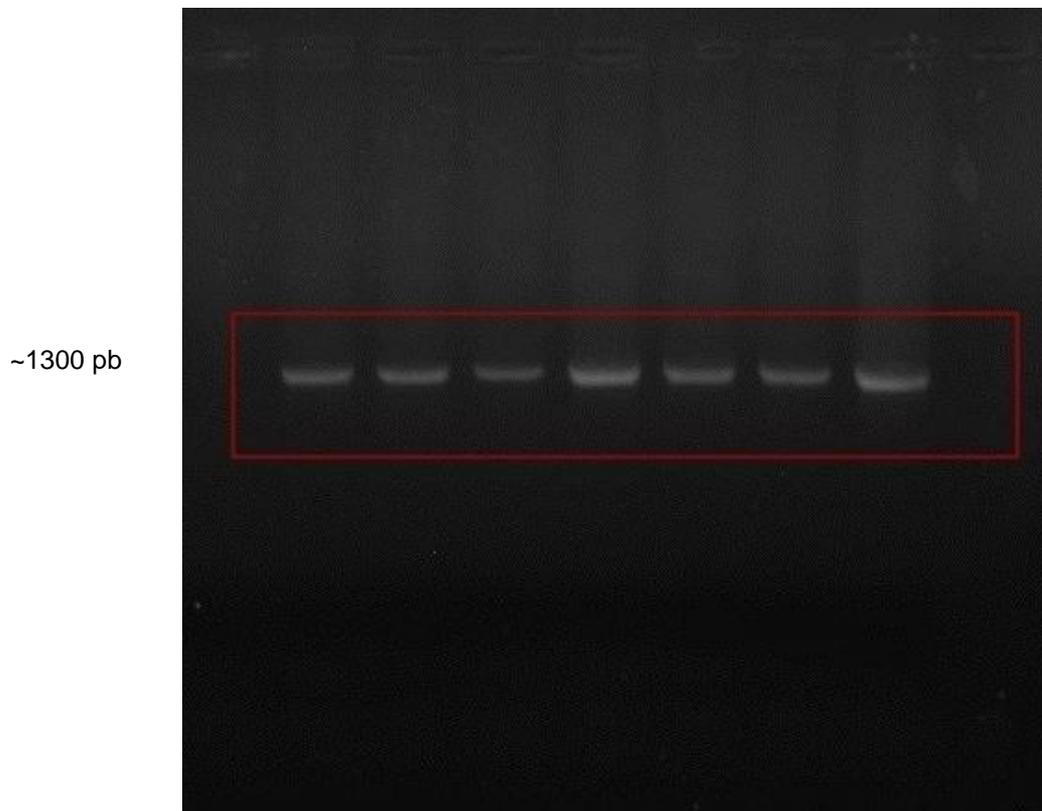


Figura 2 - Inserção do fragmento scFvBaP1 no vetor de expressão pK7WG2D-GFP.
Gel agarose 1%, bandas ~1300 pb

5.2 EXPRESSÃO TRANSIENTE

A expressão do gene *repórter* GFP foi monitorada durante nove dias, sendo somente observada a partir do terceiro dia após o processo de agroinfiltração. Nas folhas infiltradas com o tratamento *Agrobacterium* GV3101 pK7WG2D-GFP scFvBaP1 + *Agrobacterium* EHA101 pPZP212 TCV-CP, observou-se um maior número de células com expressão do GFP (Figura 3).

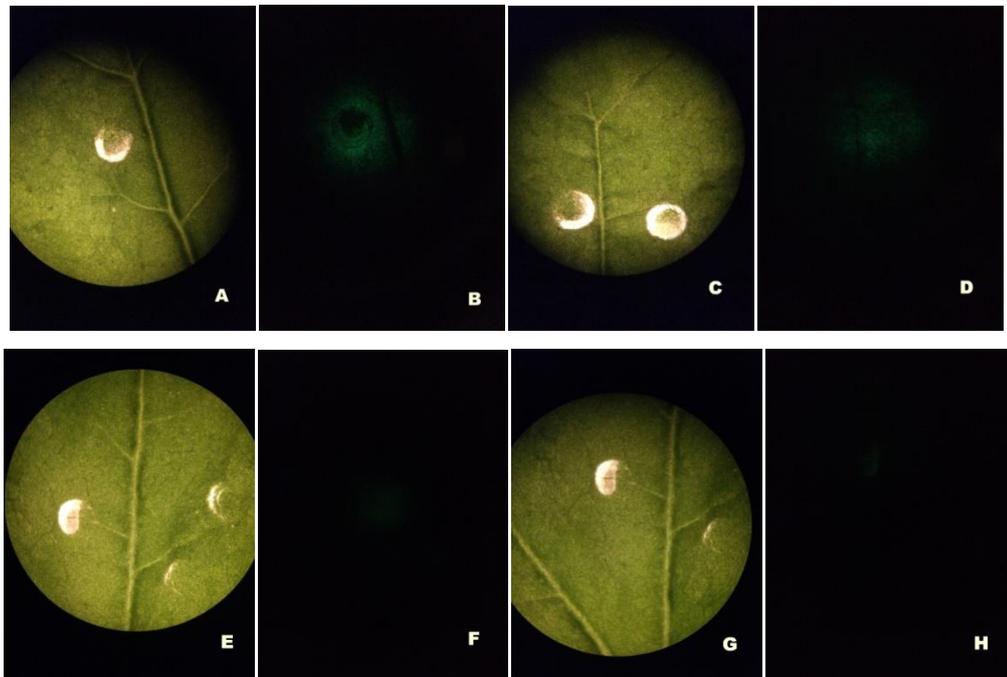


Figura 3- Expressão transiente do gene repórter GFP

A-D. Expressão transiente do gene repórter GFP (scFvBaP1 + TCV-CP).

E-H. Expressão do gene repórter GFP (scFvBaP1)

A - Folha infiltrada 4 em campo claro. B - Expressão do GFP 4 dias pós infiltração sob luz UV. C - Folha infiltrada 9 em campo claro. D - Expressão do GFP 9 dias pós infiltração sob luz UV.. E - Folha infiltrada 4 em campo claro. F - Expressão do GFP 4 dias pós infiltração sob luz UV. G - Folha infiltrada 9 em campo claro. H - Expressão do GFP 9 dias pós infiltração sob luz UV

5.2.1 DOT- BLOTTING

A partir do imunoenensaio Dot-Blotting pode-se confirmar a expressão do fragmento scFvBaP1, no o terceiro dia após a agroinfiltração, confirmando os resultados obtidos na visualização da expressão do GFP. Os pontos indicam a expressão do fragmento scFvBaP1 no extrato bruto de *N. benthamiana*, os controles negativo e positivo, respectivamente, correspondem a folhas de *N. benthamiana* sem infiltração e folhas infiltradas apenas com o tampão de infiltração. Houve expressão em ambos os tratamentos utilizados (presença ou ausência do supressor de silenciamento TCV-CP) (Figura 4).

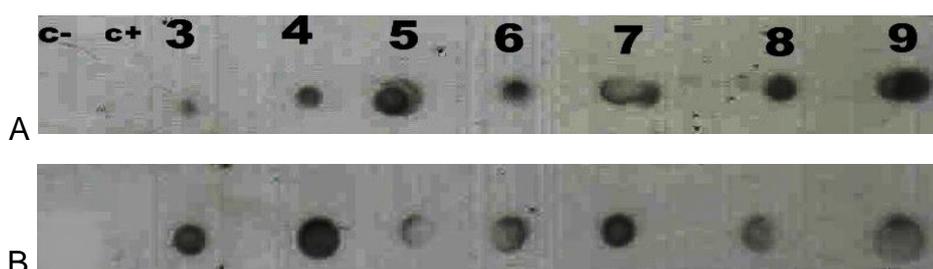


Figura 4 – Imunoensaio Dot Blotting

Detecção da expressão do fragmento scFvBaP1 durante 9 dias pós infiltração.

A. Ausência do anti silenciador. B. Presença do anti silenciador

Fonte: Próprio autor

5.3 TRANSFORMAÇÃO ESTÁVEL

O meio de cultura testado (4,4 g/L MS; 20 g/L glicose; 7 g/L Agar; 50 mg/L pH 5.8, 120 mg/L BAP; 4,8 mg/L ANA e 60 mg/L KAN) se mostrou eficiente para regeneração dos explantes, diferenciação e proliferação celular. Além disso, os explantes foram capazes de se enraizarem resistindo a seleção pela canamicina (60 mg/L), as plantas que cresceram foram submetidas à reação da PCR para confirmar sua natureza transgênica (Figura 5).



Figura 5 – Planta transgênica (P4) em meio de seleção
(meio MS + 60mg/L de canamicina)

Fonte: Próprio autor

5.3.1 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A PCR realizada a partir dos explantes regenerados demonstrou que houve transformação estável de *N. benthamiana*, ou seja, inserção do fragmento scFvBaP1 ao genoma da planta. Foram obtidas três plantas transgênicas (P2,P3 e P4) provenientes de três diferentes explantes do mesmo evento de transformação. As bandas observadas se apresentam no tamanho esperado (~1300 pb) (Figura 6).

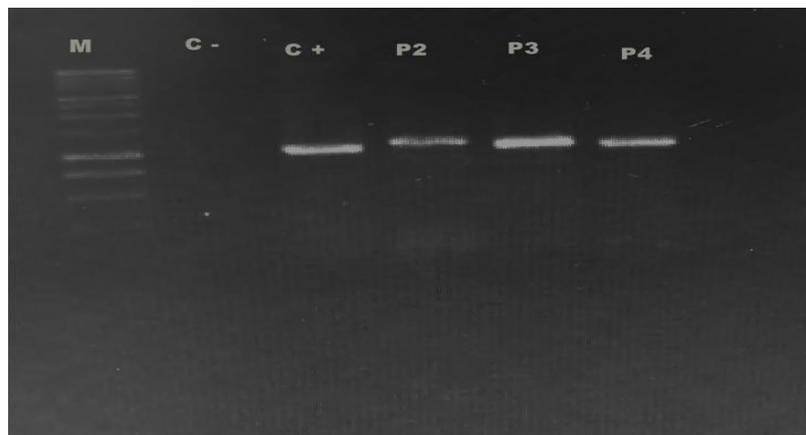


Figura 6 – Confirmação da inserção do gene scFvBaP1 em *N. benthamiana*

Gel agarose 1%- análise da PCR

M. Marcador; C- planta controle; C+ PK7G2DMABap1; P2 planta 2; P3 planta 3; P4 planta 4.

Fonte: Próprio autor

5.3.2 WESTERN BLOTTING

O ensaio realizado a partir do extrato bruto proveniente das plantas transgênicas obtidas (P2, P3 e P4) detectou a expressão do fragmento scFvBaP1 em todas as linhagens testadas. As bandas correspondentes ao fragmento scFvBaP1 se mostraram na altura de ~58 kDa, sugerindo assim, a formação de dímeros durante o processo de eletroforese, uma vez que o fragmento scFvBaP1 possui 29 kDa (Figura 7).

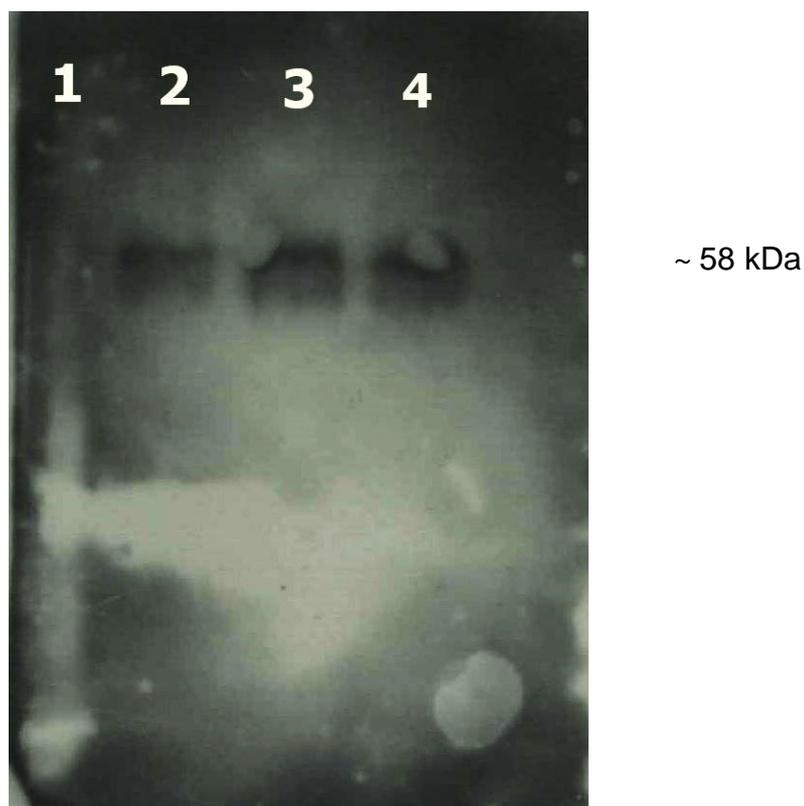


Figura 7 – Detecção da expressão do fragmento scFvBaP1 por Western Blotting

1. Marcador de baixo peso molecular, 2. Planta 2, 3. Planta 3, 4. Planta 4

Fonte: Próprio autor

5.4 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

5.4.1 EXPRESSÃO TRANSIENTE

Após a realização da dosagem das proteínas purificadas verificou-se que em todas as concentrações de imidazol utilizadas houve eluição das proteínas esperadas, porém foram obtidas concentrações diferentes de proteínas em cada uma das variáveis testadas, sendo 500 mM a fração com maior concentração de proteínas. Deste modo, foi padronizada a concentração ideal para eluição do fragmento scFvBap1 e esta passou a ser adotada nas purificações posteriores (Figura 8).

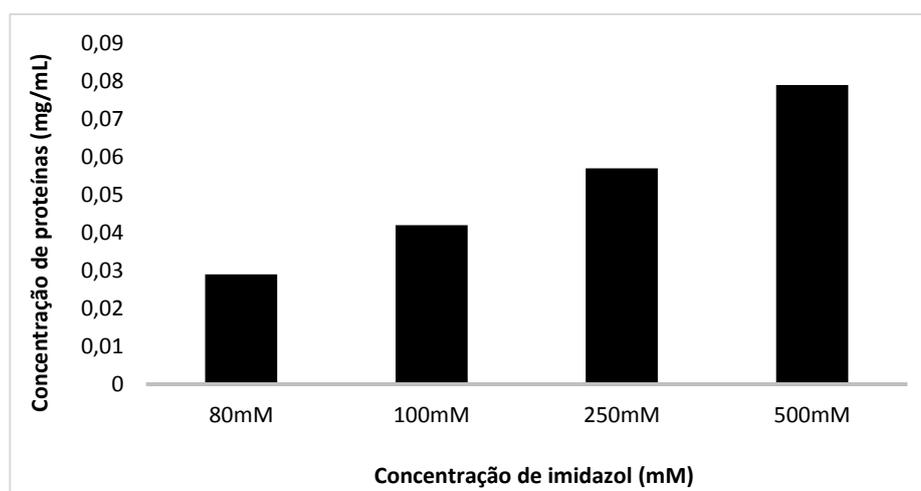


Figura 8- Concentração de proteínas (mg/ml) eluídas em cada fração do gradiente de imidazol (mM)

Fonte: Elaborado pelo autor

O Rendimento total de produção do fragmento scFvBap1 pelo método da agrofiltração foi de 43 $\mu\text{g/g}$ ($\pm 0,7$) de folha fresca agrofiltrada. A análise estatística realizada a partir do rendimento obtido nos dois tratamentos utilizados (presença e ausência do supressor de silenciamento gênico TCV-CP) demonstra que não houve diferença significativa entre eles (Figura 9).

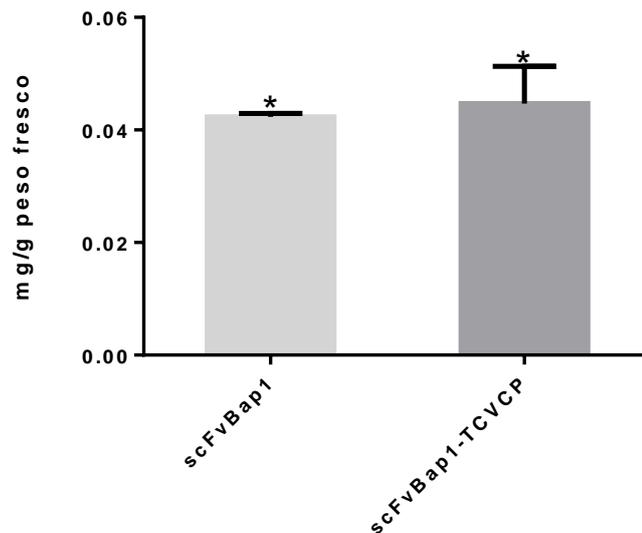


Figura 9- Análise estatística comparando a produção de proteínas na presença e ausência do supressor de silenciamento. Os tratamentos não apresentam diferença estatística, $p < 0,05$

Fonte: Elaborado pelo autor

A análise realizada pela técnica Western Blotting, demonstrou a presença do fragmento scFvBaP1 nas amostras purificadas, apresentando bandas na altura de aproximadamente 58 kDa, comparado ao padrão de peso molecular. Esse resultado sugere que as proteínas estejam dimerizadas, uma vez que o fragmento possui peso molecular ~ 29 kDa. As concentrações de imidazol 80 mM e 100 mM, apresentaram fracamente as bandas esperadas, sugerindo pouca concentração de proteínas purificadas, o que corrobora os dados obtidas na dosagem de proteínas realizada (Figura 10).

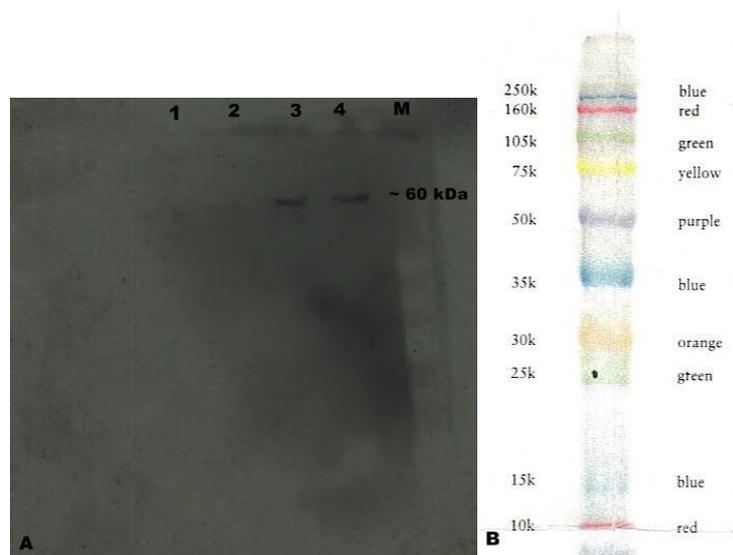


Figura 10 - Detecção do fragmento scFvBaP1 – amostras purificadas expressão transiente

A - Western Blotting das amostras purificadas. B- Marcador de baixo peso molecular

1. Amostra 80mM imidazol; 2. 100 mM imidazol; 3. 250 mM imidazol; 4. 500 mM imidazol; M. marcador de baixo peso molecular. B - Marcador baixo peso molecular

Fonte: Próprio autor

5.4.2 TRANSFORMAÇÃO ESTÁVEL

Com a padronização do processo de purificação, foi possível se obter fragmentos do anticorpo scFvBaP1 em cada uma das amostras utilizadas, demonstrando que os sistemas de produção testados são eficientes quando utilizados como reatores vegetais. Foram encontradas diferentes concentrações de proteínas em cada uma das variações testadas dentro do sistema de expressão utilizado (tabela 3), sendo que na fração correspondente ao sobrenadante das suspensões celulares observou-se um melhor rendimento ($\mu\text{g/g}$ de biomassa) e produtividade ($\mu\text{g/g/dia}$).

Tabela 3- Rendimento e produtividade do fragmento scFvBaP1

Amostras	Rendimento	Produtividade
Plantas transgênicas	270 $\mu\text{g/g}$ (± 5)	18 $\mu\text{g/g/d}$
Calos transgênicos	62 $\mu\text{g/g}$ (± 2)	4,1 $\mu\text{g/g/d}$
Suspensão celular (precipitado)	83 $\mu\text{g/g}$ ($\pm 0,2$)	10,37 $\mu\text{g/g/d}$
Suspensão celular (sobrenadante)	605 $\mu\text{g/g}$ (± 57)	75,62 $\mu\text{g/g/d}$

Fonte: Elaborado pelo autor

Somente foi possível visualizar no gel de eletroforese corado com azul de comassie a presença de banda na amostra que corresponde as proteínas purificadas a partir do extrato total das plantas transgênicas. A banda se apresentou novamente na altura de $\sim 58\text{kDa}$, sugerindo dimerização dos fragmentos scFvBaP1 durante o processo eletroforético (Figura 11).

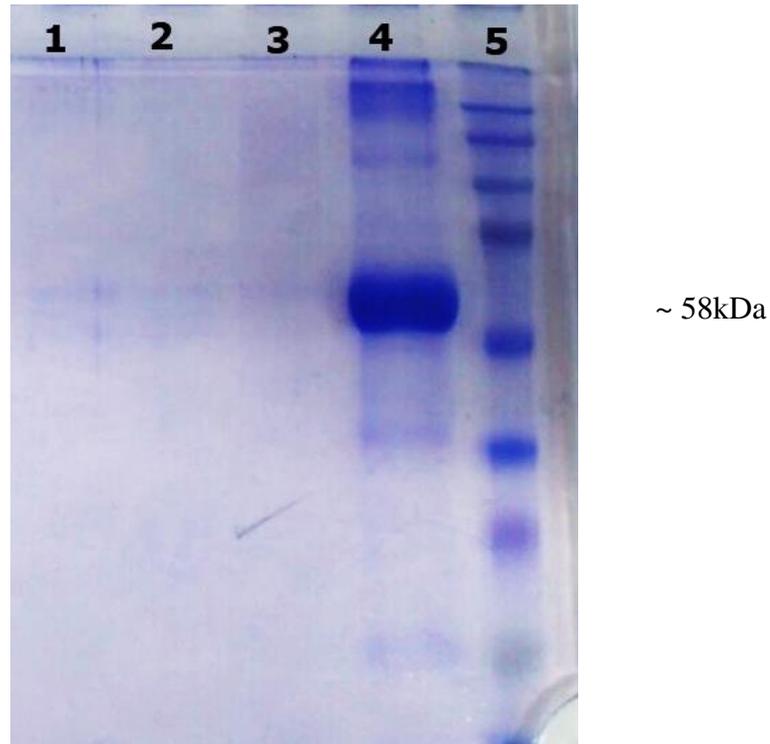


Figura 11- SDS PAGE 10% azul de coomassie – Fragmento scFvBaP1 purificado
 1. Suspensão celular (sobrenadante), 2. Suspensão celular (precipitado), 3. Calos transgênicos, 4. Plantas transgênicas, 5. Marcador de baixo peso molecular

Fonte: Próprio autor

O sistema de expressão transiente de proteínas, quando comparado aos sistemas baseados na transformação estável (plantas transgenicas e derivados), apresentou um menor rendimento de produção mesmo utilizado-se o supressor de silenciamento gênico (Figura 12).

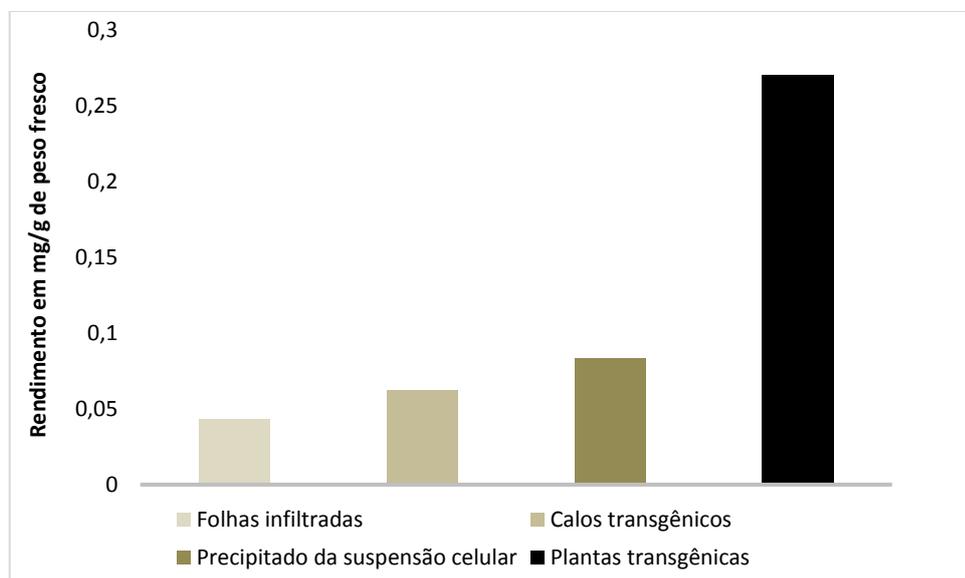


Figura 12- Comparação entre o rendimento de produção de proteínas (mg/g peso fresco) entre os sistemas utilizados

Fonte: Elaborado pelo autor

A análise estatística realizada comparando o rendimento total de produção dos dois métodos de transformação utilizados demonstra diferença significativa entre os mesmos. A transformação estável se apresenta estatisticamente mais rentável em relação à expressão transiente (Figura 13).

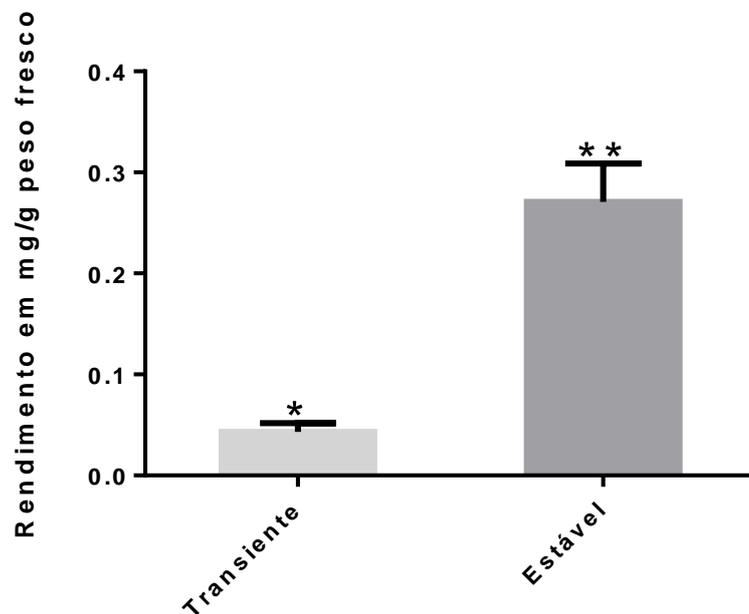


Figura 13 – Rendimento de produção expressão transiente VS transformação estável. Os métodos de transformação utilizados apresentaram diferença estatística em relação ao rendimento de produção.

Fonte: Elaborado pelo autor

Quando comparadas estatisticamente as duas frações obtidas através das suspensões apresentam diferença significativa. Sendo que, no sobrenadante da suspensão celular foi encontrada uma maior concentração de proteínas (Figura 14).

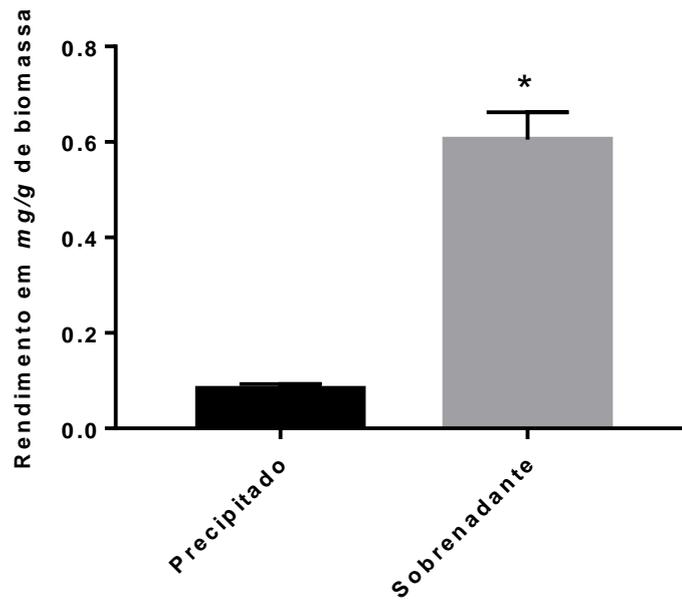


Figura 14 – Rendimento de produção precipitado VS sobrenadante. As duas frações analisadas apresentaram diferença estatística em relação ao rendimento de produção.

Fonte: Elaborado pelo autor

5.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA

5.5.1 ELISA

A capacidade de reconhecimento do fragmento scFvBaP1 frente as toxinas testadas foi demonstrada pelo ensaio de ELISA. O fragmento se mostrou capaz de reconhecer a toxina BaP1, presente no veneno total de *B. asper*, bem como as toxinas isoladas BnP1 e ATX. Foi observado um maior reconhecimento pela toxina BnP1, como demonstra a figura 14.

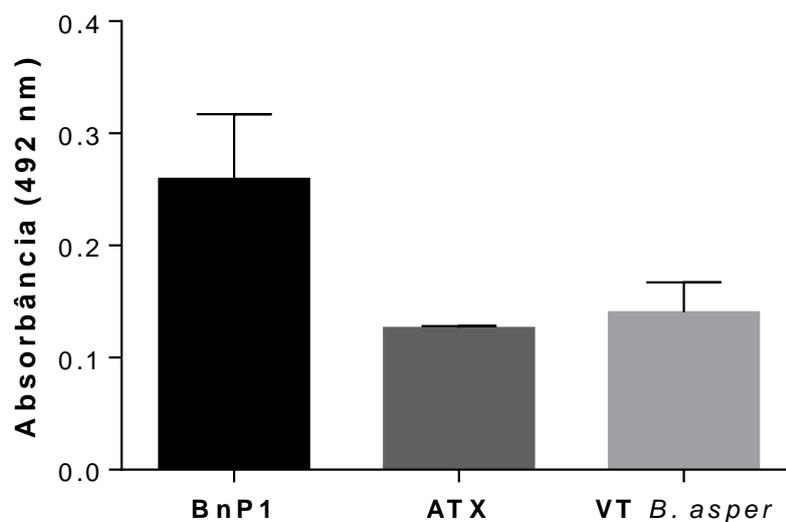


Figura 15– Reconhecimento das toxinas testadas pelo fragmento scFvBaP1
 BnP1 – toxina *B. neuwiedi*; ATX – metaloproteinase *B. atrox*; VT – veneno total *B. asper*

Fonte: Elaborado pelo autor

5.5.2 ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA

Após o período de incubação, verificou-se que o fragmento scFvBaP1 foi capaz de neutralizar a propriedade fibrinolítica das toxinas testadas. Além de neutralizar a fibrinólise causada pela toxina BaP1 (Figura 15), o fragmento se mostrou capaz de reconhecer e neutralizar as toxinas BnP1 de *B. neuwiedi* (Figura 16) e ATX de *B. atrox* (Figura 17), demonstrando assim seu potencial para utilização na imunoterapia, uma vez que os resultados sugerem um reconhecimento polivalente. Com a aferição dos halos foi possível demonstrar que o fragmento scFvBaP1 se mostrou estável durante as 24h, não permitindo que houvesse expansão dos halos aferidos. A análise estatística realizada, demonstra que não houveram diferenças significativas entre a atividade fibrinolítica dos tratamentos onde foram utilizados a associação de toxina + scFvBaP1 e o controle utilizado (PBS). Além disso, quando utilizado separadamente, o fragmento scFvBaP1 não causou nenhum tipo de dano a placa de fibrinogênio, também não apresentando diferenças significativas em relação ao controle.

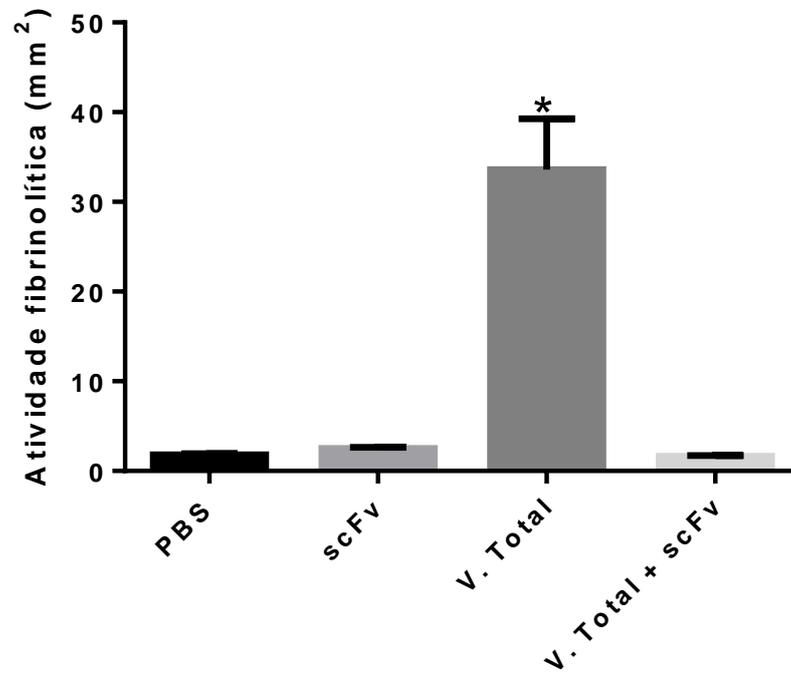


Figura 16- Neutralização da atividade fibrinolítica da toxina BaP1- Veneno Total

Fonte: Elaborado pelo autor

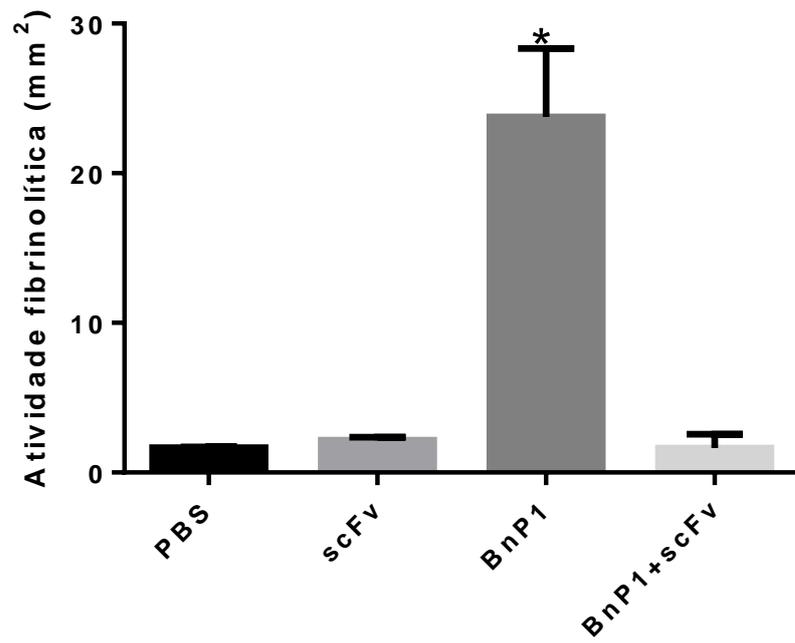


Figura 17- Neutralização da atividade fibrinolítica da toxina BnP1

Fonte: Elaborado pelo autor

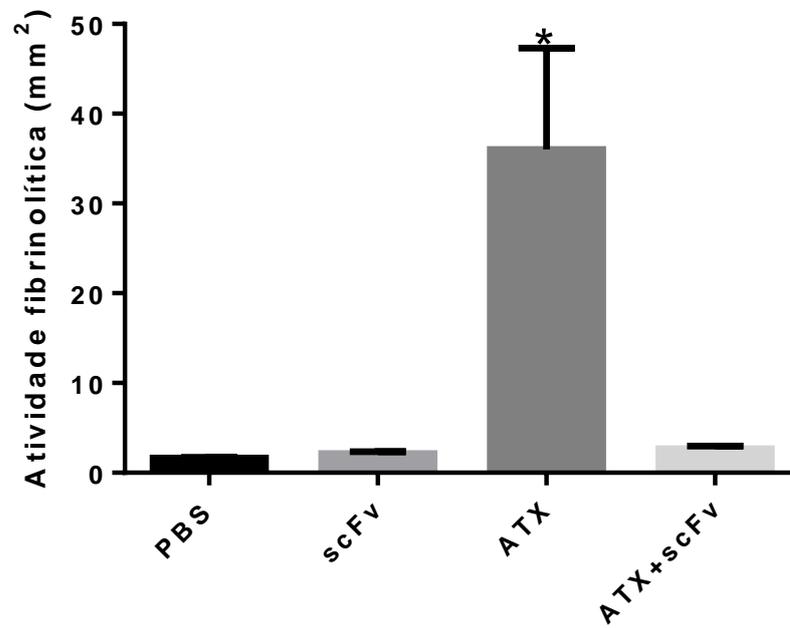


Figura 18- Neutralização da atividade fibrinolítica da toxina ATX

Fonte: Elaborado pelo autor

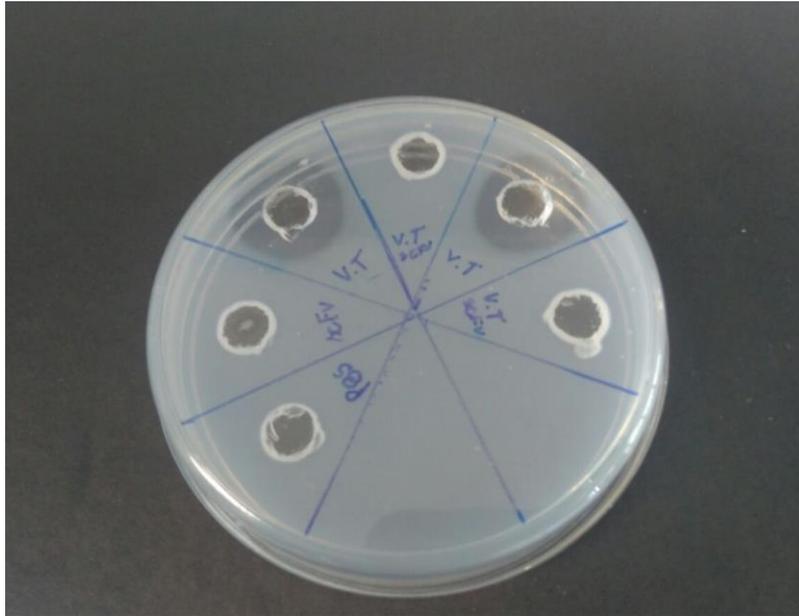


Figura 19 – Avaliação da neutralização da atividade fibrinolítica pelo fragmento scFvBaP1 –Toxina

BaP1- Veneno total

Fonte: Próprio autor



Figura 20 – Avaliação da neutralização da atividade fibrinolítica pelo fragmento scFvBaP1 – toxinas

BnP1 e ATX

Fonte: Próprio autor

6 DISCUSSÃO

Atualmente, dentro do panorama da utilização de sistemas vegetais, as plataformas mais eficientes de produção de anticorpos recombinantes, são as folhas de tabaco, sendo para expressão transiente ou estável (Ma et al, 2015). Quando produzidas em folhas, proteínas recombinantes tendem a ser degradadas por moléculas como a água e os alcalóides presentes (Niemer et al., 2015). Para que não haja degradação das proteínas produzidas, algumas estratégias vêm sendo adotadas, como o direcionamento das proteínas para alguns compartimentos celulares, como o apoplasto ou o retículo endoplasmático, como relatado por Goulet et al., (2010); Jutras et al., (2015); Robert et al., (2013). Neste trabalho, os anticorpos recombinantes foram direcionados ao espaço periplasmático das células, a fim de se diminuir a degradação dos mesmos. O direcionamento foi realizado com a adição de um peptídeo sinal ao cassete de expressão.

A expressão transiente, monitorada por nove dias, foi detectada depois de três dpi (dias pós infiltração), como mostra o estudo realizado por Pêra e seus colaboradores, (2015). A eficiência da infiltração depende, dentro outros fatores, da interação patógeno-hospedeiro. A *Agrobacterium* deve ser capaz de penetrar os tecidos foliares, propiciando o carreamento do gene a ser expresso (VOJTA et al, 2015). Neste contexto, podemos afirmar que a linhagem escolhida *Agrobacterium* GV3101, se mostrou eficiente quando utilizada para tal finalidade, sendo capaz de mediar a expressão do fragmento scFvBaP1. Outro fator relevante foi a não observação de tecidos em necrose durante o processo, apenas foi observado o início de uma reação de hipersensibilidade nas folhas. A densidade ótica utilizada que a suspensão bacteriana apresenta no ato da infiltração é de suma importância para que não haja necrose nos tecidos, a densidade OD600 entre 0,4 e 0,8 também é apontada como ótima em alface e *Arabidopsis* (WROBLEWSKI; TOMCZAK; MICHELMORE, 2005). Wieczorek e Steplowska, 2016 demonstram em seu trabalho, que a interação *Agrobacterium* – *Nicotiana benthamiana*, durante o processo de agroinfiltração é

capaz de desencadear uma reação de hipersensibilidade, como mecanismo natural de defesa do hospedeiro em relação ao patógeno.

A escolha da espécie *N. benthamiana*, foi realizada a fim de minimizar a degradação de proteínas, uma vez que apresenta uma baixa produção de alcalóides (TWYMAN et al, 2003). A espécie foi capaz de expressar transientemente o fragmento scFvBaP1, bem como o gene repórter GFP. A observação do maior número de células expressando GFP nas folhas co-ilfiltradas, deve-se a ação do anti silenciador TCV-CP, que impede que as proteínas recombinantes sejam silenciadas por mecanismos de defesa da planta, como descreve Qu e colaboradores, (2003).

O rendimento médio da produção do fragmento scFvBaP1 utilizando o sistema baseado na expressão transiente, foi de 43µg/g (\pm 0,7). Alguns autores, como Lacombe e colaboradores, 2017, relatam uma baixa produção de proteínas recombinantes produzidas em tal sistema, isso pode ser associado, basicamente, a degradação de proteínas por meio da ação de proteases e também por interferência dos alcalóides e demais metabólitos secundários produzidos pela planta hospedeira (GROSSE-HOLTZ et al., 2017); um outro fator a ser levado em consideração neste panorama, são os mecanismos de silenciamento gênico que tendem a acontecer como forma de resposta da planta à infecção (RASSOOL et al.,2016). A fim de se minimizar o silenciamento gênico, foi utilizado o supressor viral TCV-CP, porém a sua utilização não foi capaz de aumentar o rendimento de produção do fragmento ScFvBaP1, isso pode ser concluído através da análise estatística realizada que demonstrou que não haviam diferenças significativas entre o rendimento obtido em ambos os tratamentos utilizados (presença e ausência do TCV-CP). Tais dados são contrários aos dados encontrados no trabalho realizado por Qu et al., (2003), onde foi utilizado o mesmo supressor viral e também o trabalho de Mohammadzadedeh et al., (2015) utilizando o supressor viral p19. Em ambos os trabalhos foram encontradas diferenças significativas quando realizada a co-infecção utilizando-se supressores virais.

As plantas transgênicas (transformação estável) vêm se mostrando promissoras e eficientes na produção de proteínas de interesse terapêutico, incluindo os anticorpos monoclonais e fragmentos scFv (XU; TOWLER e WEATHERS., 2016). Neste trabalho, foram obtidas três linhagens de plantas transgênicas (P2, P3 e P4), sendo a eficiência de transformação igual a 3,75%. As linhagens obtidas, além de integrar o transgene, foram capazes de expressar o fragmento scFvBaP1, demonstrando sua potencial

utilização como reator de produção de proteínas recombinantes de uso terapêutico. Muitos trabalhos relatam a utilização da espécie *Nicotiana benthamiana* para fins de produção de candidatos a biofármacos, como demonstram os trabalhos de Marusic et al., 2015; Niemer et al., 2015 e Alkanaimsh et al., 2016.

Foi obtido um rendimento total de 270µg/g (± 5) de scFvBaP1 produzidos a partir das plantas transgênicas (transformação estável). O rendimento foi superior ao encontrado no sistema de produção transiente, apresentando diferença significativa nas análises estatísticas realizadas. Esse resultado pode estar relacionado à estabilidade que o sistema de produção apresenta, em relação ao anteriormente relatado. Uma vez que as proteínas estavam sendo direcionadas para o espaço periplasmático das células, elas ficaram livres da ação das proteases e do silenciamento gênico, o que culminou numa maior concentração de proteínas obtidas. Estes resultados demonstram uma maior eficiência da transformação estável, em relação à expressão transiente e sugerem uma melhor eficiência de tal sistema de produção, como é relatado no trabalho de revisão realizado por Merlin e colaboradores., (2014).

Além do melhor rendimento de produção, uma grande vantagem da obtenção de plantas transgênicas é a possibilidade de escalonamento através da indução de suspensões celulares (YOSHIKAWA, 2016). As suspensões celulares não são só capazes de produzir em larga escala, elas também garantem uma produção homogênea e limpa, livre da ação dos metabólitos secundários que podem ser considerados interferentes da produção de biofármacos em plantas transgênicas, e podem direcionar as proteínas produzidas para o meio de cultura, eliminando uma etapa de extração de proteínas (MUTHAMILSESELVAN et al., 2016). A partir das suspensões celulares provenientes das três linhagens de plantas transgênicas, foram obtidos os seguintes rendimentos: 83µg/g ($\pm 0,2$) precipitado e 604 µg/ml (± 57) sobrenadante. As frações da suspensão foram separadas a fim de se avaliar se as proteínas seriam lançadas para o meio de cultura ou ficariam retidas no interior das células. Como a concentração de proteínas no sobrenadante se mostrou estatisticamente superior a concentração de proteínas encontradas no precipitado, sugere-se que os anticorpos produzidos estão sendo lançados para o meio de cultura da suspensão. Esse resultado é bastante favorável, ao serem lançados para o meio de cultura de cultura, é eliminado a etapa de extração de proteínas, que além de

baratear os custos da obtenção do mesmo também elimina os contaminantes presentes nas células do tabaco, como por exemplo os alcaloides.

Os rendimentos obtidos neste sistema podem ser facilmente melhorados com o ajuste das condições de cultura utilizadas, tais como meio de cultura, agitação, luminosidade, concentração de CO₂, dentre outros. Esses parâmetros podem ser facilmente ajustados com a utilização de biorreatores semi-industriais, que permitem que as condições de cultura sejam devidamente mantidas ao longo de um determinado período de tempo, otimizando a produção em relação a quantidade e também a qualidade das proteínas produzidas, como demonstram os trabalhos de Magy e colaboradores., 2014.

Alguns estudos recentes apontam os fragmentos scFvs como moléculas promissoras no reconhecimento e neutralização de toxinas presentes nos venenos de animais peçonhentos, demonstrando seu potencial para serem utilizados como forma de tratamento em casos de acidentes (LAUSTSEN et al.,2016; PESSEDA et al.,2016). Pucca, (2016) aponta os fragmentos scFvs como uma nova geração de moléculas anti venenos, e relata os benefícios de sua utilização em relação à soroterapia, tais como a eficácia dessas moléculas e a diminuição dos efeitos colaterais causados pelos anticorpos eqüinos.

Em relação aos envenenamentos causados por serpentes, Roncolato et al., (2012); Lee et al., (2016) e Silva et al., (2017) expressaram, em *Escherichia coli*, fragmentos scFvs capazes de reconhecer e neutralizar os efeitos dos venenos de *Crotalus durissus*, *Bungarus multicinctus* e algumas serpentes do gênero *Bothrops*. Segundo Laustsen e colaboradores, (2017) o uso de moléculas recombinantes no tratamento de acidentes ofídicos pode auxiliar na resolução deste problema de saúde pública, considerado negligenciado. De acordo com o autor, tais moléculas tendem a ter um custo menos elevado comparado à produção dos anticorpos convencionais, podendo ser expressas em sistemas facilmente controláveis e também por possuírem ação eficaz em pouca quantidade.

O fragmento scFvBaP1, proposto por Castro et al.,2014, se demonstrou eficaz frente as toxinas BaP1 e BnP1, isoladas dos venenos de *B. asper* e *B. neuwiedi*, respectivamente. Porém, quando expresso em *E. coli*, o rendimento encontrado foi de 280µg/L de meio de cultura. Quando expresso em *Nicotiana benthamina*, o rendimento de produção do fragmento scFvBaP1 foi superior comparado a produção em *E. coli*. Além disso, foi verificada sua atividade biológica frente as toxinas BaP1,

BnP1 e ATX. Segundo os dados obtidos pelo ensaio de ELISA, o fragmento scFvBaP1 se mostrou capaz de reconhecer a toxina BaP1, presente no veneno total de *B. asper* e também as toxinas isoladas BnP1 e ATX. Houve uma maior afinidade entre o fragmento scFvBaP1 e a toxina BnP1, este fato pode estar relacionado ao fato de ter sido utilizado o veneno total de *B. asper* e não a toxina BaP1 isolada, tal metaloproteinase corresponde a 10% do peso seco do veneno total (WATANABE, 2003).

Também foi avaliada, a capacidade do fragmento scFvBaP1 de neutralizar a atividade fibrinolítica das toxinas BaP1, BnP1 e ATX. Castro e colaboradores., 2014 demonstram a neutralização da atividade fibrinolítica da toxina BaP1 pelo fragmento scFvBaP1, produzido em *E. coli*. O fragmento scFvBaP1, expresso em plantas, não só reconheceu e inibiu a atividade da toxina BaP1, ele se mostrou capaz de reconhecer e inibir a ação das toxinas BnP1 e ATX. Este reconhecimento de toxinas provenientes de diferentes espécies, pode ser atribuído à alta conservação filogenética que as metaloproteinases apresentem, como relatado por Tanjoni e colaboradores., (2003). Segundo o autor, as metaloproteinases apresentem epítomos conservados dentro da família *Viperidae* e estes também são encontrados em outras famílias, como *Elapidae* e *Colubridae*.

Nesta vertente, com os resultados obtidos, pode-se sugerir que o fragmento scFvBaP1 pode ser utilizado não somente para inibir os efeitos dos envenenamentos causados por *B. asper*, mas também por outras serpentes. Deste modo, sugere-se que tal fragmento apresenta reconhecimento polivalente, se demonstrando assim como uma molécula promissora a ser utilizada na terapia contra acidentes ofídicos.

7 CONCLUSÕES

O fragmento scFvBaP1 foi inicialmente expresso de forma transiente em folhas de *N. benthamina*, sendo obtido um rendimento final de produção de 43µg/g (\pm 0,7) de folha infiltrada. Além disso, foram obtidas três linhagens de plantas transgênicas, capazes de expressar o fragmento scFvBaP1 totalizando um rendimento de produção igual a 270µg/g (\pm 5). A partir das plantas transgênicas, foi possível realizar a indução de suspensões celulares, nas quais foi observada a produção do fragmento scFvBaP1 tanto nas células em suspensão como no meio de cultura utilizado para indução.

Deste modo, foi possível se obter a produção do fragmento scFvBaP1 tanto de forma transiente, como de maneira estável. Dentro da plataforma de produção de moléculas recombinantes em plantas transgênicas (transformação estável), foram exploradas algumas variações, como a indução de calos e também de suspensões celulares, visando-se obter escalonamento de produção. Sendo nesta variação onde foram obtidos os melhores rendimentos (604 µg/ml (\pm 57)).

O fragmento scFvBaP1 foi capaz de reconhecer e neutralizar a atividade fibrinolítica das toxinas BaP1, BnP1 e ATX. Demonstrando seu potencial para ser utilizado como forma alternativa à soroterapia, em casos de envenenamento causados pelas serpentes *B. asper*, *B. neuwiedi* e *B. atrox*, abrindo portas para que mais testes sejam realizados para que seja testada a sua polivalência, frente a outras toxinas de outras serpentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS A.K.; LICHTMAN A.H. *Imunologia Básica*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007

ALAPE-GIRÓN, A. et al. Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*: Perspectives and applications. *Toxicon*, v. 54, n. 7, p. 938–948, 2009.

ALKANAIMSH, S. et al. Transient Expression of Tetrameric Recombinant Human Butyrylcholinesterase in *Nicotiana benthamiana*. *Frontier in Plants Research*, v.7, 2016.

ANGULO, Y. et al. *Toxicon Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake Bothrops asper*. *Toxicon*, v. 54, n. 7, p. 949–957, 2009.

ASEGA, A. F. et al. *Toxicon Interaction of Bothrops jararaca venom metalloproteinases with protein inhibitors*. *Toxicon*, v. 80, p. 1–8, 2014.

AZZAZY, H. M. E.; HIGHSMITH, W. E. *Phage display technology : clinical applications and recent innovations*. *Clinical Biochemistry*, v. 35, n. 6, p. 425–445, 2002.

BALDO, C. et al. nP1, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: Biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. *Toxicon*, v. 51, n. 1, p. 54–65, 2008.

BALDO, C. et al. *Mechanisms of Vascular Damage by Hemorrhagic Snake Venom Metalloproteinases : Tissue Distribution and In Situ Hydrolysis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 4, n. 6, p. 1–10, 2010.

BARTA, A et al. *The Expression of a Nopaline Synthase - Human Growth-Hormone Chimeric Gene in Transformed Tobacco and Sunflower Callus-Tissue*. *Plant*

Molecular Biology, v. 6, n. 5, p. 347–357, 1986

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, n. 1-2, p. 248–254, 1976.

BAULCOMBE, D. DNA events. An RNA microcosm. No Title. *Science*, v. 297, p. 2002–2203, 2002.

BORDEN, E. C. et al. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nature reviews. Drug discovery*, v. 6, n. 12, p. 975–990, 2007.

BRASILEIRO, A.C.M; CARNEIRO, V.T.C. *Manual de Transformação Genética de Plantas*. EMBRAPA, 1998.

BOEHM, R. Bioproduction of Therapeutic Proteins in the 21st Century and the Role of Plants and Plant Cells as. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 134, p. 121–134, 2007.

BUCKEL, P. Recombinant proteins for therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 17, n. 12, p. 450–456, 1996.

CAMACHO, E. et al. Understanding structural and functional aspects of PII snake venom metalloproteinases: Characterization of BlatH1, a hemorrhagic dimeric enzyme from the venom of *Bothriechis lateralis*. *Biochimie*, v. 101, n. 1, p. 145–155, 2014.

CARDOSO, F. *Medicamentos Biológicos na Prática Médica: A importância dos medicamentos biológicos*. 1. ed. São Paulo: AMB, 2013.

CASTRO, J. M. A. et al. A neutralizing recombinant single chain antibody, scFv, against BaP1, A P-I hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*, v. 87, p. 81–91, 2014.

CHEBOLU, S.; DANIELL, H. Chloroplast-Derived Vaccine Antigens and Biopharmaceuticals: Expression, Folding, Assembly and Functionality. *Curr Top*

Microbiol Immunol, v. 332, p. 33–54, 2009.

CIOLA, R. Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho – HPLC. EdgardBlücherLtda, 1998.

CIRCELLI, P. et al. for the production of biopharmaceuticals in plants. Bioengineered Bugs, v. 1, n. 3, p. 221–224, 2010.

COLLENS, J. I.; MASON, H. S.; CURTIS, W. R. Agrobacterium -Mediated Viral Vector-Amplified Transient Gene Expression in Nicotiana glutinosa Plant Tissue Culture. p. 570–576, 2007.

CUNHA, N. B. et al. Expression and Characterisation of Recombinant Molecules in Transgenic Soybean. Current Pharmaceutical Design. v. 19, n. 31, p. 5553-5563, 2013.

DELGADO, A. B. T. D. et al. Hemorrhagic stroke secondary to Bothrops spp. venom: A case report. Toxicon, v. 132, n. 15, p. 6–8, 2017.

DESAI, P. N.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Production of heterologous proteins in plants: Strategies for optimal expression. Biotechnology Advances, v. 28, n. 4, p. 427–435, 2010.

DE TONI, L. G. B. et al. Inflammatory mediators involved in the paw edema and hyperalgesia induced by Batroxase, a metalloproteinase isolated from Bothrops atrox snake venom. International Immunopharmacology, v. 28, n. 1, p. 199–207, 2015.

DONDOS, A. Applicability of the modified universal calibration of gel permeation chromatography on proteins. Journal of Chromatography A, v. 1127, n. 1-2, p. 183–186, 2006.

DÜRING, K. et al. Synthesis and self-assembly of a functional monoclonal antibody in transgenic Nicotiana tabacum. Plant Molecular Biology, v. 15, n. 2, p. 281–293, 1990.

EIBL, R. et al. *Mammalian Cell Culture Technology*. 1. ed. Berlin: Springer, 2009

ESTEVAO-COSTA, M. I. et al. Neutralization of toxicological activities of medically-relevant Bothrops snake venoms and relevant toxins by two polyvalent bothropic antivenoms produced in Peru and Brazil. *Toxicon*, v. 122, p. 67–77, 2016.

FARR, W. L.; LAZCANO, D. Distribution of *Bothrops asper* in Tamaulipas, Mexico and a review of prey items. *The Southwestern Naturalist*, v. 62, n. 1, p. 77–84, 2017

FARSKY, S. H. P. et al. *Bothrops asper* snake venom and its metalloproteinase BaP-1 activate the complement system. Role in leucocyte recruitment. *Mediators of inflammation*, v. 9, n. 5, p. 213–221, 2000.

FENWICK, A. M. et al. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). *Zoological Journal*, v. 156, n. 3, p. 617–640, 2009.

FERNANDES, I. et al. Immunochemical and biological characterization of monoclonal antibodies against BaP1, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*, v. 56, n. 6, p. 1059–1065, 2010.

FILHO, I. C. B. Clonagem, expressão e purificação de proteínas do plasma seminal bovino relacionadas à alta congelabilidade do sêmen. 2010. 113 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

FISCHER, R. et al. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 7, n. 2, p. 152–158, 2004.

GIFRE, L. et al. Trends in recombinant protein use in animal production. *Microbial Cell Factories*, v. 16, n. 1, p. 40, 2017.

GOIS, P. H. F. et al. Allopurinol attenuates acute kidney injury following *Bothrops jararaca* envenomation. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 11, p. 1–15, 2017.

GOMES, S. et al. Protein Complex Production in Alternative Prokaryotic Hosts. In: VEJA, M. C. for Protein Complex Production and Characterization. Switzerland: Springer, 2016. Cap. 8, p. 115-136.

GOMORD, V. et al. Production of Foreign Proteins in Tobacco Cell Suspension Culture: 1. Ed, Tolowa, 1998.

GOULET, C. et al. A companion protease inhibitor for the protection of cytosol-targeted recombinant proteins in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 8(2):142–154, 2010.

GROSSE-HOLTZ, F. et al. The transcriptome, extracellular proteome and active secretome of agroinfiltrated *N. benthamiana* uncover a large, diverse protease repertoire. *Plant Biotechnology Journal*. 2017

GUÉRCIO, R. A. P. et al. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. *Proteome Science*, v. 4, n. 11, p. 1–14, 2006.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*, v. 82, n. 9-10, p. 841-850, 2000.

GUTIÉRREZ, J. et al. Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *Journal of Proteomics*, v. 72, n. 2, p. 165–182, 2009.

HARTMANN, M. T.; MARQUES, O. A. V.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive biology of the southern Brazilian pitviper *Bothrops neuwiedi pubescens* (Serpentes, Viperidae). *Amphibia-reptilia*, v. 25, n. 1, p. 77–85, 2004.

HEATON, L. A.; LAAKSOT, M. M. Several symptom-modulating mutations in the coat protein of turnip crinkle carmovirus result in particles with aberrant conformational properties. *Journal of General Virology*, v. 76, p. 225–230, 1995

HERMANS, C. et al. Current practice of therapeutic drug monitoring of

biopharmaceuticals in psoriasis patients. *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 39, n. 4, p. 356–359, 2017.

HIATT, A. et al. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, v. 342, p. 76–78, 1989.

IZIDORO, L. F. M. et al. Neutralization of some hematological and hemostatic alterations induced by neuwiedase , a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom , by the aqueous extract from *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae). *Biochimie*, v. 85, n. 7, p. 669–675, 2003.

JOHANSEN, L. K.; CARRINGTON, J. C. Silencing on the Spot . Induction and Suppression of RNA Silencing in the *Agrobacterium* -Mediated Transient Expression System 1. *Plant Physiology*, v. 126, n. 3, p. 930–938, 2001.

JUTRAS, P.V. et al. Modulating secretory pathway pH by proton channel co-expression can increase recombinant protein stability in plants. *Biotechnol. J.* 10, 1478–1486, 2015.

KILIKIAN, B.V.; PESSOA JR, A. Purificação de produtos biotecnológicos. In: *Biotecnologia industrial. Volume II. Engenharia Bioquímica*. Cood: SCHMIDELL, W.;

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, v. 256, p. 495–497, 1975.

KRAUSE, M.; NEUBAUER, A.; NEUBAUER, P. The fed-batch principle for the molecular biology lab: controlled nutrient diets in ready-made media improve production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, v. 15, n. 1, p. 110, 2016.

LAUSTSEN, A, H. et al. Biotechnological Trends in Spider and Scorpion Antivenom Development. *Toxins*, v.8, 2016.

LEADER, B.; BACA, Q. J.; GOLAN, D. E. Protein therapeutics: a summary and

pharmacological classification. *Nature reviews. Drug discovery*, v. 7, n. 1, p. 21–39, 2008.

LEE, C-H. et al. Production and Characterization of Neutralizing Antibodies against *Bungarus multicinctus* Snake Venom. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. 1. ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001.

LOWRY, O. H. et al. The folin by olierProtein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 217, n. 2, p. 220–230, 1951.

MA, J. K.-C.; DRAKE, P. M. W.; CHRISTOU, P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature reviews. Genetics*, v. 4, n. 10, p. 794–805, 2003.

MAGY, B. et al. Accumulation of secreted antibodies in plant cell cultures varies according to the isotype , host species and culture conditions. *Plant Biotechnology Journal*, v. 12, p. 457–467, 2014.

MADEIRA, L. S. Prospecção tecnológica através de depósitos de patentes para produção de proteínas terapêuticas de interesse brasileiro. 2013. 213 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) –Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MARQUES, C. H. Aspectos fundamentais à implantação da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais humanizados com potencial, aplicação terapêutica. 2005. 109 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

MARUSIC, C. et al. Production of an active anti-CD20-hIL-2 immunocytokine in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Biotechnology Journal*, v. 14, p.240-251, 2015.

MEHTA, M. U. et al. Impact of the US FDA “ Biopharmaceutics Classi fi cation

System ” (BCS) Guidance on Global Drug Development. *Molecular Pharmaceutics*, v. 14, p. 4334–4338, 2017.

MELLADO, M.C.M, CASTILHO, L.R. Proteínas recombinantes terapêuticas. In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR. (Org.) *Tecnologia do Cultivo de Células Animais – de Biofármacos a Terapia Gênica*. São Paulo: Editora Roca, 2008, p 387-388.

MELO, C. A. Clonagem e expressão da glucocerebrosidase humana em células de ovário de hamster chinês (CHO). 2010. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo.

MELO, C. DA S.; CUNHA, J. A. DA S.; FIALHO, S. L. Formas farmacêuticas poliméricas para a administração de peptídeos e proteínas terapêuticas. *Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada*, v. 33, n. 4, p. 469–477, 2012.

MENALDO, D. L. et al. Purification procedure for the isolation of a P-I metalloprotease and an acidic phospholipase A 2 from *Bothrops atrox* snake venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 21, n. 28, p. 1–14, 2015.

MENASSA, RIMA. et al. *Transient expression using agroinfiltration and its applications in molecular farming*. New York: Springer Science and Buisness Media, 2012.

MERLIN, M. et al. Comparative Evaluation of Recombinant Protein Production in Different Biofactories: The Green Perspective. *BioMed Research International*, v.2014, 2014.

MOHAMMADZADEH, S. et al. Co-expression of hepatitis C virus polytope–HBsAg and p19-silencing suppressor protein in tobacco leaves. *Pharmaceutical Biology*, v.54, n.3, p. 465-473, 2016.

MOREIRA, V. et al. *Toxicon The role of TLR2 in the acute in fl ammatory response*

induced by *Bothrops atrox* snake venom. *Toxicon*, v. 118, p. 121–128, 2016.

MOUSSAVOU, G. et al. Production of monoclonal antibodies in plants for cancer immunotherapy. *BioMed research international*, v. 2015, p. 306164, 2015.

MUTHAMILSELVAN, T. et al. A transgenic plant cell-suspension system for expression of epitopes on chimeric Bamboo mosaic virus particles. *Plant Biotechnology Journal*, v.14, p.231-239, 2016.

NAM, H.-J. et al. Production and Purification of Recombinant Glucocerebrosidase in Transgenic Rice Cell Suspension Cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 181, n. 4, p. 1401–1415, 2016.

NARASIMHULU, S. B. et al. Early Transcription of *Agrobacterium* T-DNA Genes in Tobacco and Maize. *The Plant Cell.*, v. 8, n. 5, p. 873–886, 1996.

NIEMER, M. et al. *Nicotiana benthamiana* cathepsin B displays distinct enzymatic features which differ from its human relative and aleurain-like proteasis. *Biochimie*, v.122, p. 119 - 125, 2015.

NÚÑEZ, V. et al. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. *Journal of Proteomics*, v. 73, n. 1, p. 57–78, 2009.

OBEMBE, O. O. et al. Advances in plant molecular farming. *Biotechnology Advances*, v. 29, n. 2, p. 210–222, 2011.

OKAMURO, J. K.; GOLDBERG, R. B. Tobacco single-copy DNA is highly homologous to sequences present in the genomes of its diploid progenitors. *Molecular and General Genetics*, v. 198, n. 2, p. 290–298, 1985.

OWNBY, L. et al. Quantitation of myonecrosis induced by myotoxin a from prairie

rattlesnake (*Crotalus v. viridis*) venom. *Toxicon*, v. 20, n. 5, p. 877–885, 1982.

PANDA, A. K. Bioprocessing of therapeutic proteins from the inclusion bodies of *Escherichia coli*. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, v. 85, p. 43–93, 2003.

PARK, S. et al. Limitations of yeast surface display in engineering proteins of high thermostability. *Protein Engineering, Design and Selection*, v. 19, n. 5, p. 211–217, 2006.

PESSEDA, G. et al. Human scFv antibodies (Afrimumabs) against Africanized bee venom: Advances in melittin recognition. *Toxicon*, v. 112, p. 59–67, 2016.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. OFIDISMO. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 47, n. 1, p. 24–29, 2001.

PHOOLCHAROEN, W. et al. Expression of an immunogenic Ebola immune complex in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Biotechnology Journal*, v. 9, n. 7, p. 807–816, 2011.

PORRO, D. et al. Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 89, n. 4, p. 939–948, 2011.

PUCCA, M, B. Human monoclonal antibody fragments (scFv): A new generation of antivenoms. *Immunome Research*, 2016.

QU, F.; REN, T.; MORRIS, T. J. The Coat Protein of Turnip Crinkle Virus Suppresses Posttranscriptional Gene Silencing at an Early Initiation Step. *JOURNAL OF VIROLOGY*, v. 77, n. 1, p. 511–522, 2003.

ROBERT, S. et al. Protection of recombinant mammalian antibodies from development-dependent proteolysis in leaves of *Nicotiana benthamiana*. *PloS One*. 2013.

RASSOL, G. et al. Transient expression of synthetic coat protein gene of cotton leaf curl burewala virus in tobacco (*Nicotiana benthamiana*). *J.Agric. Res*, v. 54(1), p. 21-34, 2016.

RODRIGUES, V. M. et al. Structural and Functional Characterization of Neuwiedase , a Nonhemorrhagic Fibrin (ogen) olytic Metalloprotease from Bothrops neuwiedi Snake Venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 381, n. 2, p. 213–224, 2000.

RODRIGUES, V. M. et al. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. *Toxicon*, v. 44, n. 3, p. 305–314, 2004.

ROQUE, A. C. A.; LOWE, C. R.; TAIPA, M. A. Antibodies and Genetically Engineered Related Molecules : Production and Purification. *Biotechnology Progress*, v. 20, n. 3, p. 639–654, 2004.

ROPER, D. K.; LIGHTFOOT, E. N. Separation of biomolecules using adsorptive membranes. *Journal of Chromatography A*, v. 702, n. 1-2, p. 3–26, 1995.

RUCAVADO, A. et al. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Mediators of Inflammation*, v. 11, n. 2, p. 121–128, 2002.

RUCAVADO, A.; NÚÑEZ, J.; GUTIÉRREZ, J.M. Blister formation and skin damage induced by BaP1, a haemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 79, n. 4, p. 245–254, 1998

SACHETT, J. A. G. et al. Poor efficacy of preemptive amoxicillin clavulanate for preventing secondary infection from *Bothrops* snakebites in the Brazilian Amazon : A randomized controlled clinical trial. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 7, p. 1–21, 2017.

SCHLEGEL, S.; GENEVAUX, P.; DE GIER, J.-W. Isolating *Escherichia coli* strains

for recombinant protein production. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 74, n. 5, p. 1–18, 2016.

SCHNEIDER, F. S. et al. Use of a Synthetic Biosensor for Neutralizing Activity-Biased Selection of Monoclonal Antibodies against Atroxlysin-I, an Hemorrhagic Metalloproteinase from *Bothrops atrox* Snake Venom. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 4, p. 1–9, 2014.

SHARMA, C. S.; NEMA, R. K.; SHARMA, V. K. Stamford Journal of Pharmaceutical Sciences Synthesis , anticonvulsant activity and in- silico study of some novel amino acids incorporated bicyclo compounds. *Stamford Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 2, n. 2, p. 42–47, 2009

SILVA, P. R. G. V. DE F.; VILELA, R. V. R.; POSSA, A. P. Infecções secundárias em acidentes ofídicos: uma avaliação bibliográfica ISSN. *Estudos vida e saúde*, v. 43, n. 1, p. 17–26, 2016.

SKERRA, A. Bacterial expression of immunoglobulin fragments. *Current Opinion in Immunology*, v. 5, n. 2, p. 256–262, 1993.

SOUZA, R. A. et al. Unraveling the distinctive features of hemorrhagic and non-hemorrhagic snake venom metalloproteinases using molecular simulations. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v. 30, n. 1, p. 69–83, 2016.

SPOK, A; KAMER, S. *Plant Molecular Farming. Opportunities and Challenges*: 1 ed. Áustria: IPTS, 2008

SQUIRES, C. H. et al. Heterologous Protein Production in. *Biotechnology in Agriculture and the Food Chain*, p. 1–48, 2016.

STEIN, R. et al. Characterization of a New Humanized Anti-CD20 Monoclonal Antibody , IMMU-106 , and Its Use in Combination with the Humanized Anti-CD22 Antibody , Epratuzumab , for the Therapy of Non-Hodgkin ' s Lymphoma. *Clinical Cancer Research*, v. 10, p. 2868–2878, 2004.

TANJONI, I. et al. Phylogenetic conservation of a snake venom metalloproteinase epitope recognized by a monoclonal antibody that neutralizes hemorrhagic activity, *Toxicon*, v.42, p.809-816, 2003.

THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A.; GRIFFITHS, E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon*, v. 41, n. 5, p. 541–557, 2003.

TIWARI, S. et al. Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 4, p. 449–467, 2009.

TREGONING, J. S. et al. Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acids Research*, v. 31, n. 4, p. 1174–1179, 2003.

TWYMAN, R. M. et al. Molecular farming in plants : host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology*, v. 21, n. 12, p. 570–578, 2003.

TWYMAN, R. M.; SCHILLBERG, S.; FISCHER, R. Optimizing the Yield of Recombinant Pharmaceutical Proteins in Plants. *Current Pharmaceutical Design*, v. 19, n. 31, p. 5486–5494, 2013.

VAUGHAN, J. G.; DONOVAN, M. O. Experimental evaluation of distributed load balancing implementations. *Concurrency and Computation: Practice and Experience*, v. 10, n. 10, p. 763–782, 1998.

VELAGA, S. P. et al. Dry powder inhalers : An overview of the in vitro dissolution methodologies and their correlation with the biopharmaceutical aspects of the drug products. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, p. 1–11, 2017.

VÉLEZ, S. M. et al. Geographical variability of the venoms of four populations of *Bothrops asper* from Panama: Toxicological analysis and neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, v. 132, p. 55–61, 2017.

VOJTA, L. et al. Rapid transient expression of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in two industrial cultivars of tobacco (*Nicotiana tabacum* L .) by agroinfiltration. *Biotechnology Reports*, v. 7, p. 81–86, 2015.

XU, J. et al. Optimization of microwave pretreatment on wheat straw for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, v. 535, n. 9, p. 3859–3864, 2011.

XU, J. et al. Green factory : Plants as bioproduction platforms for recombinant proteins. *Biotechnology Advances*, v. 30, n. 5, p. 1171–1184, 2012.

XU, J.; TOWLER, M.; WEATHERS, P.J. Platforms for Plant-Based Protein Production. *Bioprocessing of Plant in Vitro Systems*, p.1-40, 2016.

WALSH, G. Biopharmaceuticals and biotechnology medicines: An issue of nomenclature. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 15, n. 2, p. 135–138, 2002.

WANG, G.; HUANG, M.; NIELSEN, J. Exploring the potential of *Saccharomyces cerevisiae* for biopharmaceutical protein production. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 48, n. 1, p. 77–84, 2017.

WATANABE, L. et al. Amino acid sequence and crystal structure of BaP1 , a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom that exerts multiple tissue-damaging activities. *Protein Science*, v. 12, n. 10, p. 2273–2281, 2003.

WIECZOREK, P.; STEPLOWSKA - O, A. The N-terminal fragment of the tomato torrado virus RNA1- encoded polyprotein induces a hypersensitive response (HR) - like reaction in *Nicotiana benthamiana*. *Archives of Virology*, v. 161, p. 1849–1858, 2016.

WOODNUTT, G. 2008 Advances in proteins therapeutics. *Current opinion in drug discovery and development. Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, v. 26, p.

754-761

WORN, A.; PLUCKTHUN, A. Stability Engineering of Antibody Single-chain Fv Fragments. *Journal of Molecular Biology*, v. 305, n. 5, p. 989–1010, 2001.

WROBLEWSKI, T.; TOMCZAK, A.; MICHELMORE, R. Optimization of *Agrobacterium* -mediated transient assays of gene expression in lettuce , tomato and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal*, v. 3, n. 2, p. 259–273, 2005.

YANG, L. et al. RNA silencing is induced by the expression of foreign recombinant products in transgenic rice. *Plant Science*, v. 225, p. 138–146, 2014.

YOSHIKAWA, M. Pre - microRNA processing activity in nuclear extracts from *Arabidopsis* suspension cells. *Journal of Plant Research*, v. 130, n. 1, p. 75–82, 2016.

YUASA, N.; KOYAMA, T.; YAMAGUCHI, Y. Purification and refolding of anti-T-antigen single chain antibodies (scFvs) expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *BioScience Trends*, v. 8, n. 1, p. 24–31, 2014.

YUSIBOV, V.; KUSHNIR, N.; STREATFIELD, S. J. Antibody Production in Plants and Green Algae. *Annual Review of Plant Biology*, v. 67, n. 1, p. 669–701., 2016.

ZHANG, L. et al. Monoclonal antibody blocking the recognition of an insulin peptide-MHC complex modulates type 1 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 111, n. 7, p. 2656–61, 2014.

ZHANG, Y. H. P.; SUN, J.; MA, Y. Biomanufacturing: history and perspective. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 44, n. 4, p. 73–784, 2016.

ZUPAN, J. et al. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: A feast of fundamental insights. *Plant Journal*, v. 23, n. 1, p. 11–28, 2000.