

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Letícia Hágale de Queiroz

Expressão de anti IL-1 β scFab em *N. benthamiana* para biossensores

Juiz de Fora

2023

Letícia Hágale de Queiroz

Expressão de anti IL-1 β scFab em *N. benthamiana* para biossensores

Dissertação apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Marcelo de Oliveira Santos

Co-orientador: Ms. Matheus Aragão Motta

Juiz de Fora

2023

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

Queiroz, Leticia Hagale de.

Expressão de anti IL-1 β scFab em *N. benthamiana*
parabiossensores / Leticia Hagale de Queiroz. --
2023.

32 f.

Orientador: Marcelo de Oliveira

SantosCoorientador: Matheus

Aragão Motta

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências
Biológicas, 2023.

1. Anticorpos monoclonais. 2. Interleucinas. 3.
Biossensores. 4. Diagnósticos. 5. Expressão vegetal. I.
Santos, Marcelo de Oliveira, orient. II. Motta, Matheus
Aragão, coorient. III. Título.

Letícia Hágale de Queiroz

Expressão de anti IL-1 β scFab em *N. benthamiana* para biossensores

Dissertação apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em 10 de janeiro de 2023

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 MARCELO DE OLIVEIRA SANTOS
Data: 10/02/2023 16:02:14-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Documento assinado digitalmente
 ARIPUANA SAKURADA ARANHA WATANABE
Data: 21/03/2023 20:45:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Aripuanã Sakurada Aranha Watanabe

Universidade Federal de Juiz de Fora

Documento assinado digitalmente
 CARLOS MAGNO DA COSTA MARANDUBA
Data: 10/02/2023 17:54:17-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba

Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma colaboraram na minha formação e na execução desse projeto.

Em especial, dedico meus agradecimentos primeiramente aos meus pais Rita Hágale e Walder Queiroz pelo esforço para uma educação de qualidade e ao apoio desde a escolha até a minha formação no curso.

Ao meu irmão Guilherme Queiroz pelas conversas e trocas sobre a graduação.

Ao meu orientador Dr. Marcelo Santos pela oportunidade e ensinamentos no Laboratório de Engenharia Genética de Plantas.

Ao professor Dr. Aripuanã Watanabe pela oportunidade, ensinamentos e disposição no projeto que sempre sonhei.

Ao professor Dr. Carlos Maranduba pela última disciplina da graduação que me permitiu lembrar a paixão pela área.

Ao amigo Yuri Baumgartner pela companhia, apoio emocional e profissional da pessoa incrível que é.

As amigas Regina Sarah Monferrari e Thayane Cristine Arruda pela amizade, companhia e apoio ao qual sempre pude e contar desde a escola.

As amigas Leslie Altomari, Marina Leal e Monique Borges que me acompanharam durante todos os momentos da graduação com senso de humor e sinceridade.

Ao amigo Thiago Andrei pela amizade, compreensão e apoio na área de atuação em todos os momentos.

Ao amigo e co-orientador Matheus Aragão pela amizade, dedicação e oportunidade de acompanhar seu trabalho e aprender da melhor forma que pude imaginar.

Aos intercambistas da Busan University of Foreign Studies do semestre 2022/3, em especial Han Seungyeon e Lee Sojeon pela amizade, apoio e auxílio na reta final e no futuro da minha formação.

A todos os colegas de laboratório pelo companheirismo e disposição para ajudar.

Ao apoio e fomento à pesquisa pela agência FAPEMIG.

A todos, meus mais sinceros agradecimentos.

“Se não arriscarmos, não podemos criar um futuro!”

- Monkey D. Luffy

RESUMO

A interleucina-1 β é uma citocina pró inflamatória que age na resposta imunológica do corpo. Em algumas doenças como as autoimunes, cardiovasculares e o câncer os níveis elevados de IL-1 β estão relacionados a um fenômeno conhecido como tempestade de citocinas. Em que a ativação das citocinas é desregulada na resposta imunológica e podem causar danos ao corpo. Por isso, a IL- β é um alvo importante no tratamento e diagnóstico de doenças. Junto com a tecnologia emergente dos biossensores, a IL-1 β pode ser capaz de realizar testes rápidos, específicos e sensíveis para diversas doenças. Com o objetivo de expressar uma anti IL-1 β em célula vegetal para diagnóstico em biossensor, realizamos a modelagem computacional da proteína, expressão em *N. benthamiana* e teste em biossensor de óxido de grafeno e fibra óptica. Por meio do trabalho, foi possível elaborar uma molécula anti IL-1 β scFab e, a partir de novos testes possui potencial para ser usada como bioreceptor em biossensores para diagnósticos.

Palavras-chave: Anticorpos monoclonais; Interleucinas; Expressão vegetal; Diagnósticos; Biossensores.

.

ABSTRACT

Interleukin-1 β is a pro-inflammatory cytokine that acts on the body's immune response. In some diseases such as autoimmune, cardiovascular and cancer, elevated levels of IL-1 β are related to a phenomenon known as cytokine storm. In which the activation of cytokines are dysregulated in the immune response and can cause harm to the body. Therefore, IL- β is an important target in the treatment and diagnosis of diseases. Along with emerging biosensor technology, IL-1 β may be able to perform rapid, specific, and sensitive tests for a variety of diseases. With the aim of expressing an anti-IL-1 β in a plant cell for diagnosis in a biosensor, we carried out computational modeling of the protein, expression in *N. benthamiana* and testing in a graphene oxide and fiber optic biosensor. Through the work, it was possible to elaborate an anti-IL-1 β scFab molecule and, based on new tests, it has the potential to be used as a bioreceptor in diagnostic biosensors.

Keywords: Monoclonal antibodies; Interleukins; Vegetable expression; Diagnostics; Biosensors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Esquema geral das partições de um biossensor	15
Figura 2	Leitura de frequência e potência do sinal gerado através do reconhecimento do antígeno alvo pelo biossensor	21
Figura 3	Modelo final com a otimização por restrição de contato	24
Figura 4	Desenho do vetor final pK7GW2D para sistema de expressão de proteína em plantas	24
Figura 5	Transformação genética de <i>N.benthamiana</i>	25
Figura 6	Validação de transformação em gel de sacarose	26
Figura 7	Tecidos vegetais em microscópio de fluorescência	26
Figura 8	Géis de acrilamida a 15% com proteínas recombinantes.	28
Figura 9	Géis de acrilamida a 15% com proteína total	28

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	Resultados da viabilidade da sequência.	23
Quadro 2	Resultado dos modelos obtidos no Modeller 10v1.	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IL-1	Interleucina 1
IL-1 α	Interleucina 1 alfa
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-R1	Interleucina 1 receptor tipo 1
IL-R2	Interleucina 1 receptor tipo 2
NF-kappaB	Fator nuclear kappa B
AP-1	Proteína ativadora 1
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
CAPS	Síndromes periódicas associadas à criopirina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ITO	Óxido de índio estanho
IL-6	Interleucina 6
ICE	Instituto de Ciências Exatas
MS	Murashige e Skoog
RMSD	Root Mean Square deviation
PCR	Polimerase chain reaction
GFP	Green fluorescent protein
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	METODOLOGIA.	17
2.1	PROVA DE VIABILIDADE COM IL-1 COMERCIAL EM BIOSENSOR DE ÓXIDO DE GRAFENO.....	17
2.2	CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO PARA PLANTAS.....	18
2.3	TRANSFORMAÇÃO ESTÁVEL DE ANTICORPO MONOCLONAL EM <i>N.</i> <i>benthamiana</i>	19
2.4	EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E SDS-PAGE DA PROTEÍNA	20
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.	21
3.1	PROVA DE VIABILIDADE COM IL-1 COMERCIAL EM BIOSENSOR DE ÓXIDO DE GRAFENO.....	21
3.2	CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO PARA PLANTAS.....	22
3.3	TRANSFORMAÇÃO ESTÁVEL DE ANTICORPO MONOCLONAL EM <i>N.</i> <i>benthamiana</i>	25
3.4	EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E SDS-PAGE DA PROTEÍNA	26
4	CONCLUSÃO	28
	REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

A interleucina 1 (IL-1) é uma citocina pró inflamatória com papel central na resposta imune à infecção, dano tecidual e outros estímulos. A sua produção acontece em diferentes células como macrófagos, monócitos e células dendríticas, e atua em diferentes tipos de células para estimular a produção de outras citocinas, quimiocinas e moléculas envolvidas na inflamação e na defesa imunológica (DINARELLO, 2019; FIELDS; GÜNTHER; SUNDBERG, 2019; KANEKO et al., 2019; MANTOVANI et al., 2019).

Os principais tipos de IL-1 são a IL-1 α e a IL-1 β , que apesar da semelhança estrutural são codificadas por genes diferentes, o que as dão pequenas diferenças estruturais, funcionais e em como são reguladas. Enquanto a IL-1 α já está ativa e é precursora do sinal junto ao receptor IL-1RI, a IL-1 β precisa ser clivada pela caspase 1 que é ativada pelo inflamassoma, um complexo multiproteico citosólico que detecta a presença de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), padrões moleculares associados a perigos (DAMPs) e danos teciduais (DINARELLO, 2019; FIELDS; GÜNTHER; SUNDBERG, 2019; MANTOVANI et al., 2019).

Com a ativação da IL-1 por estes estímulos são produzidas e liberadas no sangue a IL-1 α e IL-1 β . Uma vez ativadas ligam-se aos seus respectivos receptores: IL-1 receptor tipo 1 (IL-1R1) e IL-1 receptor tipo 2 (IL-1R2). IL-1R1 é expresso em uma ampla variedade de tipos de células, enquanto IL-1R2 é expresso principalmente em células imunes. A ligação da IL-1 aos seus receptores ativa uma cascata de sinalização que leva à ativação de fatores de transcrição como o fator nuclear kappa B (NF-kappaB) e a proteína ativadora 1 (AP-1), que então regulam a expressão de vários genes envolvidos na inflamação e na defesa imunológica (FIELDS; GÜNTHER; SUNDBERG, 2019).

Essa cascata desencadeada pela ativação da IL-1 pode elevar os níveis dessa e de outras citocinas no sangue em um fenômeno chamado tempestade de citocinas. Quando os níveis de IL-1 β são elevados uma variedade de doenças incluindo distúrbios autoimunes, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer são relacionados a ela (PYRILLOU; BURZYNSKI; CLARKE, 2020), assim como a Sars-Cov-2 severa, em que a tempestade de citocinas está relacionada a piora dos casos clínicos dos pacientes (COPERCHINI et al., 2020, MCGONAGLE et al., 2020, XU et al., 2020).

Em distúrbios autoimunes, a IL-1 β desempenha um papel no desenvolvimento e progressão de condições como artrite reumatoide, psoríase e doença de Crohn (MIGLIORINI et al., 2020). Demonstrou-se que a IL-1 β estimula a produção de outras citocinas pró-

inflamatórias, levando a inflamação e dano tecidual nessas condições (DINARELLO, 2019; MANTOVANI et al., 2019; MIGLIORINI et al., 2020))

Nas doenças cardiovasculares, demonstrou-se que a IL-1 β contribui para o desenvolvimento da aterosclerose, uma condição na qual a placa se acumula nas artérias, levando a um risco aumentado de ataque cardíaco e derrame. A IL-1 β também foi implicada no desenvolvimento de hipertensão (pressão alta) e insuficiência cardíaca (ABBATE et al., 2020; VAN TASSELL et al., 2018)

No câncer, foi demonstrado que a IL-1 β promove o crescimento e a proliferação de células cancerígenas, bem como a formação de novos vasos sanguíneos que suportam o crescimento de tumores como no fibrosarcoma, melanoma, câncer de fígado, pâncreas e mama (BAKER; HOUSTON; BRINT, 2019). Além disso, demonstrou-se que a IL-1 β suprime a resposta imune ao câncer, levando a uma diminuição da capacidade de montar uma resposta imune eficaz contra as células cancerígenas (MANTOVANI; BARAJON; GARLANDA, 2017; WOOFF et al., 2019; ZHANG; BORCHERDING; KOLB, 2020).

Além de seu papel nessas doenças, a IL-1 β também foi implicada em outras condições, como a síndrome da fadiga crônica, doença periodontal, doenças neurodegenerativas como Alzheimer e esclerose múltipla (KANEKO et al., 2019, MIGLIORINI et al., 2020, PYRILLOU; BURZYNSKI; CLARKE, 2020, WOOFF et al., 2019).

Sabendo da presença elevada de IL-1 β em diversas doenças desenvolveu-se tratamentos que reduzem seus níveis como o *Anankira*® usado no tratamento de artrite reumatoide que se liga aos receptores da IL-1; *Canakinumab*® usado no tratamento de adultos e crianças com doenças inflamatórias genéticas raras denominadas síndromes periódicas associadas à criopirina (CAPS), com alvo a IL-1 β e *Rilonacept*® usado também no tratamento da CAPS, mas que atua como um receptor chamariz, ligando-se à IL-1 e impedindo-a de ativar seus próprios receptores (DINARELLO, 2019, KANEKO et al., 2019).

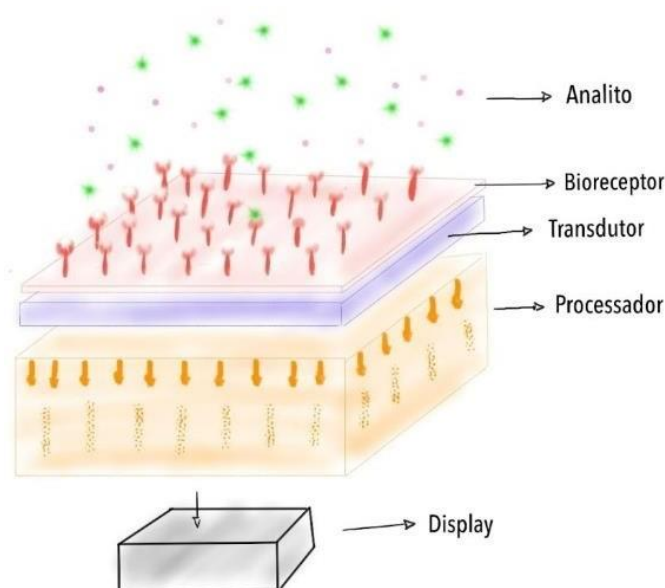
Esses medicamentos geralmente são administrados por injeção ou infusão e podem ser eficazes na redução da inflamação e na melhora dos sintomas em pacientes com condições que envolvem superprodução de IL-1. Porém, são produzidos em células animais o que elevam os custos e os torna pouco acessíveis à população (HERNANDEZ et al., 2018). Isso porque a plataforma animal possui um alto custo de produção, e por isso, alternativas como a plataforma vegetal são estudadas para sintetizar proteínas complexas com rapidez, fácil escalonamento, resistência a patógenos e capacidade de elaborar modificações pós transacionais. (CATELLANI et al., 2020, BUYEL; TWYMAN; FISCHER, 2017).

Assim como a IL-1 β pode ser usada como alvo de tratamentos, também se apresenta como ferramenta de diagnósticos em determinadas condições como as citadas anteriormente, em que níveis elevados de IL-1 β podem ser uma indicação de inflamação ou resposta imune desregulada (KANEKO et al., 2019). Portanto, podem ser usadas para ajudar a diagnosticar e monitorar essas doenças por medição no sangue ou outros fluidos corporais (KURT et al., 2007).

Atualmente, existem vários métodos disponíveis para medir os níveis de IL-1 β , incluindo Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISAs) e ensaios multiplex. Esses métodos geralmente são sensíveis e específicos, mas podem ter algumas limitações, incluindo a necessidade de equipamentos especializados e pessoal qualificado (VILA et al., 2017). Por isso, como alternativa no mercado, os estudos sobre biossensores têm sido cada vez maiores (MOHANKUMAR et al., 2021).

Um biossensor é um dispositivo que usa um elemento de reconhecimento biológico (como uma enzima, anticorpo ou sonda de DNA) para detectar e medir um analito específico (como um composto químico, proteína ou vírus). Como mostra a figura 1, o elemento de reconhecimento biológico é combinado com um transdutor, que converte a resposta biológica em um sinal elétrico que pode ser medido e analisado após uma amplificação e processamento do sinal (PUROHIT et al., 2020).

Figura 1. Esquema geral das partições de um biossensor.



Com isso, os biossensores são amplamente utilizados em uma variedade de aplicações incluindo diagnósticos médicos, mas também monitoramento ambiental, testes de segurança alimentar e descoberta de medicamentos (PUROHIT et al., 2020). Existem muitos tipos diferentes de biossensores e por isso são categorizados de diferentes maneiras a depender do seu transdutor, molécula de reconhecimento biológico e aplicação. Como são os casos de biossensores que utilizam moléculas baseados em enzimas, imunossensores ou biossensores de DNA. Além disso, são projetados para detectar um analito específico e pode usar uma variedade de diferentes mecanismos de transdução para isso, os categorizando também como óptico, eletroquímico ou piezoelétrico. Existem muitos outros tipos de biossensores, cada um com suas próprias características e aplicações específicas (CONROY et al., 2009, PUROHIT et al., 2020).

Em geral, os biossensores oferecem um método rápido, sensível e específico para detectar e medir vários analitos. São uma ferramenta importante em vários campos e continuam a evoluir e melhorar à medida que novas tecnologias e abordagens são desenvolvidas (PUROHIT et al., 2020). Assim como os trabalhos já realizados para analisar 25-HydroxyvitaminD3 (LEE; NGUYEN; GU, 2017), câncer de pulmão e brônquios, mama, próstata e cólon (SHARIFIANJAZI et al., 2021), IL-1 β por meio de dispositivo ITO (AYDIN; SEZGINTÜRK, 2018), IL-6 (KHAN; MUJAHID, 2020), vírus como Dengue, Ebola, Zika, HIV (KHAN et al., 2020) e Sars-cov-2 (MADDALI et al., 2020) demonstram.

No entanto, também existem desafios para o desenvolvimento e uso de biossensores, incluindo a necessidade de elementos de reconhecimento biológico robustos, estáveis e reprodutíveis, bem como a necessidade de dispositivos fáceis de usar, portáteis e acessíveis (PUROHIT et al., 2020). Quando utilizados os anticorpos, os biossensores são caracterizados como imunossensores e a partir das propriedades de ligação específicas dos anticorpos é possível detectar e medir a presença de um antígeno específico em uma amostra (CONROY et al., 2009).

Para suprir as necessidades do biossensor o anticorpo pode ser usado inteiro de forma direta ou imobilizados em um suporte sólido, como uma placa de microtitulação ou uma nanopartícula. Os anticorpos oferecem várias vantagens sobre os métodos analíticos tradicionais, incluindo alta sensibilidade, especificidade e rapidez, bem como a capacidade de realizar medições no local de atendimento ou em tempo real (CONROY et al., 2009, MOHANKUMAR et al., 2021, PUROHIT et al., 2020).

Por isso, utilizar uma plataforma de produção do anticorpo barata junto a um biossensor se tornou uma opção viável para diagnósticos mais eficientes (CONROY et al., 2009). A alta sensibilidade, especificidade, rapidez, portabilidade e reutilização são parâmetros importantes em diagnósticos e cada vez mais necessários como presenciamos com a carga crescente de doenças infecciosas, incluindo infecções emergentes e reemergentes, como influenza, Ebola e COVID-19 (HANSON et al., 2020, LOZANO et al., 2012).

Nestas situações, testes de diagnóstico rápido podem ajudar a identificar e isolar indivíduos infectados, e assim, ajudar a controlar a propagação da infecção e proteger a saúde pública (LOZANO et al., 2012). A melhora no diagnóstico de doenças é capaz de reduzir o tempo de entrega do resultado ao paciente e determinar o curso de tratamento adequado. Isso é especialmente importante em emergências, onde um diagnóstico rápido é fundamental para fornecer atendimento eficaz (HANSON et al., 2020).

Dispositivos de diagnóstico mais rápidos também podem ajudar a reduzir o número de testes e procedimentos desnecessários, o que pode economizar tempo e recursos e melhorar os resultados dos pacientes (LOZANO et al., 2012). A partir disso, consegue-se reduzir a necessidade de hospitalização, testes especializados e outros recursos que permitem uma economia de custos para pacientes e profissionais de saúde (GOLINELLI et al., 2020).

Portanto, uma molécula eficaz para o reconhecimento biológico e o desenvolvimento e uso de dispositivos de diagnóstico mais rápidos e baratos podem ajudar a melhorar os resultados dos pacientes, reduzir a carga de doenças e reduzir os custos com saúde (HANSON et al., 2020, LOZANO et al., 2012, GOLINELLI et al., 2020). Considerando todos os aspectos apresentados até aqui, o trabalho visou expressar uma anti-IL-1 β em *N. benthamiana* para diagnósticos em biossensor.

2 METODOLOGIA

2.1. PROVA DE VIABILIDADE COM IL-1 COMERCIAL EM BIOSENSOR DE ÓXIDO DE GRAFENO

Com o objetivo de verificar a capacidade de conjugar um anticorpo com o aparato já desenvolvido pelo Departamento de Física e o Departamento de Engenharia da UFJF foi realizado um teste de prova de conceito. Nessa etapa, verificou-se a possibilidade de utilizar uma IL-1 comercial (OptEIA™ Human IL-1 β ELISA Kit II) para identificar a anti-IL-1 também comercial na tecnologia já existente, similar ao que se pretende realizar com a produzida em laboratório.

O biossensor cedido é baseado em fibra óptica e óxido de grafeno e sua montagem foi inteiramente realizada pelos departamentos do ICE. Após a montagem do biossensor foi realizado um teste para testar a ligação em diferentes concentrações (50, 2500 e 5000 picogramas).

2.2. CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO EM PLANTAS

A sequência de aminoácidos da proteína alvo foi obtida a partir da sequência scFab da droga *Canakinumab*® e modificada com o *linker* de glicina unindo as cadeias leve e pesada do anticorpo. A partir da sequência do fragmento foram realizadas análises sobre a sua viabilidade por meio do *ProtParam* (web.expasy.org/protparam/) e o *AlgPred* (crdd.osdd.net/raghava/algpred/).

Sabendo da viabilidade da sequência, a proteína molde foi selecionada a partir do alinhamento local da sequência no BLASTp (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins1). Com uma identidade de 98% o modelo foi construído a partir da *Canakinumab*®. O modelo foi construído a partir de modelagem comparativa (*template based*) da estrutura cristalográfica do *Canakinumab*® do Protein Data Ban (rcsb.org/) de ID 4G6J.

Após a seleção da estrutura de referência, foi realizado um alinhamento global entre a sequência de aminoácidos da molécula-alvo com o *template* utilizando o algoritmo CLUSTALW (ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/). A construção do modelo foi feita na presença de água no *software* Modeller10v1 (salilab.org/modeller/), um programa de modelagem estrutural comparativa por satisfação de restrições espaciais. Nele foram obtidos 10 modelos tridimensionais para a anti-IL-1 β -sc Fab que foram alinhados um a um com o template e avaliados segundo os valores RMSD.

A partir desses valores e da visualização no Pymol, notou-se um desvio dos modelos em relação ao template. Uma interferência do linker nos modelos devido a sua posição. Como solução aplicou-se restrições de contato para encurtar sua distância à 6 Å (desvio padrão = 0,5 Å) dos resíduos S121-F374, S162-V421, K45-F352, L98-L292 e S232-S413. A validação dos modelos foi feita nos programas Procheck (ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/) e no próprio Modeller para análise da qualidade estereoquímica. Além de análise visual no PyMOL (pymol.org/2/), um sistema gráfico molecular gratuito de plataforma cruzada que permite, além da visualização e geração de imagens de alta qualidade, a análise de dados moleculares.

A partir da modelagem, a sequência do gene foi estabelecida e sintetizada comercialmente (Integrated DNA Technologies, EUA) no plasmídeo pUCIDT-Kan. Em seguida, clonado no vetor binário pENTR 4 (Thermo Fisher Scientific, EUA) por meio da atuação das enzimas de restrição XhoI/NcoI e ligase T4. Por fim, utilizando o método de Gateway da LR clonase (Thermo Fisher Scientific, EUA) o gene recombinante foi transferido para o vetor final pK7GW2D.

O vetor final teve a sequência com códons otimizados para expressão vegetal, além da inclusão de genes EgfpER e NPTII para seleção positiva e negativa das plantas; genes de resistência aos antibióticos rifampicina, gentamicina e espectinomicina para que fosse possível passar pelas futuras etapas de seleção negativa; promotor *Cauliflower mosaic virus* 35S, já que a expressão foi inteiramente voltada a planta e proteína *reporter* GFP (para seleção positiva). Para confirmação das etapas de clonagem foram usados meio de gel de Agarose 1% corados com Sybr Safe.

2.3. TRANSFORMAÇÃO ESTÁVEL DE ANTICORPO MONOCLONAL EM *N. benthamiana*

A transformação estável foi realizada como descrito em MOTTA,2022, utilizando *N. benthamiana* obtidas por germinação em condição estéril, luz constante (fotoperíodo de 16h e fótons a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e temperatura estável ($25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$) em meio Murashige e Skoog pH 5,8 (MS; Murashige & Skoog, 1962) contendo 0,7% (p/v) de ágar em pó e 3% (p/v) de sacarose. As condições foram mantidas durante 4 a 6 semanas até serem selecionadas para a transformação gênica.

Na transformação genética foi usada uma colônia individualizada da linhagem *Rhizobium radiobacter* GV3101 carregando o vetor pK7-anti-IL1 β estabelecido por eletroporação. A colônia foi inoculada em meio LB suplementado com 50 mg/L de rifampicina, 50 mg/L de gentamicina e 50 mg/L de espectinomicina. Em seguida, a colônia em meio LB foi conduzida por dois dias a crescimento bacteriano em uma temperatura de 28°C e agitação de 180 rpm. Após esse período foi feita a centrifugação a 5.000 rpm e a ressuspensão em meio MS com 20 μM de acetoseringona até alcançar densidade óptica de $(\text{OD})_{600} = 0,1$.

Foram selecionados 60 explantes foliares de *N. benthamiana* com 1cm^2 , que foram perfurados com bisturi e colocados em meio MS ressuspensionado por 30 minutos em agitação constante. Os explantes foram retirados e secados em papel filtro e colocados em meio MS

para co-cultura ao longo de 48 horas. Passado o período de co-cultura em meio líquido, os explantes foram lavados em água destilada, secados novamente e realocados em meio MS sólido com 100 mg/L de canamicina e 200 mg/L de timentin. Para ser usada como controle utilizou-se 5 explantes diretamente expostos a meio de seleção.

Após duas a três semanas depois da co-cultura, os 23 clones que surgiram foram transferidos para novos meios MS com antibióticos. A seleção negativa foi conduzida de modo gradativo para evitar contaminação seguindo as concentrações de 50 mg/L de canamicina e 200 mg/L de timentin; 50 mg/L canamicina e 100 mg/L timentin; e 50 mg/L canamicina. Em seguida, os clones foram subcultivados e mantidos por três a quatro semanas nas mesmas condições de germinação para obtenção de material para verificação da transformação por PCR e microscopia de fluorescência para identificação de GFP.

O DNA foi extraído previamente por CTAB (2% CTAB; 1,4M NaCl; 100 mM Tris-HCl pH 8; 20 mM EDTA; 0,2% β -mercaptoetanol, 400 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico-24:1). Na PCR o DNA foi usado em concentração entre 150-50 ng com primers flanqueadores da região Attr1 e Attr2 do pK7GW2D R:5'-TCATTTGGAGAGGACTCCGGTA-3' e F: 5'-TTTTTGC GGACTCTAGCATGG-3' cada um a 0,5 μ M e *Taq DNA Polimerase* a 5 U (Ludwig Biotecnologia Ltda, Brasil), dNTP a 0,4 mM, tampão 1X (*Promega GoTaq buffer*) e MgCl₂ a 1,8 mM. O aquecimento foi conduzido no período inicial a 95° C por 5 minutos, em 35 ciclos posteriores de 1 min a 95°C, 1 minuto a 62°C e 1 minuto a 72°C, finalizando com uma etapa de 5 minutos a 72°C. As amostras finais foram aplicadas em gel de agarose 1% com Sybr Safe (Life Technologies, EUA) e postas em cuba de eletroforese a 100 mV.

Para visualização do GFP as plantas de cada clone tiveram folhas retiradas após três semanas e colocadas em banho com etanol 70% (v/v) durante três dias. Em seguida, foram secadas, achatadas entre lâmina/lamínula e levadas ao microscópio de fluorescência com irradiação da luz 500 nm de comprimento de onda.

2.4. EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E SDS-PAGE DA PROTEÍNA

Para extração da proteína as plantas tiveram as folhas recolhidas e pesadas para cálculos posteriores e foram pulverizadas com nitrogênio líquido em cadinho de porcelana até obter um pó fino. O pó foi coletado em tubos onde adicionou-se a solução tampão (Tris-HCl 5mM pH 6,7, SDS 2% p/v, sacarose 8% p/v e inibidor de protease leupeptina 0,5 μ g/ml, pepstadina 0,07 μ g/ml, inibidor de tripsina 500 μ g/ml e PMSF 2 μ g/ml) que foi levada a centrifugação duas vezes em 4°C por 30 min a 5000 rpm.

Com o sobrenadante, realizou-se a purificação em coluna cromatográfica HisTrap HP 5 mL impregnada por níquel (GE Healthcare), realizado de acordo com as orientações do fabricante. O gradiente de imidazol para eluição dos scFab foi a 500mMAs e as frações obtidas foram submetidas aos métodos de quantificação por *bicinchoninic acid assay* (BCA) com leitura por NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, EUA).

As plantas foram mantidas em manutenção e a partir de outros testes de quantificação de proteínas em cada clone escolheu-se o clone P20 para o SDS-PAGE, porém ainda serão feitas melhores purificações e SDS-PAGE com os outros clones a fim de identificar o melhor rendimento. Para confirmação da presença da proteína foi realizado o SDS-PAGE (30 mA) não redutivo de 5-15% (p/v) usando coloração *Coomassie Brilliant Blue* e coloração por impregnação de prata para a proteína total e três frações de proteínas purificadas todas do clone P20.

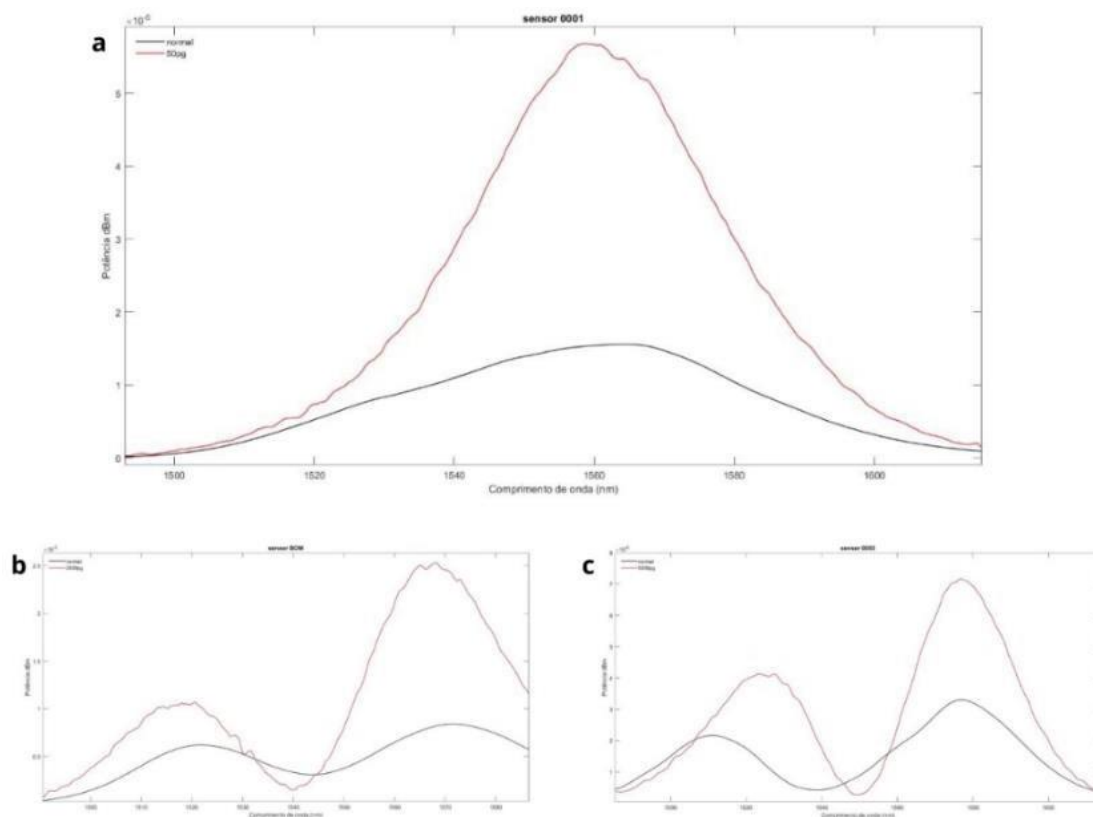
A partir dos primeiros resultados de quantificação verificou-se a necessidade de usar um novo método para verificar o rendimento. A nova quantificação foi feita por Lowry e um novo SDS-PAGE com uma *N. benthamiana* selvagem para controle negativo e um gradiente de albumina para controle positivo e uso na comparação das densidades das bandas foi feito.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. IDENTIFICAÇÃO DE ANTÍGENO EM BIOSSENSOR DE FIBRA ÓPTICA CONJUGADO A ÓXIDO DE GRAFENO

A partir do uso da IL-1 comercial foi possível verificar que o sinal gerado pelo reconhecimento do antígeno alvo apresenta uma frequência e potência maiores. Isso indica que seria viável diferenciar o sinal de leitura do antígeno do sinal basal.

Figura 2. Leitura de frequência e potência do sinal gerado através do reconhecimento do antígeno alvo pelo biossensor.



Legenda: Concentração de antígeno a 50 picogramas (A), 25000 picogramas (B) e 50000 picogramas (C). A linha preta representa o sinal basal e a linha vermelha o sinal gerado pela ligação do anticorpo com o antígeno. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Com base nestes resultados podemos concluir que é possível a conjugação de anticorpos com o sistema fibra óptica e óxido de grafeno desenvolvido pelo Departamento de Física e Engenharia, e que este sistema pode gerar um sinal de leitura identificável. Consequentemente, testes futuros com a anti-IL-1 β scFab laboratorial podem ser feitos a fim de demonstrar sua aplicabilidade em diagnósticos.

3.2. CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO EM PLANTAS

Os resultados obtidos no *ProtParam* demonstraram um pH ótimo, estabilidade da proteína em diversas temperaturas, hidrofobicidade e uma meia vida satisfatória para ensaios biológicos. No *AlgPred* a proteína se mostrou não alergênica e sem epítipo IgE experimentalmente comprovado, importante para seu uso como biofármaco e em biossensor.

Quadro 1. Resultados da viabilidade da sequência.

	ProtParam		AlgPred
pI teórico	7,33	Epítipo IgE	Não alergênico

Peso molecular	49,674 kDa	MAST	Não alergênico
Índice alifático	65,01	Predição por resíduo de aminoácido	0,5589(Não alergênico)
GRAVY	-0,384	Predição por resíduo de dipeptídeo	0,3668(Não alergênico)
Meia vida estimada	1h (reticulócitos, in vitro) 30min (levedura, in vitro) >10h (E. coli, in vitro)	Método híbrido	Não alergênico
Índice de instabilidade	51,66 (instável)	BLAST	Não alergênico

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Os modelos gerados foram validados pelo Modeller e o Procheck com resultados na Tabela 2. O resultado ranquea priorizando os parâmetros do Procheck (i.e. Core, Permitido, Raros e Proibitivos), seguido dos resultados de DOPE e mol pdf concebidos pelo Modeller. Portanto, o melhor modelo foi o número 8. Seus resultados apontam menor valor da função de energia, menor valor de DOPE normalizado e presença de 93,8% dos resíduos em ambientes quimicamente favoráveis.

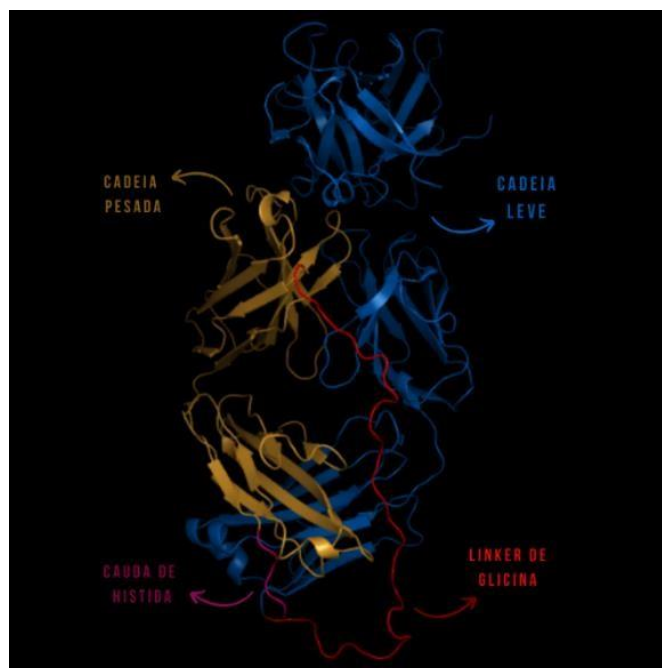
Quadro 2. Resultado dos modelos obtidos no Modeller 10v1.

Modelos	Modeller				Procheck			
	molpdf	DOPE	GA341	DOPE normalizado	Core	Permitido	Raros	Proibitivos
modelo 8	3.660,146480	-61.897,777340	1,000000	-0,701930	93,8%	5,6%	0,20%	0,40%
modelo 4	3.521,037600	-62.163,117190	1,000000	-0,732190	93,6%	6,00%	0	0,40%
modelo 5	3.455,533940	-62.869,757810	1,000000	-0,812770	93,4%	6,20%	0	0,40%
modelo 6	3.448,987300	-62.028,085940	1,000000	-0,716790	93,4%	6,00%	0,20%	0,40%
modelo 1	3.629,662350	-61.168,996090	1,000000	-0,618810	93,2%	6,40%	0	0,40%
modelo 0	3.843,772220	-62.611,648440	1,000000	-0,783340	93,2%	6,20%	0,20%	0,40%
modelo 2	4.374,334470	-60.917,085940	1,000000	-0,590080	93,2%	6,20%	0,20%	0,40%
modelo 7	3.413,744140	-63.044,945310	1,000000	-0,832750	93,2%	6,20%	0,20%	0,40%
modelo 9	3.224,767580	-63.510,019530	1,000000	-0,885790	93,2%	6,00%	0,40%	0,40%
modelo 3	3.654,142090	-61.993,199220	1,000000	-0,712810	93,0%	6,40%	0	0,60%

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Com a otimização dos modelos finais ajustando a restrição de contato do linker com os resíduos obteve-se o modelo final da proteína (Figura 3).

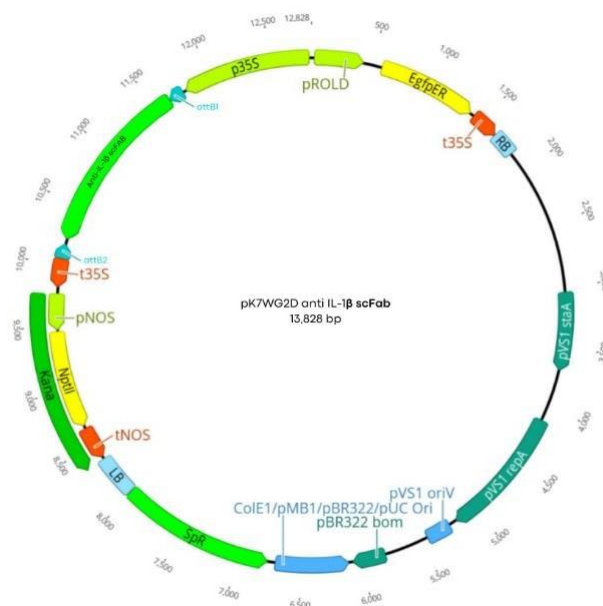
Figura 3. Modelo final com a otimização por restrição de contato.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

A construção da sequência para modelagem foi desenhada a partir da sequência de de forma que possuisse a cadeia leve, o linker, a cadeia pesada e a His-tag para sistema de expressão em plantas (Figura 4).

Figura 4. Desenho do vetor final pK7GW2D para sistema de expressão de proteína em plantas.



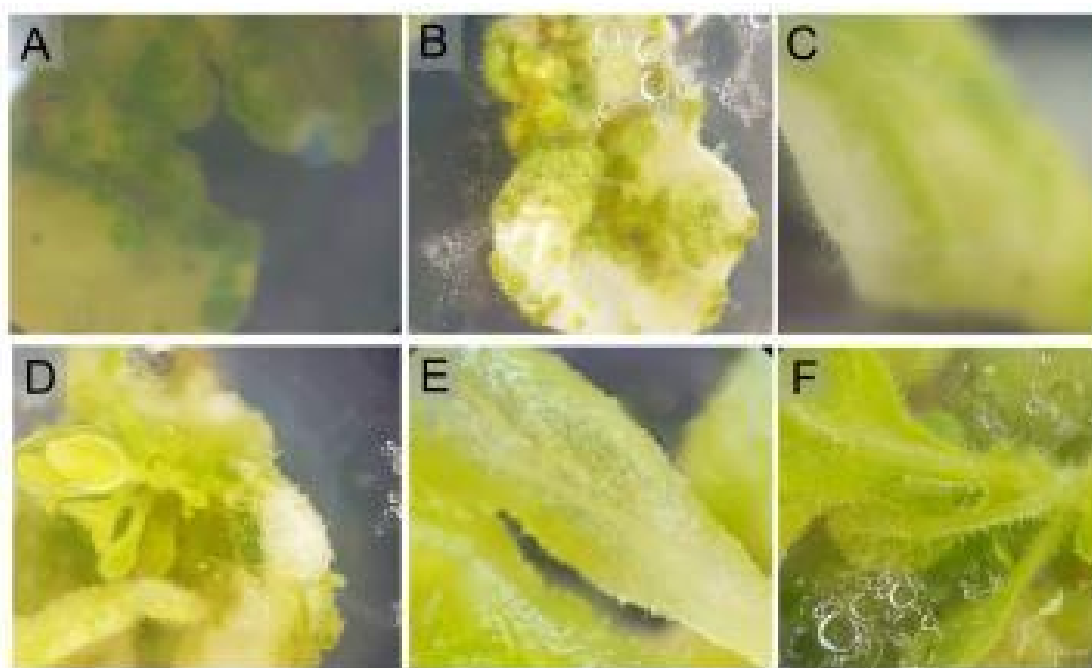
Fonte: Adaptação do vetor disponível em <https://gatewayvectors.vib.be/collection/pk7wg2d> (2022)

3.3. TRANSFORMAÇÃO ESTÁVEL DE ANTICORPO MONOCLONAL EM *N. benthamiana*

Passados três semanas após a co-cultura foi possível perceber o efeito da seleção negativa ocorrendo sobre os explantes (Figura 5). Nas duas semanas seguintes, os tecidos foliares passaram a emitir brotos das regiões perfuradas e ganharam aspecto de calos (Figura f e 5d). Os tecidos afetados pela seleção apresentavam-se com aspecto desclorofilado, típico de morte celular (Figura 5a e 5c e 5b), presente também em toda a extensão foliar das 5 amostras controles.

Dos 60 explantes foliares iniciais, 28 clones foram obtidos e individualizados em novos recipientes com meio de seleção até que tivessem condições para extração de DNA. Quatro dessas plantas apresentaram fenótipos de hiperhidricidade dias depois de serem transferidos ao *magenta box* (Figura 5e).

Figura 5. Transformação genética de *N.benthamiana*.

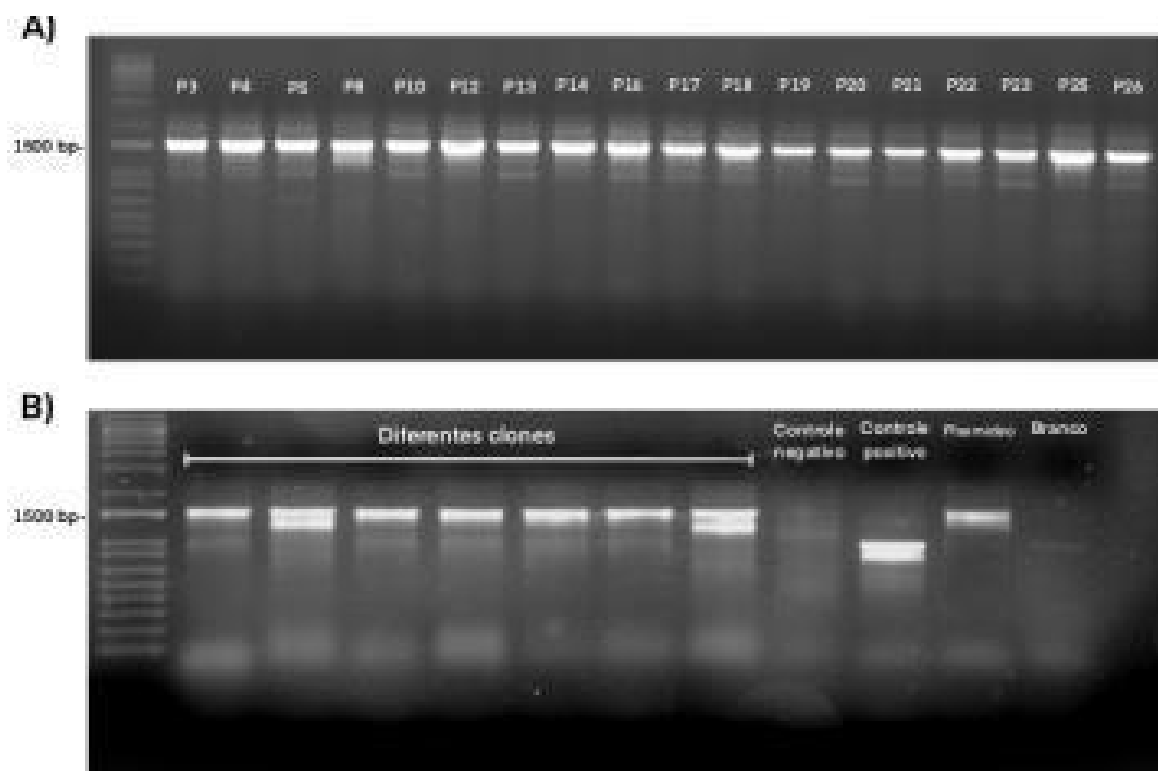


Legenda: Em A,B e C temos brotos em morte celular, já em D,E e F brotos bem sucedidos, porém com E representando hiperhidricidade. **Fonte:** MOTTA, 2022

A extração foi validada pela razão de absorbância 260/280 nm (aplicamos à reação da polimerase somente amostras de pureza na faixa 1,8 a 2,1). O PCR mostrou que 18 clones possuem o gene scFab anti-IL1 β em seus tecidos (Figura 6a), apresentando banda na altura de

~1500 bp. O que implica em uma taxa de regeneração de 46,67% e transformação de 30% (35,71% de evasão da seleção negativa).

Figura 6. Validação de transformação em gel de sacarose.

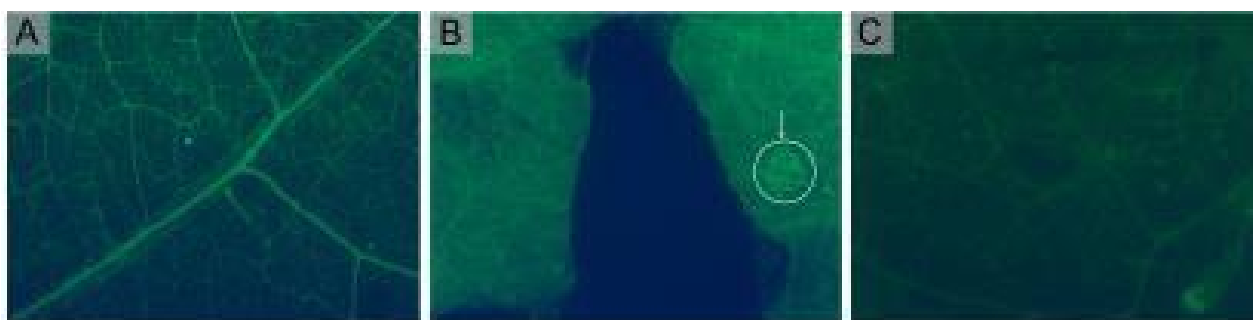


Legenda. Bandas obtidas por PCR em géis de agarose 1%. Em A) é representada em sequência a marcação positiva das plantas transformadas, transformadas, enquanto B) marca os controles.

Fonte: MOTTA, 2022.

Na microscopia por fluorescência para leitura do GFP apenas P17 apresentou pontos de fluorescência.

FIGURA 7. Tecidos vegetais em microscópio de fluorescência.



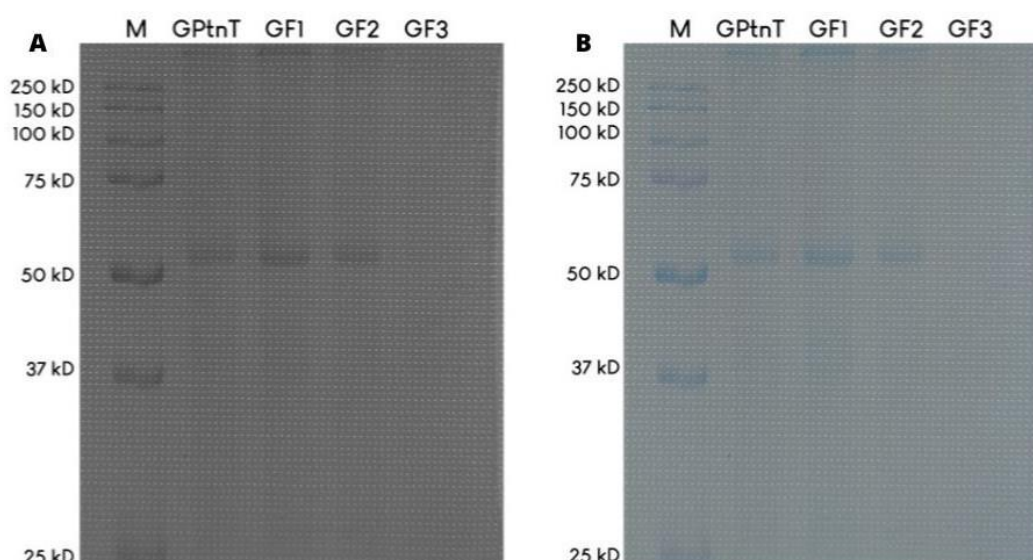
Legenda: Em A) controle negativo, em B) clone P17 e em C) controle positivo. **Fonte:** MOTTA, 2022

3.4. EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E SDS-PAGE DA PROTEÍNA

Na quantificação por BCA as frações das proteínas purificadas foram de 1276µg/ml para a fração 1(GF1), 1120µg/ml para a fração 2 (GF2) e de 0,651µg/ml para a fração 3 (GF3), enquanto a proteína total 1323µg/ml. Portanto o rendimento em relação as proteínas totais solúveis foram 96% para a fração 1(GF1), 84% para a fração 2 (GF2) e 49% para a fração 3 (GF3). Esses valores indicam um alto rendimento de proteína na planta e ainda precisa ser confirmado com outros testes e novas replicações. Em novos estudos também é possível que a partir da caracterização e melhoramento dos clones se tenha um aumento da produção e consequentemente redução dos custos de produção da molécula.

Nos géis do SDS-PAGE foi possível visualizar uma banda única de altura compatível com a massa da anti-IL-1β scFab (~50kDa) tanto na proteína total quanto nas amostras purificadas do clone P20. A densidade da banda em relação ao BCA ainda não permite afirmar com certeza o rendimento da proteína, porém com ajustes em protocolos e mais estudos quanto a caracterização da expressão na planta será possível. Portanto, a proteína foi expressa com sucesso, porém mais teste quanto sua funcionalidade precisam ser feitas como Western-Blot e ELISA. Além de conjugação com o biossensor utilizado na prova de conceito deste trabalho, que dessa fora indicará a capacidade de o anticorpo monoclonal desenvolvido aqui ser utilizado em biossensores e mais adiante, diagnósticos.

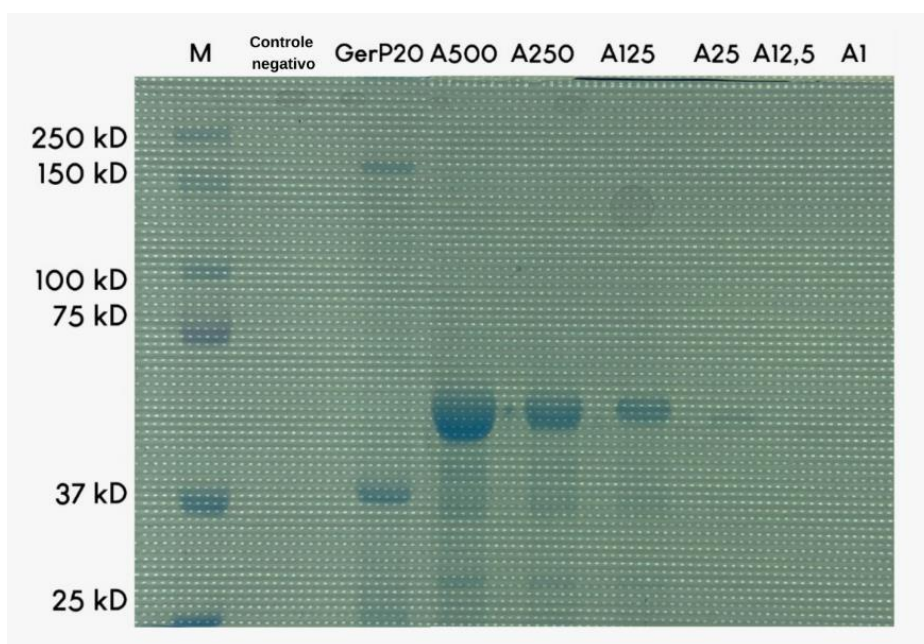
Figura 8. Géis de acrilamida a 15% com proteínas recombinantes.



Legenda: Em A temos o gel corado por coloração por impregnação de prata e em B usando coloração *Coomassie Brilliant Blue*. **Fonte:** Elaborado pelo autor (2022).

Como os valores do BCA não correspondiam a densidade da banda em SDS-PAGE e com a disponível na literatura para outros mABs produzidos em *N. benthamiana*, a nova quantificação foi feita para as frações 1 e 2. Nelas, uma nova concentração correspondente a literatura e a relação as densidades da banda da proteína total do clone P20 com o gradiente de albumina. Os resultados mostraram um valor de 0,94µg/ml e 0,64µg/ml para a fração 1 e 2, respectivamente. O que reforça a densidade das bandas da proteína total estar abaixo de 200µg/ml, mas que ainda será quantificada novamente, com a albumina usada no controle positivo (Figura 9).

Figura 9. Géis de acrilamida a 15% com proteína total.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

4 CONCLUSÃO

A IL-1 é uma citocina inflamatória envolvida em diversas doenças, incluindo as autoimunes, câncer e doenças cardiovasculares. Isso se dá principalmente devido a um fenômeno conhecido como tempestade de citocinas e por isso seu uso farmacológico se tornou alvo de muitas pesquisas (PYRILLA; BURZYNSKI; CLARKE, 2020).

A produção de proteínas recombinantes atualmente é bastante elevada devido ao uso majoritário de plataformas de células animais e, por isso, a plataforma vegetal se tornou uma promessa na produção biofarmacêutica. O uso de plantas para a produção de anticorpos monoclonais pode aliviar o mercado de fármacos e diagnósticos (HERNANDEZ et al., 2018).

Já que os anticorpos são um bioreceptor bem desenvolvido para uma variedade de biossensores, tecnologia inovadora na área de análises moleculares (CONROY et al., 2009).

No atual trabalho foi possível expressar uma anti-IL1 β scFab promissora para uso em medicamentos e biossensores como mostram o SDS-PAGE. No entanto, mais testes são necessários para ambas as aplicações. Visando diagnósticos por meio de biossensores, mais testes precisam ser feitos para avaliar a usabilidade do anticorpo na tecnologia já desenvolvida pelo Departamento de Física e Engenharia, assim como a criação de um novo aparato aplicado especificamente ao diagnóstico.

Com o objetivo de avançar na aplicação do anti-IL1 β scFab em diagnósticos por biossensores é preciso estudos futuros para avaliar a sua sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, seletividade, faixa dinâmica linear, tempo de resposta, tempo de recuperação e avaliação com amostras reais com os analitos. Isso porque, os parâmetros tanto para a melhor atuação do biossensor, como do anticorpo precisam estar definidos. Dessa forma, a melhor tecnologia será desenvolvida e poderá chegar ao sistema de saúde para aliviar os custos, tempo e eficiência dos diagnósticos.

REFERÊNCIAS

- ABBATE, A. et al. Interleukin-1 and the Inflammasome as Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease. **Circulation Research**, v. 126, n. 9, p. 1260–1280, 24 abr. 2020.
- AYDIN, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. A disposable and ultrasensitive ITO based biosensor modified by 6-phosphonohexanoic acid for electrochemical sensing of IL-1 β in human serum and saliva. **Analytica Chimica Acta**, v. 1039, p. 41–50, 18 dez. 2018.
- BAKER, K. J.; HOUSTON, A.; BRINT, E. IL-1 Family Members in Cancer; Two Sides to Every Story. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 7 jun. 2019.
- BUYEL, J. F.; TWYMAN, R. M.; FISCHER, R. Very-large-scale production of antibodies in plants: The biologization of manufacturing. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 4, p. 458–465, jul. 2017.
- CATELLANI, M. et al. Optimised production of an anti-fungal antibody in Solanaceae hairy roots to develop new formulations against *Candida albicans*. **BMC Biotechnology**, v. 20, n. 1, 12 mar. 2020.

CONROY, P. J. et al. Antibody production, design and use for biosensor-based applications. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, n. 1, p. 10–26, fev. 2009.

COPERCHINI, F. et al. The Cytokine storm in COVID-19: An overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, maio 2020.

DINARELLO, C. A. The IL-1 family of cytokines and receptors in rheumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 15, n. 10, p. 612–632, 12 set. 2019.

DIRISALA, V. R. et al. Recombinant pharmaceutical protein production in plants: unraveling the therapeutic potential of molecular pharming. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 1, 7 dez. 2016.

FIELDS, J. K.; GÜNTHER, S.; SUNDBERG, E. J. Structural Basis of IL-1 Family Cytokine Signaling. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 20 jun. 2019.

GOLINELLI, D. et al. How the COVID-19 pandemic favored the adoption of digital technologies in healthcare: a systematic review of early scientific literature (Preprint). **Journal of Medical Internet Research**, v. 22, n. 11, 7 jul. 2020.

HANSON, K. E. et al. Infectious Diseases Society of America Guidelines on the Diagnosis of COVID-19. **Clinical Infectious Diseases**, 16 jun. 2020.

HERNANDEZ, I. et al. Pricing of monoclonal antibody therapies: higher if used for cancer? **The American Journal of Managed Care**, v. 24, n. 2, p. 109–112, 1 fev. 2018.

KANEKO, N. et al. The role of interleukin-1 in general pathology. **Inflammation and Regeneration**, v. 39, n. 1, 6 jun. 2019.

KHAN, M. A.; MUJAHID, M. Recent Advances in Electrochemical and Optical Biosensors Designed for Detection of Interleukin 6. **Sensors**, v. 20, n. 3, p. 646, 23 jan. 2020.

KHAN, M. Z. H. et al. Ultrasensitive detection of pathogenic viruses with electrochemical biosensor: State of the art. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 166, p. 112431, 15 out. 2020.

KURT, A. N. C. et al. Serum IL-1 β , IL-6, IL-8, and TNF- α Levels in Early Diagnosis and Management of Neonatal Sepsis. **Mediators of Inflammation**, v. 2007, p. 1–5, 2007.

LEE, B. H.; NGUYEN, V. T.; GU, M. B. Highly sensitive detection of 25-HydroxyvitaminD 3 by using a target-induced displacement of aptamer. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 88, p.174–180, fev. 2017.

LOZANO, R. et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2095–2128, dez. 2012.

MADDALI, H. et al. Optical Biosensors for Virus Detection: Prospects for SARS-CoV-2/COVID-19. **ChemBioChem**, 9 dez. 2020.

MANTOVANI, A. et al. IL-1 and related cytokines in innate and adaptive immunity in health and disease. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 778–795, 16 abr. 2019.

MANTOVANI, A.; BARAJON, I.; GARLANDA, C. IL-1 and IL-1 regulatory pathways in cancer progression and therapy. **Immunological Reviews**, v. 281, n. 1, p. 57–61, 16 dez. 2017.

MCGONAGLE, D. et al. Immune mechanisms of pulmonary intravascular coagulopathy in COVID-19 pneumonia. **The Lancet Rheumatology**, maio 2020.

MIGLIORINI, P. et al. The IL-1 family cytokines and receptors in autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 19, n. 9, p. 102617, set. 2020.

MOHANKUMAR, P. et al. Recent developments in biosensors for healthcare and biomedical applications: A review. **Measurement**, v. 167, p. 108293, jan. 2021.

MOON, K.-B. et al. Development of Systems for the Production of Plant-Derived Biopharmaceuticals. **Plants**, v. 9, n. 1, p. 30, 24 dez. 2019.

MOTTA, M. A. Modelagem e Expressão do Anticorpo Sintético anti-IL1 em Nicotiana benthamiana Geneticamente Modificada, 2022.

PUROHIT, B. et al. Biosensor nanoengineering: Design, operation, and implementation for biomolecular analysis. **Sensors International**, v. 1, p. 100040, 2020.

PYRILLOU, K.; BURZYNSKI, L. C.; CLARKE, M. C. H. Alternative Pathways of IL-1 Activation, and Its Role in Health and Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 18 dez. 2020.

RADEMACHER, T. et al. Plant cell packs: a scalable platform for recombinant protein production and metabolic engineering. **Plant Biotechnology Journal**, v. 17, n. 8, p. 1560–1566, 14 fev. 2019.

SHARIFIANJAZI, F. et al. Biosensors and nanotechnology for cancer diagnosis (lung and bronchus, breast, prostate, and colon): a systematic review. **Biomedical Materials**, v. 17, n. 1, p. 012002, 24 dez. 2021.

VAN TASSELL, B. W. et al. IL-1 Blockade in Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. **Circulation: Heart Failure**, v. 11, n. 8, ago. 2018.

VILA, J. et al. Métodos de diagnóstico rápido en microbiología clínica: necesidades clínicas. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 35, n. 1, p. 41–46, 1 jan. 2017.

WOOFF, Y. et al. IL-1 Family Members Mediate Cell Death, Inflammation and Angiogenesis in Retinal Degenerative Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 16 jul. 2019.

XU, Z. et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 0, n. 0, 18 fev. 2020.

ZHANG, W.; BORCHERDING, N.; KOLB, R. IL-1 Signaling in Tumor Microenvironment. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, p. 1–23, 2020.