



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**Proteínas recombinantes para aplicações terapêuticas: uma
revisão com ênfase nos vetores e sistemas de expressão**

Gabriela Silveira dos Santos

Orientadora: Isabel Cristina Braga Rodrigues

Ouro Branco

Junho/2015



Proteínas recombinantes para aplicações terapêuticas: uma revisão com ênfase nos vetores e sistemas de expressão

Gabriela Silveira dos Santos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial às exigências do curso de Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos do Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João Del Rei.

Orientadora: Isabel Cristina Braga Rodrigues

Ouro Branco

Junho/2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**Proteínas recombinantes para aplicações terapêuticas: uma
revisão com ênfase nos vetores e sistemas de expressão**

Gabriela Silveira dos Santos

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

Isabel Cristina Braga Rodrigues - Orientadora

Natália Rocha Barboza – Examinador 1

Edson Romano Nucci – Examinador 2

Ouro Branco, ___/___/___

RESUMO

Moléculas formadas por polipetídeos ou proteínas com sequências de aminoácidos idênticas à proteína humana nativa e com aplicações no tratamento de doenças são chamadas biofármacos. O uso dessas proteínas como agentes terapêuticos é uma ideia relativamente nova, porém durante muitos anos a estrutura e as características das proteínas vêm sendo estudadas. A insulina e o hormônio do crescimento humano foram as primeiras proteínas terapêuticas a serem usadas. A insulina era extraída do tecido pancreático animal e o hormônio do crescimento humano obtido da hipófise de cadáveres, preparações estas de segurança reduzida em relação aos riscos de desenvolvimento de efeitos adversos, devido à possibilidade de copurificação de patógenos. Atualmente, com o avanço da biologia molecular, é possível manipular o material genético das células e promover a expressão das proteínas humanas em outros organismos, tornando, por exemplo, o processo de purificação mais eficiente e seguro. Um gene inserido em um sistema de expressão adequado (bactéria, fungo, célula animal ou vegetal) juntamente com o veículo de clonagem, os chamados vetores, que permitem que os fragmentos de DNA a serem clonados sejam introduzidos e propagados em uma célula hospedeira adequada. Existem, no mercado mundial, mais de 350 medicamentos elaborados com o uso da biotecnologia e já estão sendo avaliados novos biofármacos para o tratamento de mais de 150 doenças, como câncer, hepatites, *diabetes mellitus*, entre outras. O presente trabalho procurou discutir as diferentes plataformas de expressão e vetores utilizados na produção de proteínas recombinantes para aplicações terapêuticas e, ainda, exemplificar a construção dos vetores e a seleção das células hospedeiras com a revisão de algumas pesquisas promissoras na produção de citocinas, insulina, eritropoietina e fator IX da coagulação sanguínea.

Palavras-chave: biofármacos, DNA recombinante, vetores, sistemas de expressão.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. OBJETIVO.....	8
2.1 – Objetivos Específicos	8
3. REVISÃO DA LITERATURA	9
3.1 - Aplicação de proteínas recombinantes para a saúde humana.....	12
3.2 – A Tecnologia do DNA Recombinante.....	15
3.3 – Vetores	16
3.4 - Sistemas de expressão para a produção de biofármacos	26
3.5 - Estudos de Caso	32
3.5.1 - Citocinas	32
3.5.1.1 - Interferon cIFN- α	33
3.5.2 - Fatores de crescimento hematopoiético	33
3.5.2.1 - Eritropoietina	34
3.5.3 - Hormônios.....	36
3.5.3.1 - Insulina	36
3.5.4 - Fatores de coagulação sanguínea	37
3.5.4.1 - Fator IX da coagulação sanguínea.....	38
3.6 - Aspectos de mercado.....	39
4. CONCLUSÃO.....	42
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1. INTRODUÇÃO

A tecnologia do DNA recombinante ou engenharia genética consiste em processos de manipulação do DNA, podendo isolar sequências de DNA e inseri-las em uma célula hospedeira, sendo possível, posteriormente, separar e purificar as proteínas produzidas nesse processo. Essa tecnologia abriu novos campos, não só de possibilidades terapêuticas, como também no entendimento de diversas doenças e vem ganhando cada vez mais espaço na economia (SOUSA, 2006; REIS, 2009). O DNA do doador extraído terá os genes de interesse isolados e estes, serão inseridos em vetores e transferidos para uma célula receptora, esta irá amplificar os fragmentos gênicos por replicação do DNA (clonagem) ou, mediante a montagem correta do vetor, com os sinais de expressão adequados, irá expressar a proteína codificada pelo gene clonado (GRIFFITHS *et al.*, 2000).

Os vetores são moléculas de DNA carregadoras que levam outra sequência de DNA para o interior da célula hospedeira. Estes são capazes de amplificar, em centenas de cópias, a informação genética que foi inserida. Isso ocorre devido à presença de sinais moleculares que possibilitam que estes fragmentos de DNA sejam replicados dentro da célula hospedeira, produzindo cópias de DNA recombinante que serão passadas para as células filhas. Além disso, existe a possibilidade da expressão de genes contidos em suas sequências, a expressão ocorrerá devido à presença dos sinais moleculares pertinentes, como as sequências promotoras. Os vetores devem ser de tamanho pequeno e possuir sítios de clonagem onde serão inseridos os fragmentos de DNA estudados (ALBERTS *et al.*, 2009; ZAHA *et al.*, 2014).

As principais aplicações da biotecnologia moderna na área de saúde é o uso da engenharia genética para a produção de biofármacos. Biofármacos são biomoléculas, como proteínas (incluindo anticorpos) e ácidos nucleicos (DNA ou RNA) utilizados para fins terapêuticos ou de diagnóstico *in vivo*. Diferem dos fármacos convencionais por sua estrutura complexa e, conseqüentemente, impossibilidade de síntese química (MADEIRA, 2013).

Segundo Marques (2005), diversos processos utilizando diferentes sistemas de expressão, como células de bactérias (*Escherichia coli*, principalmente), leveduras, fungos filamentosos, células de insetos e de mamíferos, animais e plantas transgênicos, são atualmente empregados na indústria biofarmacêutica para produção de proteínas terapêuticas, como fatores de coagulação sanguínea, anticorpos monoclonais, fatores de crescimento celular, hormônios, citocinas, entre outros.

A escolha do sistema de expressão influencia o carácter, a quantidade e o preço do produto final. E a aplicação da proteína a ser expressa deve ser sempre considerada, o sistema deve ser capaz de expressar a proteína recombinante de modo a se obter o máximo de rendimento por célula cultivada, além da geração de proteínas que tenham a atividade biológica desejada, promovida, principalmente, pelas modificações pós-traducionais corretas. A maioria dos produtos aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) são produzidos usando sistemas procarióticos (bactérias) ou eucarióticos (leveduras ou cultura de células de mamíferos) e que utilizam vetores plasmidiais (MARQUES, 2005).

Embora o sistema de expressão de proteínas heterólogas em *E. coli* seja bastante difundido e mais frequentemente utilizado do que outros, quando se pretende expressar alguma proteína recombinante, o melhor sistema deve ser escolhido de acordo com as características da proteína de interesse, por exemplo, as proteínas que necessitam de glicosilação não são adequadamente expressas neste sistema. Além do sistema de expressão, a escolha dos vetores também é importante. O vetor utilizado deve ser construído de acordo com as informações específicas sobre a proteína, como a sequência extra de amina terminal, além disso, deve existir também, compatibilidade entre o sítio de restrição e a região de leitura. Deve ainda conter os sinais moleculares para expressão e endereçamento da proteína e pode conter outras sequências que facilitem a posterior purificação da proteína heteróloga (MONCLARO, 2013).

De acordo com os diversos avanços da Engenharia Genética, da importância na produção de biofármacos recombinantes que conferem menores riscos aos pacientes em relação a contaminações oriundas do processo de preparação e da

possibilidade de reduzir os custos de produção destas biomoléculas utilizando organismos geneticamente modificados, o presente trabalho fará uma breve revisão da literatura abordando os principais vetores e sistemas de expressão utilizados na produção de proteínas recombinantes com aplicações terapêuticas.

2. OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo abordar as características dos principais vetores e sistemas de expressão utilizados na produção de proteínas recombinantes com aplicações terapêuticas.

2.1 – Objetivos Específicos

- Apresentar as principais características dos vetores de clonagem e expressão utilizados em Engenharia Genética.
- Apresentar as principais características dos principais sistemas de expressão utilizados na produção de proteínas recombinantes.
- Abordar estudos de casos sobre a produção de proteínas recombinantes com aplicações terapêuticas.
- Expor as expectativas de mercado dos biofarmacêuticos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Desde os primórdios os microrganismos são utilizados na produção de alimentos e bebidas. Durante a década de 1940 vários processos de cultivo em massa de microrganismos, em condições estéreis, desencadearam a produção comercial de antibióticos, vacinas, enzimas, aminoácidos e esteróides (VILLEN, 2002).

Também a partir da década de 1940, foram firmadas evidências diretas que o DNA fosse a molécula possuidora da informação genética, sendo o código que determina todas as características dos seres vivos, com os experimentos de Avery e seus colaboradores. Culminando, em 1953, com a formulação da estrutura desta macromolécula por James Watson e Francis Crick. Estes pesquisadores propuseram, utilizando os postulados de Erwin Chargaff (1940) e dados de difração de raios X obtidos por Rosalind Franklin e Maurice Wilkins (1950), que a estrutura do DNA era formada por duas cadeias de nucleotídeos ligadas por ligações fosfodiéster entre os nucleotídeos. Essas cadeias se encontram pareadas em uma orientação antiparalela e unidas por ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas complementares (A/T e C/G). As duas cadeias formam uma hélice que lembra uma escada em espiral onde os degraus são as bases nitrogenadas e o corrimão é formado pelas desoxirriboses e os grupos fosfatos. A partir da definição da estrutura do DNA, os cientistas também propuseram as bases para transmissão da informação genética, na qual a replicação do DNA utilizaria um molde de DNA parental e ocorreria pela complementaridade de bases nitrogenadas (WATSON e CRICK, 1953; REIS, 2009). A partir de então, vislumbrou-se grandes avanços nas técnicas da biologia molecular.

Já na década de 1960, foi possível verificar um grande progresso na decifração do código genético, sendo esta considerada a descoberta mais importante do século, para a genética molecular. A descoberta das enzimas de restrição, em 1978, por W. Arber, H. Smith e D. Nathans, possibilitou a construção de moléculas de DNA recombinante, fazendo com que segmentos específicos de moléculas de DNA de origens diferentes pudessem ser ligados. As enzimas de restrição são proteínas bacterianas, de alta especificidade, capazes de reconhecer uma base específica na

dupla hélice do DNA e cortá-las em fragmentos que sejam facilmente manipulados, tornando possível recombinar ou criar organismos transgênicos (CARUSO 2007; ZAHA *et al.*, 2014).

Outro avanço significativo foi o desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (PCR), por Kary Mullis em 1983. A PCR permite a amplificação *in vitro* de sequências determinadas de DNA a partir de uma amostra de ácido nucléicos e oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para as regiões do DNA que se deseja amplificação. Na presença de uma DNA polimerase termoestável (*Taq* polimerase – polimerase de *Thermus aquaticus*), do par de *primers* e dos desoxirribonucleotídeos (dNTPs) que compõem a molécula de DNA, é possível amplificar a região de interesse a partir de uma quantidade diminuta de DNA (MOLINA e TOBO, 2004; ZAHA *et al.*, 2014).

Estes avanços impulsionaram a Tecnologia do DNA Recombinante, surgindo as perspectivas do início da síntese de uma variedade de proteínas heterólogas, possibilitando novas descobertas que permitiram a criação de vacinas, desenvolvimento de técnicas de seleção e identificação de genes na transferência genética de um organismo para outro, produção de enzimas para aplicação industrial e a produção de moléculas biológicas com fins terapêuticos (CARUSO, 2007; DA ROCHA e MARTIN, 2011).

Proteínas heterólogas, são proteínas recombinantes obtidas a partir da inserção de um gene de um organismo em outro organismo pela tecnologia de DNA recombinante. A produção de proteínas recombinantes heterólogas envolve uma série de passos, como (i) a identificação e caracterização genética da proteína e das suas propriedades bioquímicas; (ii) a definição dos requisitos estruturais para a sua atividade funcional, como as modificações pós-traducionais; (iii) a definição do sistema de expressão, ou seja, das células que irão expressar a proteína recombinante e (iv) a definição do vetor que irá conduzir o gene ao sistema de expressão selecionado (WALSH, 2002; ABDI e CGEE, 2008; PATIÑO, 2011; AMB e INTERFARMA, 2013).

A tecnologia do DNA recombinante permitiu a expressão de proteínas heterólogas em micro-organismos e outras células hospedeiras, possibilitando o isolamento e a transferência de um gene de um organismo para outro resultando em um indivíduo geneticamente igual ao utilizado para receber a molécula de DNA recombinante, porém com uma nova característica genética, proveniente de outro, que não é da mesma espécie, criando, desta forma, um organismo geneticamente modificado (OGM) (GANDER e MARCELLINO, 1997).

Um OGM é aquele que foi submetido a técnicas que modificaram seu genoma. Já o termo transgênico é utilizado para nomear organismos que foram submetidos a técnicas específicas de inserção de uma parte do genoma de outra espécie, conferindo-lhes modificação no genoma original. Portanto, os transgênicos são um tipo de OGM, mas nem todo OGM é um transgênico (COSTA e COSTA, 2009).

O processo da tecnologia de DNA recombinante consiste basicamente na extração do DNA do organismo contendo o gene de interesse, logo após, por intermédio de enzimas de restrição, o DNA é cortado em fragmentos menores. Os genes de DNA isolados são inseridos em pequenos fragmentos de DNA cortados pela mesma enzima de restrição, estes pequenos fragmentos são denominados vetores. A enzima DNA ligase, é responsável por unir as extremidades livres do DNA do vetor e do DNA doador, dando origem ao DNA recombinante. Em seguida, executa-se a fase de transformação, na qual o DNA recombinante é inserido em uma linhagem celular (bacteriana, animal ou de leveduras). Por fim, ocorre o processo de seleção, as células são separadas em transformadas e não-transformadas. Uma única célula recombinante é selecionada para dar origem a outras através da divisão celular, todas as células filhas devem conter uma cópia do vetor portador do gene inserido. Agora, as células são então induzidas a expressar o novo gene. Dependendo de qual o sistema celular selecionado ou da montagem do DNA recombinante, a proteína heteróloga poderá ser encontrada dentro das células ou fora destas, no meio circundante (GRIFFITHS *et al.*, 2000; SOUSA, 2006).

A expressão de proteínas heterólogas em organismos geneticamente modificados apresenta, sob o ponto de vista econômico, uma vantagem considerável em relação aos processos clássicos de produção de proteínas, pela purificação das mesmas de

órgãos animais ou do sangue de doadores. Esses sistemas podem ser induzidos, sob condições controladas, a sintetizar proteínas em grandes quantidades. Além disso, a produção de proteínas a partir de micro-organismos é mais facilmente controlada em biorreatores, a produção é contínua e o controle de processo é facilitado. Assim, a tecnologia do DNA recombinante representou uma revolução na ciência e permitiu que genes específicos pudessem ser isolados de um genoma, ou do ambiente, e manipulados. Os avanços científicos e tecnológicos têm ampliado o emprego de micro-organismos ou células modificadas geneticamente visando à produção de proteínas de interesse em diversas áreas e, em especial, na área clínica (ABDI e CGEE, 2008).

3.1 - Aplicação de proteínas recombinantes para a saúde humana

Segundo VILLELA (2008), os biofármacos podem ser definidos como fármacos cujos princípios ativos são proteínas terapêuticas recombinantes obtidas por processo biológico, normalmente apresentam estrutura molecular complexa de difícil caracterização e replicação. Além disso, são moléculas diversas e muito mais pesadas do que as moléculas que compõem os medicamentos tradicionais e apresentam peso molecular cem a mil vezes maiores do que as moléculas sintéticas. Geralmente, a expressão biofármaco refere-se a proteínas obtidas por engenharia genética (REIS, 2009; AMB e INTERFARMA, 2013).

Até o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, muitas proteínas eram obtidas a partir do isolamento de fontes naturais, porém essas formas de obtenção apresentavam alguns riscos ligados à segurança do produto final. Por exemplo, o hormônio do crescimento, obtido a partir da glândula pituitária de cadáveres e o fator VIII, proteína fundamental na cascata de coagulação sanguínea, obtido a partir de sangue humano, nestes casos, os riscos de contaminação com doenças infecciosas provenientes do doador são significativos. Além disso, havia também limitação da quantidade produzida. Os primeiros biofármacos surgiram para substituir esta produção convencional de proteínas e têm revolucionado as opções de tratamento

para muitas doenças, como hemofilia, *diabetes mellitus* e hepatite (BENAVIDE, 2013).

Durante os últimos 30 anos, a indústria de biotecnologia lançou mais de cem proteínas recombinantes e atualmente, mais de trezentos e cinquenta medicamentos estão sendo avaliados para o tratamento de diversas doenças, desde câncer até desordens genéticas raras (ABDI e CGEE, 2008).

As proteínas terapêuticas podem ser classificadas em dois grupos, as proteínas que não requerem modificações pós-traducionais e as que requerem modificações pós-traducionais, como N-glicosilação. As modificações pós-traducionais são alterações de resíduos de aminoácidos que ocorrem nas proteínas após a sua síntese, podem ocorrer por exclusão de resíduos ou adição de moléculas a um ou mais aminoácidos. Estas modificações podem alterar o tamanho, a composição, a atividade das proteínas, além das interações com outras proteínas e consequentemente afetam a função que desempenham (MARQUES, 2008). Proteínas não glicosiladas são tipicamente expressas em *Escherichia coli* ou na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Já as proteínas recombinantes que requerem modificações pós-traducionais, na maioria dos casos, são expressas em células de mamíferos, que têm a capacidade de imitar a glicosilação humana. Sistemas de expressão eucarióticos inferiores, tais como células de levedura e de insetos são normalmente incapazes de proporcionar glicosilações de mamífero (GERNGROSS, 2004; MADEIRA, 2013).

Os principais tipos de biofármacos estão representados pelas citocinas (interferons e interleucinas); fatores de crescimento hematopoiético (eritropoietina); hormônios (hormônio do crescimento, insulina, gonadotrofinas); fatores da coagulação sanguínea recombinantes (fator VIII, fator IX); agentes trombolíticos (estreptoquinase); enzimas (fator ativador de plasminogênio, glucocerebrosidase); vacinas (vacina recombinante contra a hepatite B); imunconjugados e anticorpos monoclonais (anticorpos semelhantes àqueles produzidos no corpo e adaptados para reagir especificamente sobre alvos selecionados). A Tabela 1 apresenta as principais proteínas recombinantes terapêuticas disponíveis no mercado mundial (AMB e INTERFARMA, 2013; BENAVIDE, 2013).

Tabela 1 - Classes de biofármacos e seus principais representantes disponíveis no mercado (BENAVIDE, 2013).

CLASSE	PRODUTO	INDICAÇÃO TERAPÊUTICA	ANO APROVAÇÃO
Fatores sanguíneos	Fator VIII	Hemofilia A	1992
	Fator VIIa	Algumas formas de hemofilia	1996
	Fator IX	Hemofilia B	1997
Anticoagulantes e trombolíticos	Fator ativador de plasminogênio	Infarto do miocárdio e infarto agudo do miocárdio	1996
	Hirudina	Terapia anticoagulante e prevenção de trombose venosa	1997
	Proteína C ativada	Septicemia	2001
Hormônios	Insulina	<i>Diabetes Mellitus</i>	1982
	Insulina análoga	<i>Diabetes Mellitus</i>	1996
	Insulina inalável	<i>Diabetes Mellitus</i>	2006
	Hormônio do crescimento humano	Algumas formas de deficiência de crescimento	1985
	Hormônio folículo estimulante	Infertilidade, anovulação e superovulação	1995
	Calcitonina	Osteoporose pós-menopausa e doença de Paget	1999
	Glucagon	Hipoglicemia	1998
Fatores de crescimento	Eritropoietina	Anemia	1989
	Eritropoietina análoga	Anemia	2001
	GM-CSF	Neutropenia induzida por quimioterapia	1991
Interferon e Interleucinas	Interferon alfa	Hepatite B e C e vários tipos de câncer	1986
	Interferon beta	Esclerose múltipla	1993
	Antagonista de receptor de interleucina 1	Artrite reumatóide	2001
	Interleucina 2	Carcinoma de células renais	1992
Enzimas	Glicosidase	Doença de Pompe	2006
	L-iduronidase	Mucopolissacaridose I	2003
	N-acetilgalactosamina 4-sulfatase	Mucopolissacaridose IV	2005
	Alfa galactosidase	Doença de Fabry	2001

Chamados de biofármacos de primeira geração, os medicamentos como insulina, hormônio de crescimento e fatores de coagulação, consistem em proteínas com sequências de aminoácidos idênticas à proteína humana nativa, são obtidos pela transfecção do gene humano para um sistema adequado (sistema de expressão celular) e após a síntese, essas substâncias recombinantes são isoladas e purificadas. Os biofármacos de segunda geração são aqueles sintetizados de forma a apresentar propriedades terapêuticas diferenciadas em relação às naturais, ou seja, o gene é alterado antes da transfecção, de tal forma que a estrutura da nova proteína expresse as características pretendidas. Geralmente essas alterações são realizadas para melhorar algum aspecto da atividade da proteína ou do polipeptídeo, como a alteração do tempo de meia-vida (REIS, 2009; AMB e INTERFARMA, 2013; BENAVIDE, 2013; NUNES 2014).

Diferente dos fármacos químicos que são obtidos por meio da síntese química do seu princípio ativo, os biofármacos são geralmente, produzidos pela tecnologia do DNA recombinante. Pela biossíntese em células vivas que necessitam modificação para a produção (expressão) de substâncias em condições controladas (REIS, 2009; INTERFARMA, 2012). Além das diferenças quanto à origem, os medicamentos também se diferem quanto ao tamanho das moléculas, os medicamentos provenientes de síntese química são em geral pequenas moléculas estáveis e podem ser replicadas de forma idêntica. Já os medicamentos biológicos, são formados por moléculas grandes e complexas e quando submetidas a pequenas variações das condições de conservação e armazenamento apresentam instabilidade (INTERFARMA, 2012).

3.2 – A Tecnologia do DNA Recombinante

Também chamada Engenharia Genética, consiste nas técnicas de manipulação do DNA que permitem introduzir um gene de um organismo em uma célula hospedeira. DNA recombinante refere-se à uma sequência de DNA artificial resultante da combinação de diferentes sequências. A técnica central destas metodologias é a clonagem molecular, que consiste na transformação de uma célula receptora com o

DNA recombinante e a propagação destas moléculas no interior da célula, gerando cópias idênticas (CARUSO, 2007; CESCA, 2011). Esta tecnologia foi responsável por uma revolução nas pesquisas na década de 80 e a partir daí tem contribuído muito para compreensão do genoma, bem como o conhecimento da estrutura e da função dos genes (BORGES-OSÓRIO, 2013).

O DNA do doador é extraído e cortado em fragmentos que contêm vários genes, esses fragmentos de DNA são inseridos em um vetor. As moléculas de vetor com as inserções são chamadas de DNA recombinante, porque consistem em novas combinações de DNA a partir do genoma do doador (que pode ser proveniente de qualquer organismo) com DNA do vetor a partir de uma fonte completamente diferente (GRIFFITHS *et al.*, 2000).

Nos tópicos que se seguem, será feita uma revisão sobre os principais vetores e sistemas de expressão, utilizados na tecnologia do DNA recombinante, para expressão de proteínas heterólogas com finalidades terapêuticas.

3.3 – Vetores

São moléculas de DNA carregadoras que levam uma sequência de DNA (o gene) para o interior da célula hospedeira possibilitando que este fragmento de DNA seja replicado. O vetor é parte principal para a expressão do gene, pois permite que os fragmentos de DNA a serem clonados sejam introduzidos e propagados na célula hospedeira, por conterem sinais moleculares que são reconhecidos pelas mesmas (ALBERTS *et al.*, 2009).

Estes vetores devem ser relativamente pequenos, se possível, de tamanho inferior a 10kb. Isso se deve ao fato de que as moléculas pequenas são mais fáceis de manipular e mais difíceis de sofrerem fragmentação durante a purificação. Geralmente os vetores são derivados de DNA de bacteriófago, DNA viral eucariótico ou plasmídeo e os mais utilizados são caracterizados por serem bons veículos de clonagem (BROWN, 2003; ALBERTS *et al.*, 2009). Todos os vetores de clonagem

devem conter sequências que permitam sua replicação autônoma dentro da célula hospedeira, possuir ao menos um sítio único de clonagem que é um sítio de restrição que não se repete na molécula e permitir a inserção sítio-específica de outra molécula de DNA (insertos). Alguns vetores possuem sítios para várias endonucleases de restrição posicionados lado a lado, em um segmento denominado de sítio múltiplo de clonagem (ZAHA *et al.*, 2014).

Em algumas ocasiões as células procarióticas são incapazes de produzir proteínas funcionais a partir de gene eucarioto, as expressões desses genes necessitam de vetores que possuem os sinais para expressão gênica que são reconhecidos pelas células selecionadas como sistemas de expressão (BROWN, 2003). Possuem sequências de DNA que direcionam a síntese da proteína codificada no inserto gênico, ou seja, possuem sequência promotora reconhecida pela RNA polimerase do sistema de expressão, bem como sítios de ligação ao ribossomo e sequências terminadoras também reconhecidas pela célula hospedeira (ALBERTS *et al.*, 2009). São, portanto, destinados a ativar um gene clonado e produzir cópias da proteína codificada em uma célula dita recombinante (KLUG *et al.*, 2010).

Os plasmídeos são moléculas circulares de DNA e existem independentes da célula bacteriana e em alguns organismos eucarióticos unicelulares, como leveduras. Quase sempre portam um ou mais genes responsáveis por características úteis exibidas pela bactéria hospedeira. Além disso, todos os plasmídeos possuem pelo menos uma sequência de DNA capaz de atuar como origem de replicação sendo apto a multiplicar-se no interior da célula independentemente do cromossomo bacteriano principal (BROWN, 2003; ZAHA *et al.*, 2014).

Os plasmídeos utilizados como vetores são os mais simples e combinam a facilidade de purificação com a alta eficiência de transformação, devem possuir basicamente uma origem de replicação (ORI), um marcador de seletividade e o sítio de clonagem. A origem de replicação consiste em uma sequência específica do plasmídeo com cerca de 1.000 pares de bases (pb). Neste local, há um conjunto de elementos regulatórios envolvidos no controle do número de cópias do plasmídeo que serão produzidas em uma única bactéria. Reconhecida a origem, a replicação do DNA se inicia e segue continuamente, independentemente do restante da sequência de

nucleotídeos, fazendo com que qualquer sequência inserida no plasmídeo seja replicada. O marcador de seletividade, normalmente um gene de resistência a antibiótico confere a capacidade de identificação da bactéria que recebeu o plasmídeo. Além disso, os plasmídeos quase sempre são portadores de um ou mais genes que atribuem características fenotípicas apresentadas pela bactéria hospedeira e estes genes marcadores contêm sítios de restrição únicos ou múltiplos que serão utilizados para clonar o fragmento de DNA de interesse. Neste local, o plasmídeo será clivado por endonucleases, tornando-se linear, de forma a permitir a inserção do fragmento de DNA (BROWN, 2003; MACEDO *et al.*, 2015).

A Figura 1 mostra o mapa do vetor plasmidial de clonagem pGEM® - T Easy, da marca Promega®, disponível no catálogo do fabricante. Neste mapa é possível observar os principais componentes de um vetor plasmidial utilizado para clonagem, a origem de replicação (*ori*), o marcador de seleção representado por um gene de resistência a antibiótico, no caso resistência à ampicilina (*Amp^r*) e o sítio múltiplo de clonagem (SMC), o qual se encontra inserido no interior do gene *lacZ*. No SMC são encontrados diversos sítios para enzimas de restrição nos quais o vetor plasmidial pode ser aberto (PROMEGA, 2010).

Na Figura 1, é destacado que o SMC se encontra no interior do gene *lacZ*, sendo este mais um sistema para seleção das células recombinantes. Caso o inserto de DNA seja corretamente ligado a esta região, o gene é interrompido e a enzima β -galactosidase não é expressa. Caso o inserto de DNA não seja ligado a esta região e as extremidades do plasmídeo sejam ligadas entre si, haverá expressão da referida enzima. A expressão da β -galactosidase é visualizada pela utilização de um substrato, semelhante à lactose, ligado a um cromóforo (X-Gal). Este substrato quando hidrolisado gera um pigmento azul, colorindo as colônias. Caso a célula hospedeira receba o plasmídeo vazio ela, ainda sim, irá se desenvolver em um meio com antibiótico, mas suas colônias serão azuis, indicando que estas células não possuem o DNA recombinante corretamente montado (BROWN, 2003).

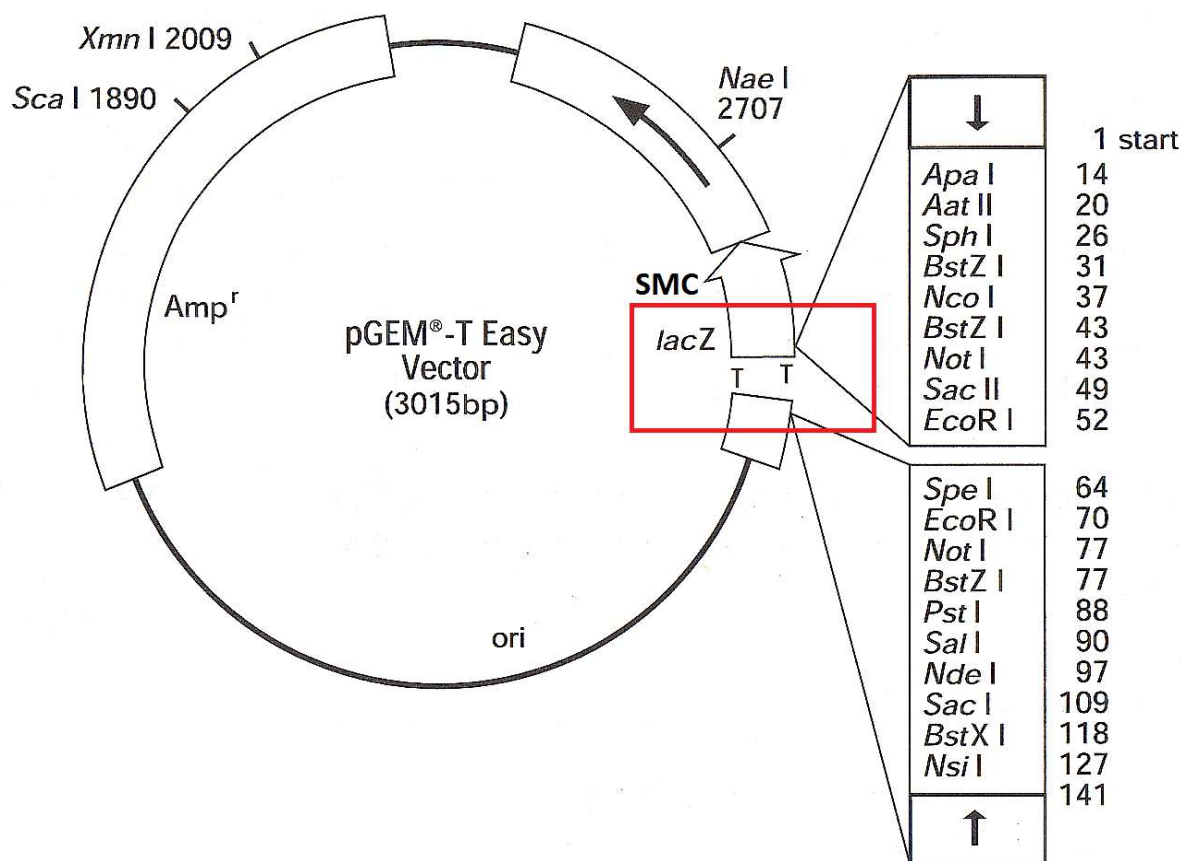


Figura 1: Vetor plasmidial de clonagem pGEM® - T Easy da Promega®, destacam-se os principais componentes de um vetor de clonagem: *ori*, origem de replicação bacteriana; *Amp^r*, gene de resistência à ampicilina e sítio múltiplo de clonagem (SMC) inserido no gene *lacZ* e com destaque para os diversos sítios de restrição (Adaptado de PROMEGA, 2010).

A Figura 2 mostra o mapa do vetor plasmidial de expressão pQE-30 Xa, da marca Qiagen®, disponível no catálogo do fabricante (QIAGEN, 2015). Como dito anteriormente, este tipo de vetor possui os componentes essenciais de um vetor de clonagem, importantes para a replicação do plasmídeo. Uma origem de replicação (*ColE1*), o marcador de seleção representado por um gene de resistência a antibiótico, no caso resistência à ampicilina (*Ampicillin*) e o sítio múltiplo de clonagem (MCS). Ainda, neste vetor, são observadas as sequências sinalizadoras para a expressão heteróloga de proteínas, como a sequência promotora (PT5) e o sítio de ligação ao ribossomo (RBS).

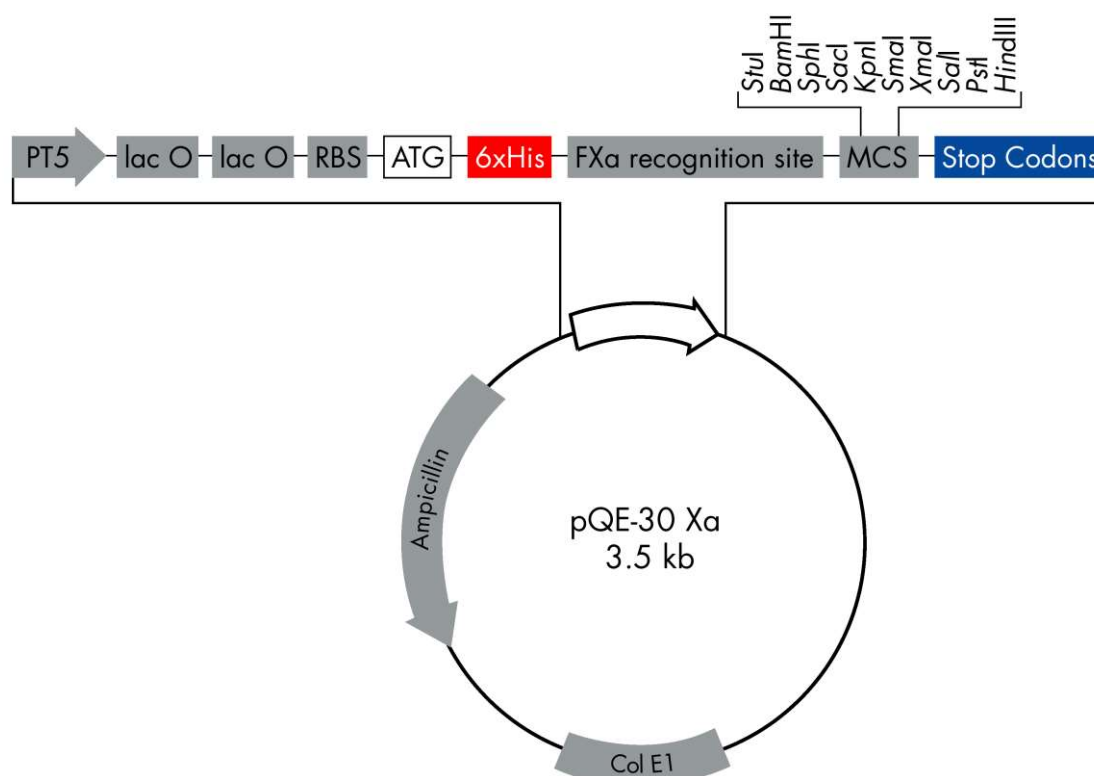


Figura 2: Vetor plasmidial de expressão pQE-30 Xa da Quiagen®, destacam-se os principais componentes de um vetor de expressão: *PT5*, sequência promotora; *lacO*, elemento operador; *RBS*, sítio de ligação ao ribossomo; *6xHis*, peptídeo de fusão; *FXa*, sítio de reconhecimento de protease; *MCS*, sítio múltiplo de clonagem; *Stop códon*s, códon's de terminação para a síntese de proteínas; *ColE1*, origem de replicação e *Ampicillin*, gene de resistência à ampicilina (Adaptado de QIAGEN, 2015).

Outro tipo de vetor utilizado para expressão e clonagem são aqueles baseados no genoma de bacteriófagos. Bacteriófagos são vírus que infectam especificamente bactérias, possuem estruturas simples, DNA envolvido por um capsídeo e uma cauda formada por moléculas proteicas. Como o DNA dos fagos tem capacidade de replicação autônoma, eles podem ser utilizados como vetores. As moléculas de DNA dos fagos em geral, possuem vários genes essenciais à replicação e que codificam componentes do capsídeo (BROWN, 2003; ZAHA *et al.*, 2014). As proteínas são produzidas separadamente a partir do DNA viral que está sendo replicado, posteriormente, o capsídeo e o DNA se reúnem para formar nova partícula viral (ZAHA *et al.*, 2014).

O fago λ é um exemplo, parasita obrigatório da *Escherichia coli*, o qual necessariamente injeta seu DNA na bactéria hospedeira para a sua multiplicação.

Após a infecção da *E.coli* o genoma do fago pode seguir duas vias: uma é o estado lítico (Figura 3a), em que o DNA do fago permanece na bactéria como uma molécula independente e ocorre a ativação de alguns genes do fago em conjunto com a inativação de outros. Como resultado, o cromossomo do fago é replicado e a síntese das proteínas do capsídeo ocorre imediatamente após a replicação formando-se novas partículas virais. Minutos após a infecção, a célula hospedeira é lisada e então ocorre a liberação de cerca de 100 novos fagos (BROWN, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2003).

A outra via que o cromossomo do fago pode seguir é denominada de estado lisogênico (Figura 3b). O DNA do fago é integrado ao genoma da bactéria hospedeira, por um processo de recombinação sítio-específica. Todos os genes do profago, que é a forma integrada do DNA do fago, ficam inativos, com exceção do gene que produz a proteína repressora do ciclo lítico. O profago pode ser liberado do genoma da bactéria e o fago reverte para o modo lítico, principalmente em situações de lesão do DNA da célula hospedeira (BROWN, 2003). A bactéria carregando o profago multiplica-se e este é replicado e distribuído para as bactérias descendentes (NASCIMENTO *et al.*, 2003).

Apesar de existir mais de um tipo de fago, todos eles possuem o mesmo padrão de infecção. O processo inicia-se com a fixação da partícula do fago na superfície externa da bactéria e em seguida o seu material genético é injetado no interior da célula, um processo denominado transfecção (Figura 3). Então, enzimas específicas replicam a molécula de DNA do fago que então é codificada por genes do seu próprio cromossomo. Por fim, outros genes do fago dirigem a síntese dos componentes proteicos do capsídeo fazendo com que novas partículas virais sejam montadas e liberadas da bactéria (BROWN, 2003).

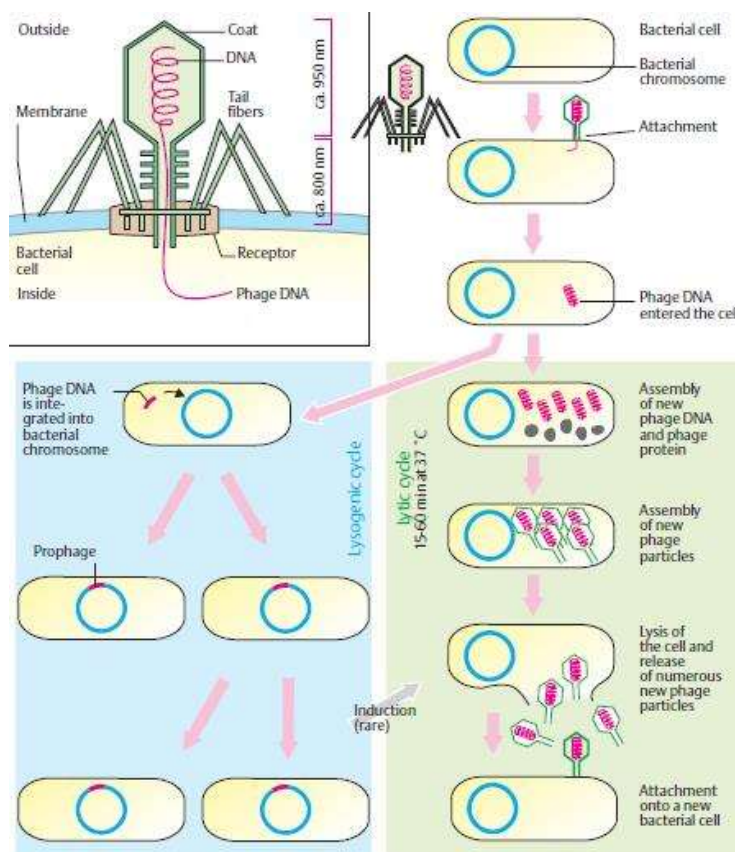


Figura 3: Fixação do bacteriófago na superfície externa da bactéria, seguido da demonstração dos ciclos lítico (a) e lisogênico (b) (PASSARGE, 2012).

Para o empacotamento natural do DNA do fago é necessária a presença das sequências *cos*, que são sequências de 12 pb, posicionadas nas extremidades do DNA linear. Estas sequências devem estar distantes cerca de 35 a 50 kb para que o empacotamento dentro do capsídeo do fago ocorra. Se a distância entre dois sítios *cos* não for apropriada, o DNA não será empacotado na forma de vírus infectivo (ZAHA *et al.*, 2014).

O DNA dos fagos pode ser modificado, pela tecnologia do DNA recombinante, originando vetores para clonagem e expressão muito versáteis, como ocorre com as modificações efetuadas no DNA do bacteriófago λ , um dos fagos mais utilizados em clonagem molecular. Uma porção do genoma viral, que não é necessária para que o fago infecte uma célula e replique seu DNA, é removida e substituída por um DNA exógeno. Esta porção do genoma viral é flanqueada por sítios para enzimas de restrição, os dois fragmentos remanescentes (braços) compreendem agora uma pequena parcela do genoma viral e não podem ser empacotados, a não ser que

moléculas adicionais de DNA sejam ligadas a esses fragmentos, originando genomas que podem variar de 75 a 105% do comprimento do genoma viral original, dessa forma, são permitidos que insertos de 9 até 23 kb possam ser clonados. Estas partículas são empacotadas *in vitro* e introduzidas na célula hospedeira por transfecção, como ilustrado na figura 4 (ZAHA *et al.*, 2014).

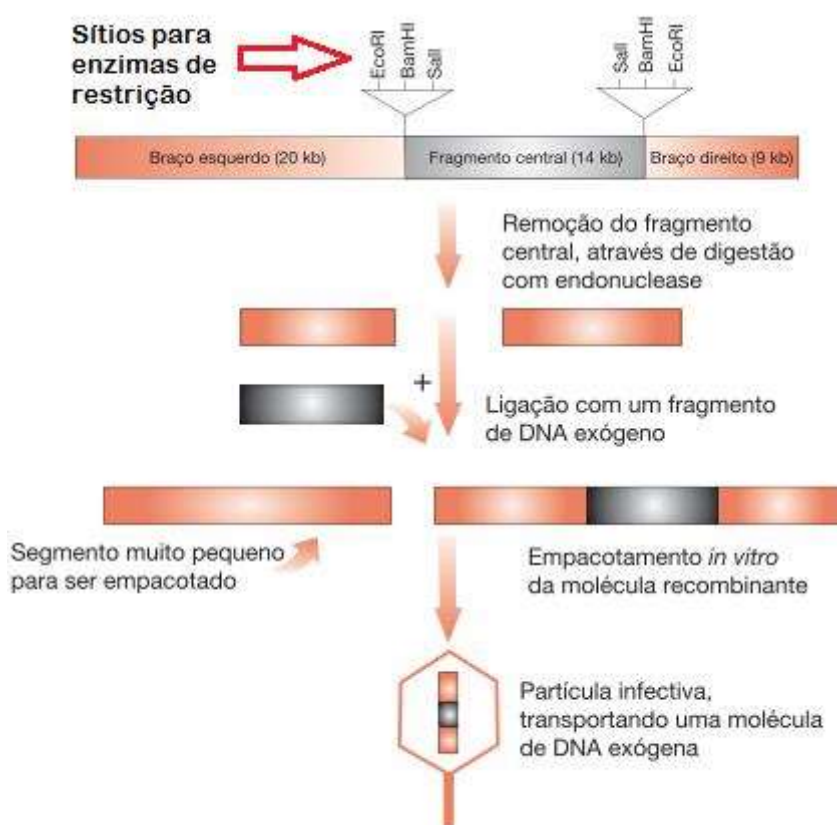


Figura 4: Representação esquemática da utilização de vetor derivado de bacteriófago λ. O processo de empacotamento do DNA no capsídeo vazio seleciona moléculas de DNA do tamanho adequado, podendo o fragmento central de 14 kb, neste exemplo, ser substituído por insertos de DNA de 9 a 24 kb (Adaptado de ZAHA *et al.*, 2014).

Cosmídeos são moléculas de DNA circulares extracromossomais originados da junção de um plasmídeo com um bacteriófago, possuem origem de replicação, marcador de seleção (gene de resistência a antibiótico), uma sequência *cos* do fago λ e um ou mais sítios de clonagem. Dentro da célula hospedeira, os cosmídeos são replicados como um plasmídeo, e as células infectadas são selecionadas pela resistência adquirida para algum antibiótico. Esses vetores podem ser usados como veículos de clonagem molecular, empregando o sistema de empacotamento *in vitro*

que reconstitui a estrutura do fago (cabeça e cauda), e assim são utilizados para infectar a célula hospedeira, como relatado anteriormente para os vetores baseados em bacteriófagos. O DNA do cosmídeo é injetado no interior da célula e então se replica como um plasmídeo normal, sem expressão de qualquer função do fago (NASCIMENTO *et al.*, 2003; ZAHA *et al.*, 2014; MACEDO *et al.*, 2015).

Diferente dos plasmídeos bacterianos pequenos, os cromossomos artificiais de bactérias (BAC) possuem uma média de tamanho de insertos de 120 kb, podendo alguns insertos chegarem a 300kb. São similares a outros plasmídeos, porém sua origem de replicação é derivada do plasmídeo F de *E. coli.*, que permite que os BAC sejam transferidos à célula hospedeira por conjugação. Estes cromossomos são moléculas de DNA circulares que carregam uma marca de seleção (resistência a antibióticos) e marcadores que permitem a discriminação dos clones vazios e cheios, como mencionado anteriormente. (BROWN, 2003).

Os vetores de clonagem para eucariotos foram desenvolvidos sob circunstância desejável da utilização de um hospedeiro diferente da *E. coli* para um experimento de clonagem. A descoberta iniciou-se com um plasmídeo presente na maioria das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, o plasmídeo de 2 μ m. Este possui 6kb de tamanho que o torna ideal para um vetor, além disso, o mesmo existe na célula de levedura de 70 a 200 cópias e a replicação desses plasmídeos utiliza a origem de replicação. Alguns vetores de clonagem para levedura contêm genes que conferem resistência a inibidores como o metotrexato e o cobre (MOREIRA e MENDES, 1998; BROWN, 2003).

Vários tipos de vetores de clonagem utilizados com *S. cerevisiae*, e que são derivados do plasmídeo 2 μ m, foram desenvolvidos, como os plasmídeos epissômicos para leveduras (YEps) que possuem uma origem de replicação que se comporta como sequência de replicação autônoma por meio de um segmento de plasmídeos natural de *S. cerevisiae*. Além disso, possui o gene LEU2 que permite seleção de recombinantes pela utilização de mutantes auxotróficos para leucina e, também, a sequência de pBR322 que faz com que haja replicação e seleção em *E.coli* também (BORGES, 2009; AMORIM 2011). Os plasmídeos integrativos (YIps), basicamente são plasmídeos bacterianos que contêm um gene de levedura, porém

não se replicam como plasmídeos e sim integram-se ao DNA cromossômico da levedura. Um YIp não pode replicar-se como um plasmídeo uma vez que não contém qualquer parte do círculo de 2µm, a expressão a partir destes vetores é baseada na integração da informação genética ao cromossomo da levedura hospedeira através da recombinação homóloga (BORGES, 2009). Outro exemplo, são os plasmídeos replicativos (YRps), vetores extracromossomais que contêm uma sequência de replicação autônoma que funciona como origem de replicação fazendo com que sejam capazes de se multiplicar como plasmídeos independentes (BORGES, 2009; AMORIM 2011).

E por fim, os cromossomos artificiais de leveduras (YAC) que são cromossomos utilizados para a clonagem de longos fragmentos de DNA em levedura. O YAC pode aceitar segmento de DNA exógeno de até 1.000 kb (quilo-bases) e são construídos para conter um centrômero que é o responsável pela distribuição dos cromossomos para as células filhas durante a divisão celular, dois telômeros, que se localizam nas extremidades de um cromossomo e faz com que essas extremidades sejam replicadas corretamente e impedem a degradação do cromossomo por exonucleases. Outra característica é a presença de origens de replicação que são os locais ao longo do cromossomo onde a replicação do DNA se inicia (BROWN, 2003, KARP, 2005).

Para a decisão de qual tipo de vetor para levedura é o mais adequado, deve-se levar em conta alguns fatores como a frequência de transformação, que indica o número de transformantes possíveis de serem obtidos por micrograma de DNA plasmidial. O número de cópias, quanto maior o número de cópias do gene, maior será o rendimento do produto proteico e a estabilidade dos recombinantes, células recombinantes de levedura devem reter o gene clonado por longos períodos em cultura (NASCIMENTO *et al.*, 2003).

Além dos vetores para leveduras e fungos existem também os vetores de clonagem para plantas superiores. São três sistemas de vetores mais empregados, os vetores baseados nos plasmídeos que ocorrem naturalmente em *Agrobacterium tumefaciens*, a transferência direta utilizando diversos tipos de DNA plasmidial e os vetores baseados em vírus de plantas. A *A. tumefaciens* é um micro-organismo do

solo que infecta regiões lesionadas do caule das plantas, induzindo a proliferação cancerosa do tecido do caule. O plasmídeo Ti (indutor de tumor), presente nesta bactéria, é um plasmídeo grande, superior a 200 Kb que está associado à capacidade de indução da doença dentro das células vegetais. Este plasmídeo transporta diversos genes envolvidos no processo de infecção. Uma das principais características do plasmídeo Ti é que, após a infecção, uma parte da molécula é integrada no DNA cromossomal da planta, o chamado T-DNA, esse é mantido na célula da planta e copiado para o genoma das células filhas. Desta forma, esta propriedade é explorada para inserir DNAs exógenos em células vegetais (BROWN, 2003; ZAHA *et al.*, 2014).

Para a clonagem em células de mamíferos, podem ser utilizados os retrovírus que possuem a capacidade de inserção de sequências gênicas no genoma hospedeiro ou pode ser realizada a microinjeção de plasmídeos bacterianos diretamente no núcleo das células de mamíferos (BROWN, 2003).

3.4 - Sistemas de expressão para a produção de biofármacos

Sistemas de expressão são designados como células hospedeiras que recebem o gene recombinado, com o objetivo de expressar este gene (INTERFARMA, 2012; MADEIRA 2013).

Diversos são os sistemas de expressão para a síntese de proteínas heterólogas, como bactérias (procariotos), fungos leveduriformes (leveduras), fungos filamentosos, plantas, células de mamíferos, células de insetos e, até mesmo, animais transgênicos. Contudo, o sistema mais frequentemente utilizado para expressão heteróloga é o que utiliza a *E.coli* como célula hospedeira (STRYER, 1988; LEWIN, 1994; LEWIN, 1997; ZAHA *et al.*, 2014).

Para a escolha do sistema devem ser avaliados alguns fatores como (i) a aplicação final da proteína a ser expressa, (ii) o custo da produção e purificação do produto de interesse, (iii) a capacidade de controlar o produto final incluindo o seu

processamento pós-traducional, (iv) o tempo necessário para expressão do gene até a proteína purificada e (v) a aprovação pelas agências regulamentadoras (GERNGROSS, 2004; MADEIRA, 2013).

Embora o sistema de expressão de proteínas heterólogas em *E. coli* seja bastante difundido e largamente utilizado devido à facilidade e o baixo custo de cultivo, pela reprodutibilidade e abundância de proteínas que a mesma produz e devido à genética já bem conhecida deste micro-organismo. Este sistema não é vantajoso para expressão de proteínas que necessitam de modificações pós-traducionais, principalmente a glicosilação, que é muitas vezes necessária para o dobramento correto das estruturas secundárias, terciárias ou quaternárias das proteínas de interesse (YIN *et al.*, 2007; CUNHA, 2008; MADEIRA 2013).

Quando as proteínas heterólogas não são modificadas corretamente elas acumulam em *E. coli* na forma de corpos de inclusão. Corpos de inclusão são agregados insolúveis de proteínas mal enroladas. O uso de chaperonas moleculares pode aumentar a solubilidade das proteínas e ajudar na dobragem correta da proteína recombinante. Segundo, Cardeal (2013) estas moléculas reconhecem as superfícies hidrofóbicas dos polipéptidos a fim de evitar a sua agregação, e de se ligarem a proteínas desconfiguradas, interagem seletivamente com algumas sequências e elementos estruturais proteicos e limita as possibilidades conformacionais e favorecendo algumas conformações particulares. As chaperonas mais importantes na *E. coli* são GroEL, GroES, DnaK, DnaJ, GrpE. Estas chaperonas podem ser utilizadas isoladamente, ou em combinação para melhorar a solubilidade das proteínas em *E. Coli* (CARDEAL, 2013; BAESHEN, 2014).

Um sistema de expressão alternativo são as células de leveduras, o mais antigo sistema de expressão eucarioto, a *Saccharomyces cerevisiae* apresenta um dos maiores rendimentos de produção de proteínas heterólogas, porém hiperglicosilam as proteínas recombinantes. Para suprir esta deficiência, a levedura *Pishia pastoris* tem sido um hospedeiro frequentemente utilizado para a produção recombinante de uma variedade de proteínas procarióticas e eucarióticas, mais de 200 proteínas a partir de vírus, bactérias, fungos, animais, plantas e seres humanos foram expressos

com sucesso em *P.pastoris* (TWYMAN *et al.*, 2003; YINYIN *et al.*, 2007). A expressão em células de leveduras carrega as vantagens de serem eucariotos e, portanto, mais próximas evolutivamente dos seres humanos, aliado ao baixo custo de cultivo, equivalente ao das células procarióticas.

A utilização de células de mamíferos como veículos de expressão tem se mostrado eficiente, estas têm capacidade de imitar a glicosilação humana o que faz com que estas células sejam bons hospedeiros para a produção de proteínas recombinantes que são N-glicosiladas em seu estado nativo. Porém, é um sistema com baixos rendimentos e longo tempo de produção. Além disso, necessita de condições especiais de cultivo como meios de cultura complexos e a utilização de sofisticados reatores e tendo, portanto, custo elevado de produção (CUNHA, 2008; MADEIRA 2013).

Outra possibilidade de sistema de expressão são as células de insetos que oferecem sistemas de modificações pós-transcricionais e pós-traducionais de eucariotos superiores. As células comportam-se da mesma maneira que as células de mamíferos, porém tem como vantagem a característica de produzirem proteínas recombinantes com alto rendimento. Os vetores são baseados nos baculovírus, um grupo de vírus comum em insetos e que não infectam vertebrados, porém as proteínas resultantes não são glicosiladas corretamente, o que faz com que esse sistema não ofereça vantagem em relação a *S. cerevisiae* ou *P. pastoris* (BROWN, 2003; MADEIRA 2013).

Em animais transgênicos também pode ocorrer a expressão de proteínas terapêuticas. Através da microinjeção do DNA recombinante em óvulo fecundado o gene clonado é introduzido em todas as células do animal transgênico (BROWN, 2003).

Conforme Fonseca (2006), para que um animal possa atuar como um biorreator ele deve obedecer algumas características como (i) capacidade de produzir a proteína de interesse em grandes quantidades sem comprometer o funcionamento normal de suas células, (ii) capacidade de passar esta nova característica para as próximas gerações, (iii) capacidade de produzir a proteína em um órgão específico; (iv)

capacidade de secreção da proteína em fluidos, como o leite, que facilitem a purificação da mesma e não comprometam a sobrevivência do animal; (v) aceitabilidade do organismo do animal quanto à inserção do transgene e (vi) a garantia de recuperação considerável da proteína com o grau de pureza exigido.

A utilização de plantas transgênicas para a expressão de proteínas vem sendo uma estratégia atrativa para a produção de biofármacos. Quanto maior o conhecimento do genoma das espécies agronômicas, maior a possibilidade de aplicação das plantas pela manipulação genética. As células vegetais compartilham algumas semelhanças arquitetônicas e funcionais com células animais e constituem um ótimo sistema para expressar proteínas heterólogas que requerem modificações pós-traducionais complexas, tais como a formação de glicoproteínas. A capacidade das plantas em promover o processamento pós-traducional representa uma grande vantagem em relação aos sistemas de expressão estabelecidos em bactérias. As plantas, além de permitirem a produção de proteínas com estrutura similar à das proteínas nativas, apresentam baixo custo de produção quando comparados com outros sistemas de expressão eucarióticos, como cultura de células de insetos e de mamíferos, ou ainda animais transgênicos, pois necessitam apenas de solo, água e luz para crescimento e produção (YIN *et al.*, 2007, MEDEIROS, 2008 e CUNHA, 2012).

Além disso, muitas plantas são excelentes acumuladoras de proteínas e se constituem em fonte de biomassa abundante e de baixo custo. Adicionalmente, o controle adequado das condições de cultivo pode maximizar a produção. Cunha (2012) ressalta diversas outras vantagens sobre estes sistemas de expressão como (i) cadeia produtora já bem estabelecida para certos cultivares como a soja; (ii) órgãos especializados no armazenamento de proteínas, como sementes, tubérculos e rizomas; (iii) tempo de geração mais curto que o de animais transgênicos e (iv) ausência de patógenos comuns para plantas e seres humanos. Este mesmo autor destaca que o desafio em utilizar este tipo de sistema de expressão está no aumento de rendimento na expressão heteróloga, bem como a preservação da integridade da proteína recombinante no organismo vegetal. Para resolver esta questão, o autor realça a possibilidade de utilização de promotores tecido específicos, principalmente para as sementes, bem como de sequências

sinalizadoras que direcionem a proteína heteróloga para vacúolos de armazenamento no interior da célula, retirando a proteína das possíveis condições adversas do citoplasma. Além disso, é interessante a integração do transgene ao genoma do hospedeiro para que haja síntese contínua da proteína como característica fenotípica estável e herdável (CUNHA, 2012).

De maneira ideal, para a escolha do sistema de expressão de biofármacos deve-se levar em conta (i) o custo de produção e de purificação; (ii) a capacidade de controlar o produto final, incluindo o seu processamento pós-tradução; (iii) a quantidade de tempo necessária para produzir a proteína purificada a partir do gene e (iv) as exigências das agências de aprovação regulatória. Além disso, quando se pensa em expressão heteróloga, espera-se que a proteína de interesse seja estável, não tóxica, solúvel e expressa em grandes quantidades (CARUSO, 2007; YIN *et al.*, 2007). A Tabela 2 traz uma comparação entre os diversos sistemas de expressão utilizados na produção de biofármacos.

Tabela 2 - Comparação entre os sistemas de expressão utilizados na produção de biofármacos (Adaptado de DA ROCHA e MARTIN, 2011).

SISTEMAS	VANTAGENS	DESVANTAGENS	APLICAÇÕES
Bactérias	Regulamentação definida; genética conhecida; manipulação fácil e de baixo custo	Proteínas não são secretadas usualmente; podem produzir endotoxinas; não ocorrem modificações pós-traducionais	Insulina (<i>E. coli</i> - Ely Lilly), hormônio de crescimento (Genentech), fatores de crescimento, interferon
Leveduras	Conhecido como seguro; bom histórico de uso; crescimento rápido; baixo custo de manipulação; modificações pós-traducionais	Glicosilação excessiva pode prejudicar a bioatividade; pode conter imunogênicos e antígenos	Vacinas recombinantes para hepatite B viral; insulina humana
Células de inseto	Modificações pós-traducionais; alto rendimento	Regulamentação incompleta; crescimento lento; meio de cultura caro; infecção por baculovirus (etapa extra de purificação); vírus humanos podem infectar estas células	Método relativamente novo: Novavax produz partículas virais aplicadas na produção de vacinas
Células de mamíferos	Modificações pós traducionais; bom histórico de regulamentação; boa opção no caso de proteínas grandes e complexas	Método caro; crescimento lento; pode conter alergênicos e contaminantes, purificação complicada	Ativador plasmogênico de tecido; fator VIII; anticorpos monoclonais (Herceptin)
Animais transgênicos	Processamento de proteínas complexas; excelentes níveis de expressão	Pouca experiência em regulamentação; potencial para contaminação viral	Hormônio de crescimento (cabras - Genzyme); fator VIII (gado e suínos - PPL Therapeutics)
Plantas transgênicas	Ciclos de desenvolvimento pequenos; fácil armazenagem das sementes; não existe conhecimento do vírus de planta que tenha contaminado humanos	Apresenta potencial para novos contaminantes (fungos do solo, bactérias e pesticidas); possibilidade de conter alergênicos	Vacina cólera (tabaco - Chorogen, Inc.); lipase gástrica (milho - Meristem); vacina para hepatite B (batatas - Boyce Thompson)

3.5 - Estudos de Caso

Diversos distúrbios metabólicos são causados pela deficiência na produção de certas proteínas e o tratamento destas doenças, muitas vezes, implica na reposição da proteína deficiente. Dessa forma, a produção em larga escala e com custo reduzido de diversas proteínas humanas pode aumentar a acessibilidade destes biofármacos, melhorando a qualidade de vida de muitas pessoas (AMB e INTERFARMA, 2013).

Nesta seção serão apresentados alguns exemplos de estudos de expressão heteróloga de proteínas recombinantes utilizadas na prática clínica.

3.5.1 - Citocinas

Citocinas são moléculas proteicas produzidas por células do sistema imunológico e utilizadas na comunicação intercelular, são glicosiladas ou não e enviam diversos sinais estimulatórios para diferentes células, apresentando papel fundamental na regulação da resposta imune e inflamatória (DE OLIVEIRA, 2011). As mais importantes são: os interferons, o fator de crescimento de granulócitos e as interleucinas. O interferon- α foi um dos primeiros biofármacos a ser produzido pela técnica de DNA recombinante, indicado para o tratamento das Hepatites B e C, no carcinoma renal e certas formas de leucemia (PFIZER, 2015). Na hepatite C O IFN- α age diretamente contra o vírus e também aumenta a resposta imune. Quando a célula é infectada pelo vírus, esse vírus fica alojado dentro dela. O interferon estimula a exposição dos antígenos virais na superfície das células infectadas, reconhecendo esses antígenos, o sistema de defesa do organismo passa a atacar essas células. Nesse caso, o interferon age especificamente contra o antígeno viral que estiver na célula (CAMPOS, 2003).

3.5.1.1 - Interferon cIFN- α

De acordo com Varellal (2001), o IFN- α é produzido por monócitos, macrófagos, células linfoblásticas, fibroblastos e células infectadas por vírus. O IFN- α e o IFN- β possuem semelhança na sequência de aminoácidos e apesar de agirem, nos mesmos receptores, têm atividade biológica diferenciada, se ligam a um receptor comum composto por duas cadeias distintas IFNAR1 e IFNAR2 (receptor IFNAR) (VILLELA, 2008; DE OLIVEIRA, 2011). O IFN- α , produzido por leucócitos quando são expostos a vírus, apresenta atividade antiviral e antiproliferativa em vários tipos de células. O cIFN- α é um interferon sintético que tem sido utilizado no tratamento de pacientes com hepatite C crônica que não respondem à terapia com IFN- α convencional (VILLELA, 2008; EL-BAKY, 2015).

El-Baky (2015) utilizou o plasmídeo pET101/D-TOPO para expressar o IFN- α recombinante em *Escherichia coli*. A sequência de codificação do gene de cIFN- α foi montada com base em PCR e o produto do gene cIFN- α clonado no plasmídeo para se obter o novo vetor de expressão, pET-cIFN α . O plasmídeo pET101/D-TOPO foi desenhado para conter a sequência, promotora de T7 na extremidade 5' do iniciador, precedendo um códon de iniciação ATG. Um códon de parada (TAA) foi incluído e o plasmídeo resultante pET-cIFN α foi transformado em células de *E.coli* BL21-CodonPlus (DE3) para a expressão da proteína regulada pelo promotor de T7. O sistema pET possui, ainda, o indutor do operon *lac*. Neste trabalho, a *E. coli* foi um sistema de expressão com alta produtividade, evitando o uso de indutores químicos, além disso, mostrou-se um sistema facilmente escalonável.

3.5.2 - Fatores de crescimento hematopoiético

Os fatores de crescimento hematopoiéticos compõem uma família de glicoproteínas produzidas na medula óssea por células endoteliais, fibroblastos, macrófagos e linfócitos. Essas proteínas juntamente com os hormônios e os neurotransmissores, desempenham uma importante função na comunicação intercelular, regulam a proliferação e diferenciação das células hematopoiéticas e a função das células sanguíneas maduras. Atuam localmente onde são produzidos ou entram na

circulação, os mais conhecidos são os hematopoiéticos, que são essenciais para a formação e diferenciação das células sanguíneas (MELLADO e CASTILHO, 2008; MADEIRA, 2013). A eritropoietina é uma proteína globular complexa de estrutura glicosilada. É utilizada para o tratamento de anemia associada a doenças crônicas dos rins e estimula a produção de eritrócitos, além de outras aplicações não renais (MELLADO e CASTILHO, 2008).

3.5.2.1 - Eritropoietina

A eritropoietina (EPO) é um hormônio glicoprotéico que regula a proliferação e a diferenciação das células hematopoiéticas, como os glóbulos vermelhos. Ela estimula as células tronco jovens da medula óssea, os eritroblastos, a aumentar sua atividade mitótica e se diferenciarem em eritrócitos. É um hormônio produzido naturalmente nos seres humanos e nos animais pelos rins e fígado. A eritropoietina recombinante tem a mesma função do hormônio natural. É uma proteína de grande interesse comercial, devido ao seu amplo uso terapêutico, como nas prevenções de diversas formas de anemias, na insuficiência renal crônica, doenças hematológicas, cânceres, entre outras, porém precisa ser glicosilada corretamente para apresentar atividade biológica (FONSECA, 2006; MENDES, 2009).

A produção de EPO em culturas de células eucarióticas é um processo de alto custo e baixo rendimento, além disso, as modificações pós-traducionais em culturas de células não são adequadas, gerando uma proteína recombinante com tempo de meia vida curto, o que encarece o tratamento, por necessitar de mais aplicações diárias. Assim, a melhor alternativa é a expressão desta proteína em animais transgênicos. Porém, diversas tentativas já foram realizadas em camundongos, coelhos e suínos, mas diversos problemas com estes animais foram detectados devido à falta de especificidade das sequências promotoras utilizadas para as glândulas mamárias (MENDES, 2009). A glândula mamária é escolhida como biorreator, uma vez que as proteínas do leite são expressas especificamente neste local, sem escape para a circulação sanguínea, e também apresentam altos níveis

de expressão de proteínas. Além disso, o leite é facilmente colhido sem prejudicar o animal (CLARK, 1998).

Elementos regulatórios dos genes para as proteínas do leite (promotores) podem ser usados para dirigir a expressão de genes exógenos no tecido mamário, como os promotores para as proteínas β -caseína; α_{S1} -caseína; α -lactalbumina; BLG (β -lactoglobulina bovina) e WAP (*whey acidic protein*) (CLARK, 1998).

Segundo Mendes (2009), somente em suínos a EPO recombinante foi obtida com a glicosilação necessária para a atividade biológica. Além disso, os promotores WAP de coelhos ou de camundongos e o promotor de β -caseína de cabras não foram capazes de dirigir a expressão somente para a glândula mamária, resultando em alterações nos animais transgênicos, como esplenomegalia, hepatomegalia, alteração de hematócrito, oligospermia e redução do número de filhotes e morte prematura dos animais por exaustão da medula óssea. Na tentativa de reverter esse impasse a autora construiu vetores plasmidiais para expressão de EPO recombinante no leite de camundongas transgênicas, com a finalidade de posterior utilização da tecnologia em bovinos. Foram construídos dois vetores utilizando o promotor da α -lactalbumina bovina e o promotor de BGL (β -lactoglobulina bovina). As regiões promotoras e as regiões codificadoras de ambas as proteínas foram amplificadas por PCR a partir de DNA extraído do sangue de fêmeas bovinas e a região codificadora para o gene da EPO humana foi amplificada, também por PCR, a partir de DNA extraído de sangue humano. Posteriormente, foram montados dois cassetes de expressão, após repetidas digestões com enzimas de restrição: (i) promotor α -lactalbumina, seguido da região codificadora para EPO humana, seguido da região codificadora para α -lactalbumina e (ii) promotor BGL, seguido da região codificadora para EPO humana, seguido da região codificadora para BGL. A autora, então, introduziu estes cassetes no vetor plasmidial pGEM®-T-Easy (figura 1). O vetor foi introduzido em células tronco por eletroporação e estas foram incubadas com embriões para formação de quimeras, estas quimeras foram transferidas para o útero de camundongas receptoras. Neste estudo, a autora obteve êxito na construção do vetor de expressão, mas não foi possível testar a hipótese de produção de EPO recombinante exclusivamente na glândula mamária, pois os animais transgênicos não foram gerados.

3.5.3 - Hormônios

Hormônios são substâncias específicas produzidas pelo sistema endócrino ou por neurônios e são responsáveis pela regulação da produção de diversas moléculas no organismo. Os hormônios terapêuticos mais conhecidos são a insulina, o glucagon, o hormônio de crescimento e as gonadotrofinas. A insulina é um agente que combate o *diabetes mellitus* diminuindo o nível de glicose no sangue (AMB e INTERFARMA, 2013).

3.5.3.1 - Insulina

A insulina humana é um hormônio proteico, constituído por 51 aminoácidos. É produzida nas células pancreáticas e localizada nas Ilhotas de Langerhans, considerada como principal regulador da homeostase metabólica tem como função a redução da glicemia (taxa de glicose no sangue). O processo se dá através do mecanismo de transdução de sinal que ativa os receptores de insulina presentes na membrana plasmática que estimula a expressão dos transportadores de glicose, capazes de captar moléculas para serem utilizadas como fonte de energia ou estocadas como glicogênio (DA CUNHA, 2008; BAESHEN, 2014). A insulina é utilizada no tratamento de um grupo de diferentes tipos de doenças do metabolismo que levam ao aumento dos níveis de açúcar no sangue, como o *diabetes mellitus* que é caracterizado pela deficiência de secreção de insulina. A pró-insulina é o resultado da conversão da pré-pró-insulina e diferente da insulina que é composta por dois peptídeos, a pró-insulina é composta por três peptídeos, a cadeia A, a cadeia B e um peptído C, além da sequência sinal para endereçamento da proteína ao retículo endoplasmático e posterior secreção (LOPES *et al.*, 2012).

A pró-insulina foi expressa por Cunha (2012) em plantas transgênicas de soja. Este autor construiu um vetor plasmidial com sequências regulatórias que direcionassem a pró-insulina heteróloga para a semente da soja e que a mesma fosse armazenada em vacúolos no interior das células, impedindo a degradação da mesma por proteases presentes no citoplasma. Para alcançar este objetivo o autor construiu um

cassete de expressão composto pelo promotor γ -kafirina, promotor tecido específico para sementes de sorgo, por um peptídeo sinal de α -coixina, proteína de reserva energética direcionada para vacúolos de armazenamento nas sementes e o gene da pró-insulina humana. O autor construiu o plasmídeo pRT-GK-PSC-PIh, este vetor foi construído com a inserção de um fragmento contendo a sequência codificante do peptídeo sinal de α -coixina retirado do vetor pRT-PSC-próINS e inserido no vetor pRT-GK, que já continha a sequência promotora de γ -kafirina, previamente digerido com as enzimas *NcoI* e *BamHI*. As sementes foram preparadas por aplicação de biobalística nos eixos embrionários. A seleção dos recombinantes foi feita por gene de resistência a herbicida. A confirmação da presença do gene foi feita por PCR convencional, a confirmação da expressão heteróloga foi feita por *western blot* e o acúmulo de proteína nos vacúolos foi comprovado por imunocitoquímica e microscopia eletrônica de transmissão. A técnica se mostrou promissora, pois a pró-insulina foi ainda detectada nas progênes destas plantas mesmo após sete anos de cultivo.

3.5.4 - Fatores de coagulação sanguínea

No processo de coagulação sanguínea o complexo no qual o sangue forma coágulos sólidos é constituído por vários fatores, como os fatores VII, VIII e IX. De modo geral, os fatores de coagulação são proteínas com síntese hepática circulando sob forma inativa (RESENDE e SILVA, 2015). A desordem na coagulação pode levar a hemorragia ou a trombose, sendo que a falta dessas proteínas constitui a doença genética conhecida como hemofilia. Atualmente, estes fatores sanguíneos são também produzidos através da tecnologia de DNA recombinante (MELLADO e CASTILHO, 2008).

3.5.4.1 - Fator IX da coagulação sanguínea

O Fator IX desempenha papel essencial na coagulação sanguínea. É uma proteína complexa da classe das serino proteases, com cerca de 461 aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 55 kDa, dependente de vitamina K. É sintetizado e armazenado no fígado para posteriormente ser secretado no sangue (DA CUNHA, 2008; LIU, 2014). A deficiência do Fator IX leva ao quadro conhecido como hemofilia B, que é um distúrbio hemorrágico hereditário. Essa deficiência congênita é causada por mutações no gene F11, que controla a produção do Fator IX plasmático que resulta em sintomas hemorrágicos moderados, ocorrendo normalmente após traumatismo ou cirurgia (MELLADO e CASTILHO, 2008; LIU, 2014).

Segundo Carlos (2007), a coagulação sanguínea acontece sempre que um vaso se rompe e ocorre o sangramento, essa coagulação é responsável por diversas reações químicas. É uma série complexa de interações nas quais o sangue perde suas características de fluido, formando um coágulo irreversível, pela interação do tecido lesado, plaquetas e fibrina. Existem dois mecanismos relacionados intimamente que quando estimulados podem gerar fibrina. O mecanismo intrínseco refere-se à sequência de reações enzimáticas que iniciam quando o sangue entra em contato com a superfície lesada. O mecanismo extrínseco refere-se à sequência de reações que ocorrem quando a lesão de um vaso sanguíneo resulta na liberação de extratos teciduais. Estas duas vias convergem para a ativação do fator X na via comum, o que leva, à formação de fibrina. O Fator IX atua na via intrínseca e quando ativado, em combinação com fator VIII também ativado, ativa o fator X que converte protrombina à trombina e então a trombina converte fibrinogênio em fibrina formando o coágulo.

O tratamento da hemofilia B consiste no fornecimento de fator IX ao indivíduo deficiente. Esta proteína é produzida através do fígado de cadáveres humanos ou derivada do sangue de doadores saudáveis. Apesar dos riscos associados à contaminação destas preparações, esta última ainda é predominantemente utilizada em países em desenvolvimento. O primeiro fator IX recombinante comercializado foi produzido em culturas de células de mamíferos. Animais transgênicos também têm

atraído atenção para a produção desta proteína, mas ambas as plataformas de expressão ainda possuem preços proibitivos para serem comercializadas em certos países. Dessa forma, sistemas de expressão que reduzam o custo de produção estão sendo pesquisados (CUNHA, 2012).

Cunha (2012) propõe a expressão de fator IX recombinante em sementes transgênicas capazes de acumular o fármaco devido ao seu alto percentual protéico. O autor construiu um cassete de expressão contendo o promotor da subunidade α' da β -conglucina de soja, uma proteína abundante nas sementes de soja, uma sequência para o peptídeo-sinal de α -coixina, que direciona esta proteína a vacúolos de reservas nas células da semente e a sequência codificadora do fator IX amplificada de uma biblioteca de cDNA de fígado humano. O autor preparou o DNA recombinante a partir do vetor p β cong3, contendo as sequências promotoras e terminadoras da subunidade α' da β -conglucina, por digestão com as enzimas *NcoI* e *BamHI*. Estes mesmos sítios de restrição foram inseridos nos *primers* que amplificaram o cDNA para o fator IX e a sequência do peptídeo-sinal de α -coixina. Assim, estes fragmentos foram inseridos no vetor, gerando o vetor de expressão p β cong3FIX. Este foi transformado por biobalística nos eixos embrionários retirados das sementes de soja e a seleção dos recombinantes foi feita pela resistência a herbicida. Estes experimentos produziram proteína com atividade biológica considerável e a proteína foi encontrada nas sementes estocadas por seis anos e também nas progênies da planta.

3.6 - Aspectos de mercado

O setor biofarmacêutico é baseado na inovação tecnológica e na propriedade de pesquisa e desenvolvimento de patentes. As grandes empresas farmacêuticas e as empresas de biotecnologia que surgiram nos últimos anos concentram a produção de biofármacos (BENAVIDE, 2013). O mercado de biofármacos vem ganhando destaque devido aos grandes avanços científicos e ao grande volume de investimentos (FARDELONE, 2006). As empresas responsáveis pela produção dos biofármacos e todo processo de pesquisa e desenvolvimento se concentram nos

países desenvolvidos, sendo os Estados Unidos o maior produtor mundial, seguido por Alemanha e Japão. Contudo, nos últimos anos o Brasil desponta como uma das maiores apostas do mercado mundial de biotecnologia (REIS *et al.*, 2011).

Em 1998, o mercado mundial de proteínas recombinantes teve uma taxa de crescimento de 14% ao ano, enquanto a taxa média de crescimento de todo mercado farmacêutico foi de apenas 6% (PALOMARES *et al.*, 2004). No ano 2000, as vendas do setor de biofármacos representavam 6,4% do total do mercado de medicamentos (22,7 bilhões de dólares). Já no período de 2001 a 2002 ocorreu um crescimento superior a 19% ao ano (7,6% do total do mercado mundial). E em 2004, já movimentava o mercado anual de cerca de 50 a 60 bilhões de dólares em todo o mundo, ganhando cada vez mais espaço (SOUSA, 2006). Segundo MADEIRA (2013), o mercado mundial gastou cerca de 160 bilhões de dólares, sendo 10 bilhões de reais no Brasil, e cerca de 350 biofármacos estavam em fase de testes clínicos neste ano.

Atualmente, muitos produtos biofarmacêuticos estão em ensaios clínicos e vários deles são esperados para chegar ao mercado dentro desta década (TANAKA, 2014). Vale ressaltar que dentre os dez medicamentos mais vendidos no mundo, cinco são biotecnológicos. Segundo Reis *et. al* (2011), estima-se que os medicamentos biotecnológicos passem de cinco para sete entre os 10 produtos mais vendidos no mundo. Entre eles, destacam-se os anticorpos monoclonais (*Humira-adalimumabe*, *Avastin-bevacizumabe*, *Rituxan-rituximabe*, *Herceptin-trastuzumabe*, *Remicade-infliximabe*), a proteína terapêutica Enbrel-etanercepte e a vacina antipneumocócica Prevnar13 (SCHNIEKE *et al.*, 1997; REIS *et al.*, 2011).

Nos últimos anos várias agências federais financiam projetos em bioprospecção, que estão sendo desenvolvidos por grupos de pesquisa nas universidades brasileiras e também empresas farmacêuticas na fase de inovação. Muitas moléculas já identificadas foram levadas para as bancadas dos laboratórios nas universidades e até mesmo na indústria, sendo alvos de testes toxicológicos e de atividade. Contudo, as dificuldades das instituições científicas e tecnológicas de

realizarem parcerias e atuarem na prestação de serviços para a indústria acabam tornando restrita a geração de inovações (ABDI & CGEE, 2008).

Ainda segundo Reis *et al.* (2011), as estimativas de vendas para os próximos anos apontam destaque para os anticorpos monoclonais. Porém os biofármacos de primeira geração, como insulina, interferons e hormônios do crescimento (hGH) também continuarão liderando o mercado mundial. A figura 4 apresenta a divisão do mercado de medicamentos biotecnológicos por tipo de medicamento em 2009 (REIS *et al.*, 2011)

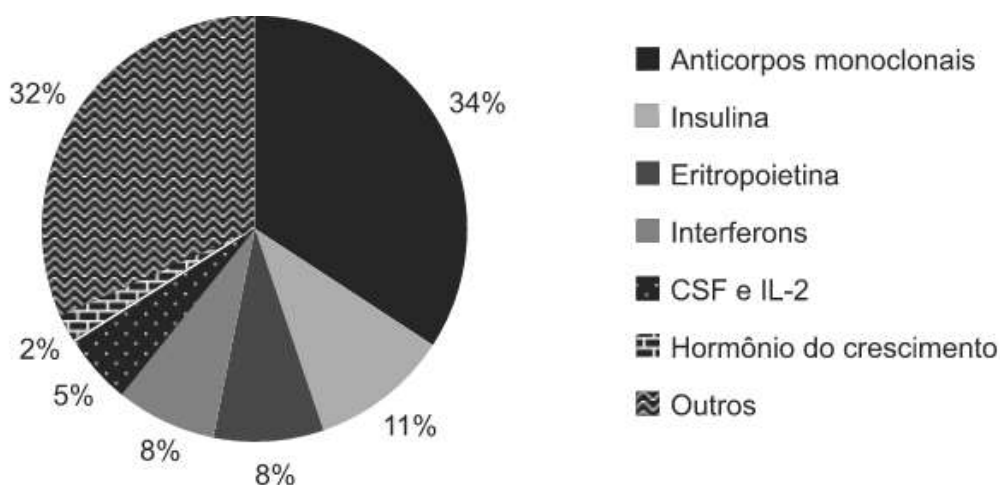


Figura 4: Participação no mercado de medicamentos biológicos por tipo de medicamento em 2009 (REIS *et al.*, 2011).

Em vista do exposto, é possível afirmar que os medicamentos biotecnológicos vêm ganhando cada vez mais espaço no mercado mundial e podem ser considerados como ponto central da estratégia de diversos países e empresas na prestação de serviços de saúde e na geração de lucros. Além disso, é importante ressaltar que o Brasil não está distante dessa discussão, pelo contrário, muitos avanços em pesquisa e desenvolvimento têm surgido no país e, dessa forma, a possibilidade de ampliação do arsenal terapêutico disponível para diversas doenças e das oportunidades de tratamento para nossa população é evidente.

4. CONCLUSÃO

Nesta revisão foi possível expor as características essenciais dos vetores e sistemas de expressão utilizados em Engenharia Genética, mostrando a importância da seleção destas moléculas e células na produção de proteínas recombinantes para aplicação terapêutica.

Os estudos de caso apresentados mostram que mesmo para biofármacos já consolidados no mercado ainda é possível buscar sistemas de expressão alternativos que possam reduzir os custos de produção e tornar os mesmos mais acessíveis à população. Para isso, é imperativo efetuar a construção do cassete de expressão de modo a aumentar os rendimentos de produção e selecionar o sistema de expressão de modo a evitar perdas com a expressão de proteínas sem função biológica.

A determinação e caracterização da estrutura de proteínas começa a ganhar maior atenção devido à possibilidade de expressão e purificação em larga escala, permitindo o lançamento de novas drogas e estratégias terapêuticas. Além do mais, o mercado desses biofármacos torna-se promissor frente à busca contínua e crescente por produções mais rentáveis e otimizadas. Sendo necessário um rígido controle das etapas de processo, e purificação. A tendência de crescimento de mercado das proteínas, expostas neste trabalho, está relacionada aos excelentes resultados obtidos em pesquisa e desenvolvimento. Assim, em um cenário brasileiro e mundial acredita-se que a indústria de biofármacos continuará a ter um expansivo crescimento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDI & CGEE. *Biotecnologia: iniciativa nacional de inovação – estudo prospectivo de inovação – visão de futuro e agenda 2008-2025*. Brasília: INI Biotecnologia, 2008. 265p.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. *Biologia molecular da célula*. 5ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2009. 1396p.
- AMB – Associação Médica Brasileira e INTERFARMA – Associação da Indústria Farmacêutica de Pesquisa. *Medicamentos Biológicos na Prática Médica*. São Paulo: Interfarma, 2013. 442p.
- BAESHEN, N. A.; BAESHEN, M. N.; SHEIKL, A.; BORA, R. S.; AHMED, M. M. M.; RAMADAN, H. A. I.; SAINI, K. S.; REDWAN, E. M. *Cell factories for insulin production. Microbial Cell Factories*, v.13, p.14, 2014.
- BENAVIDE, V. G. *Panorama sobre alguns entraves e desafios na produção nacional de biofármacos*. 2013. 44f. Monografia (Pós-Graduação em Tecnologias Industriais Farmacêuticas) – Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, Rio de Janeiro. 2013.
- BORGES, T. F. B. *Construção de um vetor integrativo em múltiplas cópias para Saccharomyces cerevisiae utilizando seqüências delta*. 2009. 83f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2009.
- BROWN, T. A. *Clonagem Gênica e Análise de DNA*. Porto Alegre: Editora Artmed, 2003.
- CARDEAL, I. C. M. A.; *Uso terapêutico de chaperones em doenças conformacionais*. 2013. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmecêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal, 2013.
- CARLOS, M. M. L.; FREITAS, P. D. F. S. *Estudo da cascata de coagulação sangüínea e seus valores de referência*. Acta Veterinária Brasília, v.1, n.2, p.49-55, 2007.
- CARUSO, C. S. *Clonagem, expressão e caracterização de proteínas recombinantes de Xylella fastidiosa*. 2007. 187f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- CESCA, K. *Estudo da produção de poli-hidroxicanoatos escherichia coli recombinante a partir de soro de queijo*. 2011. 103f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2011.
- CLARK, A. J. The mammary gland as a bioreactor: Expression processing and production of recombinant proteins. *Journal of Mammary Gland and Neoplasia*, v.3, n. 3, 1998.
- COSTA, M. A. F., COSTA, M. F. B. *Biossegurança de OGM: uma visão integrada*. Rio de Janeiro: Publit, 2009. 384p.
- CUNHA, N. B. *Expressão recombinante e caracterização molecular e funcional de pró-insulina humana, do hormônio de crescimento humano e do fator IX de coagulação sangüínea em plantas transgênicas de soja [Glycine Max L. (Merril)]*. 2012. 130f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília.

DA ROCHA, R., MARTIN, A.V. Transgênicos – Plantas Produtoras de Fármacos (PPF). *Ciência e saúde coletiva*, v.16, n.7, 2011.

EL-BAKY, N. A.; LINJAWI, M. H.; REDWAN, E. M. *Auto-induction expression of human consensus interferon-alpha in Escherichia coli*. BMC Biotechnology, v.15, p. 1-10, 2015.

FARDELONE, L. C.; BRANCHI, B. A. O setor de biofármacos e as oportunidades para o Brasil. *Revista FAE*, v.9, n.2, p.29-38, jul./dez, 2006.

FONSECA, K. F. *A produção de biofármacos a partir de animais transgênicos: um estudo sobre a eritropoetina alfa humana recombinante*. 2006. 59f. Monografia (Curso Técnico em Saúde, com habilitação em Laboratório em Bodiagnóstico em Saúde) – Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, Rio de Janeiro. 2006.

GANDER, E. S.; MARCELLINO, L. H. Plantas Transgênicas. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 1, n. 1, p. 34-37, 1997.

GERNGROSS, T. U. *Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi*. *Nature Biotechnology*, v.22, n.11, p.1409-1414, 2004.

GRIFFITHS, A. J. F., MILLER, J. H., SUZUKI, D. T., LEWONTIN, R. C., GELBART, W. M. *An Introduction to Genetic Analysis*. 7ed. Nova York: W. H. Freeman, 2000.

INTERFARMA. *Entendendo os medicamentos biológicos*, 2012. Disponível em: <<http://www.interfarma.org.br/uploads/biblioteca/34-biologicos-site.pdf>>. Acesso em: 17/06/2015.

KARP, G. *Biologia Celular e Molecular - Conceitos e Experimentos*. 3ed. São Paulo: Editora Manoele, 2005. 832p.

KLUG, W. S.; CUMMINGS, M. R; SPENCER, C. A.; PALLADINO, M. A. *Conceitos de genética*. 9ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2010. 896p.

LEE, M. H.; LIN, Y. S.; TU, C. F.; YEN, C. H. Recombinant human factor IX produced from transgenic porcine milk. *BioMed Research International*, v.2014, p. 1-8, 2014.

LIU, J.; JONEBRING, A.; HAGSTRÖM, J.; NYSTRÖM, AC.; LÖVGREN, A. *Improved Expression of Recombinant Human Factor IX by Co-expression of GGCX, VKOR and Furin*. *The Protein Journal*. v.33, n.2, p.174-183, 2014.

LEWIN, B. *Genes*. 5ed. Oxford University Press and Cell Press, 1997. 1260p.

LOPES, D. S. A.; PESSOA, M. H. N.; SANTOS, R. S.; BARBOSA, M. S. *A produção de insulina artificial através da tecnologia do DNA recombinante para o tratamento de diabetes mellitus*. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações*, v. 10, n. 1, p. 234-245, 2012.

MACEDO, J. N.; LOPES, J. L. S.; DAMALO, J. C. P. *Técnicas de biologia molecular e clonagem*. Brasília: W Educacional Editora e Cursos Ltda. Disponível em: <http://lms.ead1.com.br/webfolio/Mod3922/mod_tenicas_em_biologia_molecular_v4.pdf> Acesso em: 19/06/2015.

MADEIRA, L. S. *Prospecção tecnológica através de depósitos de patentes para produção de proteínas terapêuticas de interesse brasileiro*. 2013. 237p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

MARQUES, C. H. *Aspectos fundamentais à implantação da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais humanizados com potencial aplicação terapêutica*. 2005. 126f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

MARQUES, R. M. D. S. *Modificações pós-traducionais de proteínas na amiloidogênese: Glicação e agregação da transtirretina in vivo em Saccharomyces cerevisiae*. 2008. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2008.

MEDEIROS, M. G. F.; CARNEIRO, S. M. P.; DINIZ, F. M. Plantas como potenciais biorreatores na produção de vacinas e fármacos. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2008 (Pesquisa & Desenvolvimento - Série Documentos No. 180).

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.384- 402.

MENDES, C. M. *Produção de eritropoietina recombinante humana no leite de camundongos transgênicos*. 2009. 50f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) –Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MOLINA, A. L.; TOBO, P. R. Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. *Einstein*, v.2, n.2, p. 139-142, 2004.

MONCLARO, A. V. *Expressão de Proteínas Recombinantes: Sistema Vetor - Hospedeiro. Materiais e Métodos*, Universidade de Brasília, 2013. Disponível em: <<http://www.labome.com.br/method/Recombinant-Protein-Expression-Vector-Host-Systems.html>>. Acesso em: 17/06/2015.

MOREIRA, C.; MENDES, D. *Engenharia Genética - Clonagem de DNAs em Bactérias (Módulo I)*. Universidade de Evora, 1998. Disponível em: <http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/LBT_1828_1220884022.pdf>. Acesso em 17/06/2015.

NASCIMENTO, A. A. C.; ESPREAFICO, E. M.; LARSON, M. L. P.; MONESI, N.; ROSSI, N. M. M; RODRIGUES, V. *Tecnologia do dna recombinante*. 2003. 87p. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

NUNES, A. R. A. *Medicamentos biológicos: situação actual e prespectivas futuras*. 2014. 85f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2014.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L.R.; SALOMÃO, R. *Citocinas e dor*. Revista Brasileira de Anestesiologia v. 61, n.2, p. 260- 265, Março - Abril, 2011.

PALOMARES, L. A.; KUBRI-BRENA, F.; RAMÍREZ. O. T. Industrial Recombinant Protein Production. *Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols*, 2ed. Argélia: Springer, 2004.

PASSARGE, E. *Color Atlas of Genetics*, 4ed. Essen: Thieme, 2012. 488p.

PATINHO, S. F. S. *Avaliação da expressão transiente do gene do gene da glicoproteína do vírus da raiva (RGVP) em células de inseto da linhagem Drosophila melanogaster S2*. 2011. 121f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

PFIZER. Medicamentos Biológicos e Biossimilares. Disponível em: <<http://static.labnetwork.com.br.s3.amazonaws.com/wordpress/wp-content/uploads/2014/07/Manual-Medicamentos-Biol%C3%B3gicos-e-Biossimilares.pdf>>. Acesso em: 18/06/2015.

PROMEGA Corporation. *Technical Manual pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems – Instructions for use of products*. Madison, 2010. 28p. Disponível em: <<https://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20manuals/0/pgem-t%20and%20pgem-t%20easy%20vector%20systems%20protocol.pdf>>. Acesso em: 17 jun. 2015.

QIAGEN. *Catálogo de produto – pQE30 Xa Vector Map*. Disponível em: <<https://www.qiagen.com/br/resources/resourcedetail?id=cb411367-5567-4657-99e6-02e63c275f2c&lang=en>>. Acesso em: 17 jun. 2015.

REIS, C. *Biotecnologia para saúde humana: tecnologias, aplicações e inserção na indústria farmacêutica*. Rio de Janeiro: BNDES Setorial, n. 29, p. 359-392, 2009.

REIS, C.; LANDIM, A.; PIERONI, J. P. *Lições da experiência internacional e propostas para incorporação da rota biotecnológica na indústria farmacêutica brasileira*. Rio de Janeiro: BNDES, n. 34, p. 5-44, 2011.

RESENDE, M. A. C.; SILVA, E. V. Administração de fatores da coagulação: quais as evidências?. *Medicina perioperatória. Serviço de Anestesiologia*, Joinville, SC. Disponível em: <<http://www.saj.med.br/uploaded/File/artigos/Administracao%20de%20fatores%20da%20coagulacao.pdf>> Acesso em: 19/06/2015.

SCHNIEKE, A. E.; KIND, A. J.; RITCHIE, W. A.; MYCOCK, K.; SCOTT, A. R.; RITCHIE, M.; WILMUT, I.; COLMAN, A.; CAMPBELL, K. H. *Human Factor IX Transgenic Sheep Produced by Transfer of Nuclei from Transfected Fetal Fibroblasts*. *Science* v.278, p. 2130–2133, 1997.

SOUSA, T. M. M. *Produção de proteínas de interesse terapêutico em células de mamíferos em cultura*. 2006. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2006.

STRYER, L. *Biochemistry*. Nova York. W.H. Freeman and Company, 1988, p.881.

TANAKA, R. L.; AMORIM, M. C. S. O mercado e as possibilidades da indústria de biofármacos no brasil. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba*, v. 16, n.2, 2014.

TWYMAN, R. M.; STOGER, E.; SCHILLBER, S.; CHRISTOU, P.; FISCHER, R. *Molecular farming in plants: host systems and expression technology*. *TRENDS in Biotechnology*, V.21, n.12, Dezembro, 2003.

VARELLA, P. P. V.; FORTE, W. C. N. *Citokines: A review*. Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia, v.24, p. 146–154, 2001.

VILLELA, A. D. *Superproducao do Interferon β 1 Humano Recombinante em Escherichia coli*. 2008. 75f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Pontífica Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2008.

VILLEN, R. A. *Biotecnologia - Histórico e Tendências*. Revista de Graduação da Engenharia Química do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, Escola de Engenharia Mauá, n. 10, 2002.

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

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular Structure of NucleicAcids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, v.171, n. 4356, p. 737–738, 1953.

YIN, Q. Q.; ZHENG, Q. H.; KANG, X.T. Biochemical characteristics of phytases from fungi and the transformed microorganism. *Animal Feed Science and Technology* 132 (2007) 341–350. (2007).

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. *Biologia Molecular Básica*. 5ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 424p.