



AVANÇOS METODOLÓGICOS EM BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA

Anderson Barros Archanjo
Aline Ribeiro Borçoi
Suzanny Oliveira Mendes
Adriana Madeira Álvares-da-Silva
(Organizadores)

Atena
Editora
Ano 2021



AVANÇOS METODOLÓGICOS EM BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA

Anderson Barros Archanjo
Aline Ribeiro Borçoi
Suzanny Oliveira Mendes
Adriana Madeira Álvares-da-Silva
(Organizadores)

Editora Chefe

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Assistentes Editoriais

Natalia Oliveira

Bruno Oliveira

Flávia Roberta Barão

Bibliotecária

Janaina Ramos

Projeto Gráfico e Diagramação

Natália Sandrini de Azevedo

Camila Alves de Cremona

Luiza Alves Batista

Maria Alice Pinheiro

Imagens da Capa

Shutterstock

Edição de Arte

Luiza Alves Batista

Revisão

Os Autores

2021 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do Texto © 2021 Os autores

Copyright da Edição © 2021 Atena Editora

Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Conselho Editorial**Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**

Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná

Prof. Dr. Américo Junior Nunes da Silva – Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais

Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Carlos Antonio de Souza Moraes – Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Crisóstomo Lima do Nascimento – Universidade Federal Fluminense
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Daniel Richard Sant'Ana – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
Profª Drª Dilma Antunes Silva – Universidade Federal de São Paulo
Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá
Prof. Dr. Elson Ferreira Costa – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Elói Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima
Prof. Dr. Gustavo Henrique Cepolini Ferreira – Universidade Estadual de Montes Claros
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof. Dr. Jadson Correia de Oliveira – Universidade Católica do Salvador
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Prof. Dr. Luis Ricardo Fernandes da Costa – Universidade Estadual de Montes Claros
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Pontifícia Universidade Católica de Campinas
Profª Drª Maria Luzia da Silva Santana – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Pablo Ricardo de Lima Falcão – Universidade de Pernambuco
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador
Prof. Dr. Saulo Cerqueira de Aguiar Soares – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Vanessa Ribeiro Simon Cavalcanti – Universidade Católica do Salvador
Prof. Dr. William Cleber Domingues Silva – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Prof. Dr. Arinaldo Pereira da Silva – Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Profª Drª Carla Cristina Bauermann Brasil – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos – Universidade Federal da Grande Dourados
Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos – Universidade Federal do Ceará
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Jael Soares Batista – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Prof. Dr. Jayme Augusto Peres – Universidade Estadual do Centro-Oeste
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Profª Drª Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Profª Drª Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília
Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª Daniela Reis Joaquim de Freitas – Universidade Federal do Piauí
Profª Drª Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Profª Drª Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina
Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Profª Drª Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Dr. Fernando Mendes – Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior de Saúde de Coimbra
Profª Drª Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia
Profª Drª Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Jefferson Thiago Souza – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Jônatas de França Barros – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará
Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federacl do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá
Prof. Dr. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados
Profª Drª Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino
Profª Drª Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Welma Emídio da Silva – Universidade Federal Rural de Pernambuco

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Profª Drª Ana Grasielle Dionísio Corrêa – Universidade Presbiteriana Mackenzie
Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Cleiseano Emanuel da Silva Paniagua – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás
Prof. Dr. Douglas Gonçalves da Silva – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Profª Drª Érica de Melo Azevedo – Instituto Federal do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Profª Dra. Jéssica Verger Nardeli – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande

Profª Drª Luciana do Nascimento Mendes – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte
 Prof. Dr. Marcelo Marques – Universidade Estadual de Maringá
 Prof. Dr. Marco Aurélio Kistemann Junior – Universidade Federal de Juiz de Fora
 Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba
 Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
 Profª Drª Priscila Tessmer Scaglioni – Universidade Federal de Pelotas
 Prof. Dr. Sidney Gonçalves de Lima – Universidade Federal do Piauí
 Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Linguística, Letras e Artes

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins
 Profª Drª Angeli Rose do Nascimento – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
 Profª Drª Carolina Fernandes da Silva Mandaji – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
 Profª Drª Denise Rocha – Universidade Federal do Ceará
 Profª Drª Edna Alencar da Silva Rivera – Instituto Federal de São Paulo
 Profª Drª Fernanda Tonelli – Instituto Federal de São Paulo,
 Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
 Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
 Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná
 Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará
 Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste
 Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia

Conselho Técnico Científico

Prof. Me. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo
 Prof. Me. Adalberto Zorzo – Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza
 Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba
 Prof. Dr. Adilson Tadeu Basquerote Silva – Universidade para o Desenvolvimento do Alto Vale do Itajaí
 Profª Ma. Adriana Regina Vettorazzi Schmitt – Instituto Federal de Santa Catarina
 Prof. Dr. Alex Luis dos Santos – Universidade Federal de Minas Gerais
 Prof. Me. Alexsandro Teixeira Ribeiro – Centro Universitário Internacional
 Profª Ma. Aline Ferreira Antunes – Universidade Federal de Goiás
 Profª Drª Amanda Vasconcelos Guimarães – Universidade Federal de Lavras
 Prof. Me. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
 Profª Ma. Andréa Cristina Marques de Araújo – Universidade Fernando Pessoa
 Profª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
 Profª Drª Andrezza Miguel da Silva – Faculdade da Amazônia
 Profª Ma. Anelisa Mota Gregoleti – Universidade Estadual de Maringá
 Profª Ma. Anne Karynne da Silva Barbosa – Universidade Federal do Maranhão
 Prof. Dr. Antonio Hot Pereira de Faria – Polícia Militar de Minas Gerais
 Prof. Me. Armando Dias Duarte – Universidade Federal de Pernambuco
 Profª Ma. Bianca Camargo Martins – UniCesumar
 Profª Ma. Carolina Shimomura Nanya – Universidade Federal de São Carlos
 Prof. Me. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
 Prof. Me. Carlos Augusto Zilli – Instituto Federal de Santa Catarina
 Prof. Me. Christopher Smith Bignardi Neves – Universidade Federal do Paraná
 Profª Drª Cláudia de Araújo Marques – Faculdade de Música do Espírito Santo
 Profª Drª Cláudia Taís Siqueira Cagliari – Centro Universitário Dinâmica das Cataratas
 Prof. Me. Clécio Danilo Dias da Silva – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
 Prof. Me. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará
 Profª Ma. Daniela da Silva Rodrigues – Universidade de Brasília
 Profª Ma. Daniela Remião de Macedo – Universidade de Lisboa

Profª Ma. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco
 Prof. Me. Douglas Santos Mezacas – Universidade Estadual de Goiás
 Prof. Me. Edevaldo de Castro Monteiro – Embrapa Agrobiologia
 Prof. Me. Edson Ribeiro de Britto de Almeida Junior – Universidade Estadual de Maringá
 Prof. Me. Eduardo Gomes de Oliveira – Faculdades Unificadas Doctum de Cataguases
 Prof. Me. Eduardo Henrique Ferreira – Faculdade Pitágoras de Londrina
 Prof. Dr. Edwaldo Costa – Marinha do Brasil
 Prof. Me. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
 Prof. Me. Ernane Rosa Martins – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás
 Prof. Me. Euvaldo de Sousa Costa Junior – Prefeitura Municipal de São João do Piauí
 Prof. Dr. Everaldo dos Santos Mendes – Instituto Edith Theresa Hedwing Stein
 Prof. Me. Ezequiel Martins Ferreira – Universidade Federal de Goiás
 Profª Ma. Fabiana Coelho Couto Rocha Corrêa – Centro Universitário Estácio Juiz de Fora
 Prof. Me. Fabiano Eloy Atilio Batista – Universidade Federal de Viçosa
 Prof. Me. Felipe da Costa Negrão – Universidade Federal do Amazonas
 Prof. Me. Francisco Odécio Sales – Instituto Federal do Ceará
 Prof. Me. Francisco Sérgio Lopes Vasconcelos Filho – Universidade Federal do Cariri
 Profª Drª Germana Ponce de Leon Ramírez – Centro Universitário Adventista de São Paulo
 Prof. Me. Gevair Campos – Instituto Mineiro de Agropecuária
 Prof. Me. Givanildo de Oliveira Santos – Secretaria da Educação de Goiás
 Prof. Dr. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná
 Prof. Me. Gustavo Krahel – Universidade do Oeste de Santa Catarina
 Prof. Me. Helton Rangel Coutinho Junior – Tribunal de Justiça do Estado do Rio de Janeiro
 Profª Ma. Isabelle Cerqueira Sousa – Universidade de Fortaleza
 Profª Ma. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
 Prof. Me. Javier Antonio Albornoz – University of Miami and Miami Dade College
 Prof. Me. Jhonatan da Silva Lima – Universidade Federal do Pará
 Prof. Dr. José Carlos da Silva Mendes – Instituto de Psicologia Cognitiva, Desenvolvimento Humano e Social
 Prof. Me. Jose Elyton Batista dos Santos – Universidade Federal de Sergipe
 Prof. Me. José Luiz Leonardo de Araujo Pimenta – Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria Uruguay
 Prof. Me. José Messias Ribeiro Júnior – Instituto Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco
 Profª Drª Juliana Santana de Curcio – Universidade Federal de Goiás
 Profª Ma. Juliana Thaisa Rodrigues Pacheco – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Profª Drª Kamilly Souza do Vale – Núcleo de Pesquisas Fenomenológicas/UFGA
 Prof. Dr. Kárpio Márcio de Siqueira – Universidade do Estado da Bahia
 Profª Drª Karina de Araújo Dias – Prefeitura Municipal de Florianópolis
 Prof. Dr. Lázaro Castro Silva Nascimento – Laboratório de Fenomenologia & Subjetividade/UFPR
 Prof. Me. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Profª Ma. Lilian Coelho de Freitas – Instituto Federal do Pará
 Profª Ma. Lilian de Souza – Faculdade de Tecnologia de Itu
 Profª Ma. Liliani Aparecida Sereno Fontes de Medeiros – Consórcio CEDERJ
 Profª Drª Livia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás
 Prof. Dr. Lucio Marques Vieira Souza – Secretaria de Estado da Educação, do Esporte e da Cultura de Sergipe
 Prof. Dr. Luan Vinicius Bernardelli – Universidade Estadual do Paraná
 Profª Ma. Luana Ferreira dos Santos – Universidade Estadual de Santa Cruz
 Profª Ma. Luana Vieira Toledo – Universidade Federal de Viçosa
 Prof. Me. Luis Henrique Almeida Castro – Universidade Federal da Grande Dourados
 Prof. Me. Luiz Renato da Silva Rocha – Faculdade de Música do Espírito Santo
 Profª Ma. Luma Sarai de Oliveira – Universidade Estadual de Campinas
 Prof. Dr. Michel da Costa – Universidade Metropolitana de Santos

Prof. Me. Marcelo da Fonseca Ferreira da Silva – Governo do Estado do Espírito Santo
Prof. Dr. Marcelo Máximo Purificação – Fundação Integrada Municipal de Ensino Superior
Prof. Me. Marcos Aurelio Alves e Silva – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo
Profª Ma. Maria Elanny Damasceno Silva – Universidade Federal do Ceará
Profª Ma. Marileila Marques Toledo – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Prof. Dr. Pedro Henrique Abreu Moura – Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
Prof. Me. Pedro Panhoca da Silva – Universidade Presbiteriana Mackenzie
Profª Drª Poliana Arruda Fajardo – Universidade Federal de São Carlos
Prof. Me. Rafael Cunha Ferro – Universidade Anhembí Morumbi
Prof. Me. Ricardo Sérgio da Silva – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Me. Renan Monteiro do Nascimento – Universidade de Brasília
Prof. Me. Renato Faria da Gama – Instituto Gama – Medicina Personalizada e Integrativa
Profª Ma. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
Prof. Me. Robson Lucas Soares da Silva – Universidade Federal da Paraíba
Prof. Me. Sebastião André Barbosa Junior – Universidade Federal Rural de Pernambuco
Profª Ma. Silene Ribeiro Miranda Barbosa – Consultoria Brasileira de Ensino, Pesquisa e Extensão
Profª Ma. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo
Profª Ma. Taiane Aparecida Ribeiro Nepomoceno – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Prof. Me. Tallys Newton Fernandes de Matos – Faculdade Regional Jaguaribana
Profª Ma. Thatianny Jasmine Castro Martins de Carvalho – Universidade Federal do Piauí
Prof. Me. Tiago Silvio Dedoné – Colégio ECEL Positivo
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

Avanços metodológicos em biologia molecular e biotecnologia

Bibliotecária: Janaina Ramos
Diagramação: Natália Sandrini de Azevedo
Correção: Giovanna Sandrini de Azevedo
Edição de Arte: Luiza Alves Batista
Revisão: Os Autores
Organizadores: Anderson Barros Archanjo
Aline Ribeiro Borçoi
Suzanny Oliveira Mendes
Adriana Madeira Álvares-da-Silva

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A946 Avanços metodológicos em biologia molecular e biotecnologia / Organizadores Anderson Barros Archanjo, Aline Ribeiro Borçoi, Suzanny Oliveira Mendes, et al. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2021.

Outra organizadora
Adriana Madeira Álvares-da-Silva

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-65-5983-175-3
DOI 10.22533/at.ed.753210406

1. Biologia Molecular. 2. Biotecnologia. 3. DNA. I. Archanjo, Anderson Barros (Organizador). II. Borçoi, Aline Ribeiro (Organizadora). III. Mendes, Suzanny Oliveira (Organizadora). IV. Título.

CDD 572.8

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora

Ponta Grossa – Paraná – Brasil

Telefone: +55 (42) 3323-5493

www.atenaeditora.com.br

contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa.

APRESENTAÇÃO

O livro “Avanços Metodológicos em Biologia Molecular e Biotecnologia” é uma obra com o foco principal na valorização acerca do conhecimento aprofundado em Biologia Molecular e Biotecnologia, assim como do histórico e das técnicas recentes mais aplicadas para o estudo do tema.

A obra é fruto do trabalho dos professores e alunos da disciplina “Tópicos Especiais em Biotecnologia II: Avanços Metodológicos em Biologia Molecular e Biotecnologia (BIOTEC024)”, ofertada pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo.

Os diversos temas relacionados à Biologia Molecular e à Biotecnologia foram abordados tendo como foco os avanços nas metodologias utilizadas ao longo dos anos. A obra consta de sete capítulos, nos quais foram discutidos a evolução da biologia molecular e das ômicas, assim como os sequenciadores de próxima geração, os métodos de estudo em epigenética, a amplificação do DNA em single-cell, estudo de expressão gênica, ferramentas de edição gênica e expressão heteróloga de proteínas.

Deste modo a obra “Avanços Metodológicos em Biologia Molecular e Biotecnologia” apresenta uma ferramenta de estudo que proporciona aos leitores uma visão ampla das principais metodologias em Biologia Molecular e Biotecnologia, assim como as suas evoluções ao longo dos anos.

Desejamos uma excelente leitura a todos!

Anderson Barros Archanjo

Aline Ribeiro Borçoi

Suzanny Oliveira Mendes

Adriana Madeira Álvares-da-Silva

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATÇÖES E SIGLAS	1
CAPÍTULO 1.....	3
A EVOLUÇÇÖ DA BIOLOGIA MOLECULAR E AS ÔMICAS	
Tamires dos Santos Vieira	
Suzanny Oliveira Mendes	
DOI 10.22533/at.ed.7532104061	
CAPÍTULO 2.....	14
GENÔMICA E OS SEQUENCIADORES DE PRÓXIMA GERAÇÇÖ	
Paola Cerbino Doblas	
Iuri Drumond Louro	
DOI 10.22533/at.ed.7532104062	
CAPÍTULO 3.....	26
EPIGENÉTICA E MÉTODOS DE ESTUDOS EPIGENÉTICOS	
Ivana Alece Arantes Moreno	
Suzanny Oliveira Mendes	
DOI 10.22533/at.ed.7532104063	
CAPÍTULO 4.....	35
PRÍNCÍPIOS BÁSICOS EM AMPLIFICAÇÇÖ DO DNA E GENÔMICA DE CÉLULAS ÚNICAS	
Bárbara Risse-Quaioto	
Anderson Barros Archanjo	
DOI 10.22533/at.ed.7532104064	
CAPÍTULO 5.....	46
RT-qPCR: ESTUDOS DE EXPRESSÇÖ GÊNICA	
Mayara Mota de Oliveira	
Anderson Barros Archanjo	
DOI 10.22533/at.ed.7532104065	
CAPÍTULO 6.....	58
FERRAMENTAS DE EDIÇÇÖ GÊNICA	
Joaquim Gasparini dos Santos	
Aline Ribeiro Borçoi	
DOI 10.22533/at.ed.7532104066	
CAPÍTULO 7.....	69
EXPRESSÇÖ HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS	
Karolinni Bianchi Britto	

Greiciane Gaburro Paneto

DOI 10.22533/at.ed.7532104067

SOBRE OS ORGANIZADORES	85
-------------------------------------	-----------

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

2D-PAGE	Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis
5hmC	5 hidroximetilcitosina
5mC	5-metilcitosina
AD	Domínio de Ativação
AMPK	Proteína Quinase Ativada por Adenosina Monofosfato
BACs	Cromossomos Artificiais Bacterianos
BiTS-ChiP	Isolamento Descontínuo da Cromatina Específica de Tecido para Imunoprecipitação
cDNA	DNA complementar
ChiP	Imunoprecipitação da Cromatina
ChIP-chip	Imunoprecipitação de Cromatina Ligada a Microarranjos
ChIP-Seq	Imunoprecipitação da Cromatina com Tecnologia de Sequenciamento de Nova Geração
CRISPR	Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespçadas (do inglês <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>)
DCR	Doença Renal Crônica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAr	DNA recombinante
DNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DOP-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase Iniciada por Oligonucleotídeo Degenerado
dPCR	PCR digital
DSB	Quebra Dupla da Fita de DNA (do inglês <i>Double-Stranded Break</i>)
ESI-MS	Espectrometria de Massa de Eletrospray
FACS	Classificação Celular Ativada por Fluorescência
FDA	Food and Drug Administration
<i>FOK I</i>	<i>Flavobacterium okeanokoites</i>
FRET	Transferência de Energia de Ressonância de Fluorescência
FTIR	Espectroscopia Infravermelha de Transformação Fourier
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase
GFP	Proteína Verde Fluorescente
GST	Glutathione S-transferase
HATs	Histonas Acetiltransferases
HDACs	Histonas Desacetiltransferases
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Resolução
HR	Recombinação Homóloga (do inglês <i>Homologous Recombination</i>)
INTACT	Isolamento de Núcleos Marcados em Tipo Celular Específico
LCM	Microdissecção de Captura a Laser
Lpp	Lipoproteína Mureína
MACS	Classificação de Células Ativadas Magneticamente
MALBAC	Múltiplos Ciclos de Amplificação Baseados em Anelamento e Loop
MBP	Proteína Ligante da Maltose
MDA	Amplificação de Deslocamento Múltiplo
miRNA	microRNA

NGS	Sequenciadores de Próxima Geração
NHEJ	Junções Terminais não Homólogas (do inglês <i>non-homologous end joining</i>)
NLS	Sinal de Localização Nuclear
NMR	Ressonância Magnética Nuclear
OGM	Organismos Geneticamente Modificados
OmpA	Proteína A da membrana externa
OmpT	Protease VII
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGM	Personal Genome Machine
PhoE	Proteína E dos poros da membrana externa
qPCR	Reação Quantitativa em Cadeia da Polimerase (qPCR)
RBS	Sequência Shine-Dalgarno (do inglês <i>Ribosome Binding Site</i>)
RFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP)
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RNA-seq	Sequenciamento de RNA
RT	Transcriptase reversa
RT-PCT	PCR de transcrição reversa
RT-qPCR	PCR de transcrição reversa quantitativa
RVS	Repetições Variáveis Diresíduos
Sars-cov-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
SDS-PAGE de	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato Sódio
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
STR	Sequências de Repetições Curtas em Tandem
TALENs	Nucleases com Efetores do tipo Ativador Transcricional (do inglês <i>Transcription Activator-Like Effector Nucleases</i>)
TET	Translocação Metilcitosina Dioxigenase
TFIIIA	Fator de transcrição IIIA
T _m	Temperatura de <i>melting</i>
TRX	Tiorredoxina
YACs	Cromossomos Artificiais de Leveduras
ZFN	Nucleases de Dedo de Zinco (do inglês <i>Zinc Finger Nucelases</i>)

EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS

Data de aceite: 10/05/2021

Data de submissão: 13/04/2021

Karolinni Bianchi Britto

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória - ES
<http://lattes.cnpq.br/3604508015056223>

Greiciane Gaburro Paneto

Universidade Federal do Espírito Santo
Alegre - ES
<http://lattes.cnpq.br/8176374147579841>

RESUMO: Proteínas são macromoléculas importantes para o funcionamento dos organismos pois desempenham inúmeros papéis centrais, além de serem amplamente utilizadas como reagentes na pesquisa, sendo aplicadas em diversas áreas como indústria farmacêutica, agricultura e diagnóstico de doenças. A expressão heteróloga de proteínas, possível através da tecnologia do DNA recombinante, se destaca por permitir que organismos que não expressam a proteína normalmente possam sintetizá-la em escalas necessárias ao uso que se propõem. Para tal, são necessários vetores de expressão com características adequadas e que possam direcionar corretamente a transcrição e tradução do gene de interesse na célula hospedeira selecionada. Diferentes sistemas de expressão heteróloga de proteínas são conhecidos, podendo-se destacar as bactérias, especialmente *Escherichia coli*, leveduras, fungos filamentosos, microalgas, cultura de células de mamíferos, insetos e plantas. Cada sistema possui vantagens e desvantagens, sendo o melhor escolhido de acordo com a característica da proteína que se

deseja expressar. Quanto à análise e identificação, diversas técnicas são aplicadas para verificar a presença do gene e das proteínas nas células. A purificação das proteínas expressas pelos sistemas ocorre especialmente por cromatografia, podendo ser do tipo cromatografia de troca iônica, de afinidade, de gel filtração, de fase reversa, de imunoafinidade e cromatografia líquida de alta resolução. Sequências específicas de aminoácidos, conhecidas como 'tags', geralmente são adicionadas às proteínas para facilitar principalmente o processo de purificação, apesar de influenciar também em outras etapas do processo. Após a obtenção da proteína purificada segue-se com o processamento de acordo com o objetivo proposto com sua síntese.

PALAVRAS-CHAVE: Expressão heteróloga, proteína, DNA recombinante, vetores, purificação de proteína.

HETEROLOGOUS PROTEIN EXPRESSION

ABSTRACT: Proteins are important macromolecules for the functioning of organisms because they play countless central roles, besides being widely used as reagents in research, being applied in several areas such as pharmaceutical industry, agriculture and disease diagnosis. The heterologous expression of proteins, possible through recombinant DNA technology, stands out by allowing organisms that do not normally express the protein to synthesize it in scales necessary for its proposed use. For this, expression vectors with adequate characteristics and that can correctly direct the transcription and translation of the gene of interest in the selected host cell are needed. Different systems of heterologous expression of proteins are known, especially bacteria *Escherichia coli*, yeast, filamentous fungi, microalgae, mammalian cell culture, insects and

plants. Each system has advantages and disadvantages, and the best one is chosen according to the characteristic of the protein to be expressed. As for the analysis and identification, several techniques are applied to verify the presence of the gene and proteins in the cells. The purification of the proteins expressed by the systems occurs especially by chromatography, and may be of the ion exchange, affinity, gel filtration, reverse phase, immunoaffinity, and high performance liquid chromatography types. Specific amino acid sequences, known as 'tags', are usually added to proteins to facilitate mainly the purification process, although they also influence other steps in the process. Once the purified protein is obtained, it is processed according to the proposed objective of its synthesis.

KEYWORDS: Heterologous expression, protein, recombinant DNA, vectors, protein purification.

1 | INTRODUÇÃO

Proteínas são macromoléculas formadas por um ou mais polipeptídeos, os quais são constituídos por uma cadeia de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. A sequência exata dos aminoácidos é determinada pelo gene que codifica para esse polipeptídeo específico. Quando sintetizada, uma cadeia polipeptídica se dobra, assumindo uma conformação específica (WALSH, 2007). Assim, cada tipo de proteína possui uma estrutura tridimensional única e essa estrutura confere também uma função única. Portanto, é evidente que a sequência de aminoácidos desempenha um papel fundamental tanto na determinação da estrutura tridimensional da proteína quanto na sua função (NELSON; COX, 2011).

A conformação adotada pela proteína é amplamente estabilizada por múltiplas interações não covalentes fracas. Um processo de desnaturação pode ocorrer quando há alguma influência, como calor e produtos químicos por exemplo, que perturbe essas interações fracas resultando na interrupção da conformação nativa do polipeptídeo, o que geralmente leva a perda de atividade funcional devido a perda da estrutura. A conformação da proteína pode ser determinada por técnicas de difração de raios X e ressonância magnética nuclear (RMN), por exemplo (WALSH, 2007).

Para que as informações genéticas presentes no DNA da célula sejam expressas na forma de uma proteína, enzima ou anticorpo, um intermediário entre a proteína e o DNA é requerido: RNA mensageiro (RNAm), conforme discutido anteriormente.

Relembrando: o fluxo geral de informações, do DNA às proteínas, foi resumido por Francis Crick como o "Dogma Central" da biologia molecular em que o DNA de fita dupla é transcrito para o RNAm (em eucariotos, com processamento da transcrição), que por sua vez é traduzido pelo ribossomo na cadeia de aminoácidos que formam uma proteína. A síntese de proteínas possui três estágios principais: iniciação, alongamento e terminação (GROVES, 2006).

As proteínas possuem papéis importantes em inúmeros processos celulares, sendo sintetizadas como parte do metabolismo de todas as formas de vida. Tanto as proteínas nativas quanto as recombinantes são muito utilizadas como reagentes na pesquisa científica, sejam em processos industriais mediados por enzimas, diagnóstico de doenças, na indústria farmacêutica e em setores da agricultura (EGELKROUT; RAJAN; HOWARD,

2012).

Uma proteína heteróloga é definida como aquela produzida em organismos diferentes dos de sua origem, podendo ser expressas em sistemas procariotos ou eucariotos (CANÇADO, 2002; RAI; PADH, 2001). Assim, é denominada produção heteróloga de proteínas a expressão de proteínas recombinantes em células diferentes de sua ocorrência natural (WALSH, 2007).

A expressão heteróloga, de uso da tecnologia do DNA recombinante, permite a obtenção de produtos biofarmacêuticos como hormônios, fatores de coagulação, citocinas, anticorpos, vacinas, enzimas, imunossuppressores, entre outros, em uma elevada quantidade quando comparados aos seus produtores nativos (RAMANA; XAVIER; SHARMA, 2017). Existem diferentes sistemas de expressão de proteínas heterólogas. Dentre os procariotos, estão os que utilizam células de bactérias e são os mais comuns nas indústrias biotecnológicas na produção de proteínas recombinantes; e, dentre os eucariotos, encontram-se os de leveduras, cultura de células de mamíferos e insetos, plantas e animais transgênicos (CANÇADO, 2002; WALSH, 2007), que serão discutidos posteriormente.

2 | TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE

Por meio de uma tecnologia de manipulação do DNA que surgiu na década de 1970, foi possível o isolamento e caracterização de genes criando uma forma de recombinar segmentos de DNA de diversas fontes em novas moléculas compostas. Essas técnicas de manipulação do DNA são conhecidas como tecnologia de DNA recombinante ou engenharia genética (GROVES, 2006). Normalmente envolve o isolamento, a manipulação e a reintrodução de trechos de DNA nas células, conferindo à célula receptora a capacidade de produzir uma proteína específica. O pedaço de DNA criado artificialmente *in vitro* que contém DNA obtido de duas ou mais fontes é chamado de DNA recombinante (DNAr) (WALSH, 2007).

No caso do desenvolvimento de uma proteína heteróloga, realiza-se inicialmente a identificação e o isolamento do gene responsável por codificar a proteína alvo, a geração de um pedaço apropriado de DNAr contendo a sequência de codificação da proteína e a introdução deste DNAr em uma célula hospedeira apropriada, de modo que a proteína alvo seja produzida em grandes quantidades por essa célula manipulada (WALSH, 2007).

2.1 Clonagem

A inserção e multiplicação de moléculas idênticas de DNA em um organismo hospedeiro refere-se à etapa de clonagem na técnica de DNAr (GROVES, 2006). Para clonar um fragmento de DNA de interesse é necessário vinculá-lo a uma molécula de DNA vetorial, que pode se replicar dentro de uma célula hospedeira. Então, após uma única molécula de DNAr, composta por um vetor e um fragmento de DNA inserido, ser introduzida em uma célula hospedeira, o DNA inserido é replicado junto com o vetor, gerando um grande número de moléculas de DNA idênticas (ALBERTS et al., 2007).

As enzimas de restrição (ERs), endonucleases produzidas por bactérias que normalmente reconhecem sequências específicas de 4 a 8 pb nos chamados locais de

restrição, facilitam a produção das moléculas de DNAr. Tais enzimas cortam o DNA de uma fonte específica em um conjunto reproduzível de fragmentos de restrição para serem introduzidos no vetor. Como exemplos podemos citar: BamHI, EcoRI, HindIII, KpnI e PstI. A inserção dos fragmentos de DNA gerados em vetores recebe o auxílio de DNA ligases (ALBERTS et al., 2007).

Graças às informações sobre diversas sequências de genes disponíveis em bancos de dados, é possível obter grandes quantidade do gene de interesse usando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Primeiramente, o DNA genômico da fonte de interesse é extraído e depois realizada a PCR, gerando cópias do gene de interesse. Locais de reconhecimento para ERs podem ser incorporados nos oligonucleotídeos para permitir a clonagem do gene amplificado (WALSH, 2007).

O corte do DNA pode ser também realizado sem o uso de ERs, no caso de cisalhamento mecânico da solução de DNA. Pode-se ainda partir de um extrato de RNA, que após algumas etapas geram o DNA complementar (cDNA) apto a ser clonado da mesma maneira que o DNA genômico (GROVES, 2006).

2.2 Vetores

O fragmento de DNA que contém o gene de interesse será transferido para uma célula hospedeira através dos chamados vetores. Uma característica essencial do vetor de clonagem utilizado é que ele deve ser capaz de se autorreplicar na célula em que será introduzido, além de possuir marcador de seleção e locais de restrições únicos para inserção das sequências de interesse (FERRIER, 2017). Esses vetores, que podem ser plasmídeos, bacteriófagos λ , cosmídeos, cromossomos artificiais bacterianos (BACs) ou cromossomos artificiais de leveduras (YACs) por exemplo, devem possuir pelo menos um local de clonagem e uma sequência que pode ser clivada por uma ER para permitir sua ligação a um fragmento de DNA clivado de maneira semelhante (GROVES, 2006; WALSH, 2007). Alguns vetores de clonagem são conhecidos como: pBR322, pUC8, pEMBL8 e λ gt10 (BROWN, 2013).

Os plasmídeos, vetores muito utilizados, são moléculas circulares de DNA de fita dupla que são separadas do DNA cromossômico de uma célula. Ocorrem naturalmente em bactérias ou em células eucarióticas inferiores, seu DNA é duplicado antes de cada divisão celular e suas cópias compõem cada célula filha. Os plasmídeos frequentemente carregam um ou mais genes para resistência a antibióticos e os mais comumente usados no DNAr são os que se replicam em *Escherichia coli* (ALBERTS et al., 2007; GROVES, 2006).

O vetor escolhido deve ser aberto com a mesma ER utilizada para cortar o fragmento de DNA contendo a sequência gênica, seguido por uma incubação para promover a adesão das extremidades do fragmento de DNA com o vetor. Após, o DNAr deverá ser transferido para as células hospedeiras, em um processo conhecido como transformação (WALSH, 2007), que pode acontecer por diversas técnicas, entre as quais se destacam: a eletroporação como método de transfecção, o qual consiste em sujeitar as células a um campo elétrico forte, curto e pulsado, abrindo poros na célula e permitindo que a molécula exógena seja inserida (LI; LIN, 2011); microinjeção (SAMPATH KUMAR; PUTTARAJU, 2012); bombardeamento de partículas ou biobalística (CARNEIRO; CARNEIRO; PAIVA, 2004); e, também através de vetores, como bactérias e vírus (CARNEIRO; CARNEIRO;

PAIVA, 2004; FELBERBAUM, 2015; STUDART-GUIMARÃES; LACORTE; BRASILEIRO, 2003).

2.3 Células hospedeiras

Diversas células podem ser usadas na técnica do DNA recombinante. Entre elas encontram-se comumente células bacterianas, leveduras e mamíferas. De acordo com o tipo de produto e a quantidade desejada baseia-se a escolha da célula e a cepa específica (GROVES, 2006).

A replicação do plasmídeo dentro da célula hospedeira começa na origem de replicação (ORI), uma sequência específica de DNA de 50 a 100 pares de bases, e continua em torno do plasmídeo circular. Dessa forma, ocorre a replicação da sequência de DNA inserida no plasmídeo, seja ela qual for (ALBERTS et al., 2007).

Para identificar se as células hospedeiras, como exemplo *E. coli*, absorveram corretamente o plasmídeo, as mesmas são incubadas em condições apropriadas para que se possa identificar qual colônia abriga o fragmento de DNA que contém o gene de interesse. Dentre as estratégias para identificação do DNA em células de *E. coli* usando o vetor pUC18, destaca-se uma em que as células são espalhadas em placas de ágar contendo o antibiótico ampicilina e um produto químico chamado X-Gal. Devido as células de *E. coli* não possuírem o gene de resistência à ampicilina (*ampR*), as células que não foram transformadas não crescerão nesse meio. Já as células que contém o plasmídeo com o gene *ampR*, mesmo sem o fragmento de DNA inserido a ele, crescerão no meio. Porém, devido a essa célula produzir a enzima β -galactosidase haverá a quebra do X-Gal liberando um produto de cor azul, colorindo essas colônias. Finalmente, as células contendo o plasmídeo no qual um fragmento de DNA foi inserido corretamente no gene *lacZ* não produzirão β -galactosidase e, assim, colônias derivadas dessas células crescerão no meio e apresentarão uma cor branca normal, as quais serão identificadas e selecionadas (WALSH, 2007).

Segundo Groves (2006), para escolher a melhor célula hospedeira deve-se observar alguns aspectos, entre eles: se o crescimento da célula é lento ou rápido; o custo; o nível de expressão de produto alcançado pela célula; a facilidade da purificação do produto levando em conta a secreção dele no meio; se o produto, no caso uma proteína, será dobrada corretamente e modificada para atingir sua atividade; e, se os vetores são adequados para ela.

3 | EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS

Devido às técnicas de DNA recombinante, que transformam células em fábricas para sintetizar proteínas, a produção comercial de insulina, hormônio do crescimento, fator estimulador de colônias de granulócitos, vacinas e outras proteínas humanas com usos terapêuticos tornou-se possível (ALBERTS et al., 2007; RAMANA; XAVIER; SHARMA, 2017). A expressão heteróloga de proteínas provenientes da manipulação de genes específicos representa a última etapa da tecnologia do DNA recombinante (CARUSO, 2007).

Inicialmente, obtém-se um clone do gene que codifica a proteína de interesse, após, os vetores que expressarão as proteínas são projetados com promotores para a transcrição do DNA e inseridos nas células hospedeiras. Para facilitar a purificação da proteína expressa, entre outros benefícios, normalmente implanta-se uma sequência nucleotídica curta (podendo ser seis resíduos de histidina no carbono terminal, por exemplo) ao final do DNA complementar, conhecida também como 'tag' (ALBERTS et al., 2007), que será discutida posteriormente.

Os vetores citados anteriormente foram projetados para isolamento e propagação de fragmentos de DNA com genes que codificam uma proteína específica, porém, para se alcançar altos níveis de expressão da proteína requerida, o vetor em questão deve suportar alto nível de transcrição e tradução. Os vetores de expressão devem possuir além de alguns elementos como origem de replicação, marcador selecionável com um gene de resistência a antibiótico e locais de restrição para clonagem, também região com promotor da transcrição, região de início da tradução, bem como terminadores da transcrição e da tradução, sequências reguladoras, sequência Shine-Dalgarno (RBS - *Ribosome Binding Site*) no caso de procariotos, proteínas de fusão para facilitar dobramento e purificação (opcional), ou seja, deve conter todas as sequências de DNA específicas que irão direcionar a transcrição e tradução do gene de interesse. Esses vetores estão disponíveis comercialmente e cada um é adaptado para funcionar melhor em um tipo específico de célula hospedeira (KAUR; KUMAR; KAUR, 2018; SØRENSEN; MORTENSEN, 2005; WALSH, 2007).

A clonagem de genes para expressão de proteínas geralmente começa com um cDNA, pois a maioria dos genes eucarióticos contém íntrons. Esse cDNA é usado como modelo na PCR onde o gene de interesse será amplificado, clonado, sequenciado e subclonado em um ou mais vetores de expressão. Alguns motivos levam a preferência da clonagem inicial em um vetor de não expressão antes do uso do vetor de expressão, como por exemplo o tamanho maior do vetor de expressão e seu baixo número de cópias complicando um pouco mais a clonagem e sequenciamento, a ocorrência de erros de sequência no gene ou polimorfismos de nucleotídeo único e também erros nos iniciadores de PCR. Assim, para melhorar a expressão e posterior purificação das proteínas esse processo pode ser realizado, confirmando antes a sequência do gene em questão e corrigindo algum erro que possa ter ocorrido (HARTLEY, 2006).

Muitos sistemas de expressão comerciais desenvolvidos para inúmeras aplicações e compatibilidades estão disponíveis, como exemplos pode-se citar o sistema de expressão pET baseado no promotor do fago T7 e também sistemas que utilizam os promotores *trc*, *lac*, *tac* e promotor PL do fago λ (RESENDE, 2015; SØRENSEN; MORTENSEN, 2005). Os promotores são elementos de um vetor que estão relacionados diretamente ao rendimento proteico, devido seu efeito na força e duração da transcrição. A RNA polimerase se liga a sequência promotora, localizada ao lado do gene alvo, iniciando a síntese de RNAm. Um promotor efetivo para expressão heteróloga de proteínas deve ser forte, apresentar baixa atividade de transcrição basal e sua indução deve ser simples e de baixo custo (FRANCIS; PAGE, 2010; RESENDE, 2015).

Espera-se de uma expressão heteróloga que a proteína de interesse seja estável, solúvel, expressa em grande quantidade, não tóxica para a célula hospedeira e facilmente

purificada. Não existe um sistema ideal para todas as proteínas possíveis, cada um possui características favoráveis e limitações (WALSH, 2007).

3.1 Sistemas de expressão heteróloga de proteínas

O uso de bactérias como *E. coli* como sistema de expressão heteróloga de proteínas é vantajoso devido sua biologia molecular ser bem caracterizada, possuir rápido crescimento, baixos custos de produção (GOMES et al., 2016; WALSH, 2007), escalonamento direto para maiores produções, além de fácil manipulação. Como desvantagens têm-se a falta de processamentos pós-traducionais, como a glicosilação; acúmulo intracelular de corpos de inclusão, que são agregados constituídos de proteínas desnaturadas ou incorretamente enoveladas; o processamento inadequado de transcritos de genes eucarióticos que contêm sequências não codificantes ou íntrons; a presença de lipopolissacarídeo em sua superfície; capacidade limitada de formar pontes dissulfídicas; viés de códon; acúmulo de endotoxinas e a falta de um sistema para secretar as proteínas ao meio extracelular, sendo que essa última desvantagem faz com que seja necessária uma purificação mais extensa para separar a proteína de interesse das demais proteínas homólogas adicionais produzidas pelas células de *E. coli* (BROWN, 2013; GOMES et al., 2016; GROVES, 2006; WALSH, 2007).

Alternativas para contornar algumas desvantagens desse sistema têm sido implantadas, como o uso de proteínas de fusão, uso de peptídeo sinal para direcionamento da proteína, condições especiais de crescimento, uso de aditivos, co-expressão com chaperonas e escolha da linhagem mais adequada (KAUR; KUMAR; KAUR, 2018). Deve-se selecionar a cepa de *E. coli* mais interessante e viável para clonagem e expressão de determinada proteína (SØRENSEN; MORTENSEN, 2005), pois existem diversas disponíveis comercialmente, como exemplo BL21 (Novagen), BL21 (DE3) (Novagen), BLR (DE3) (Addgene), Origami B (Novagen), T7 Express (Novagen), entre outras (KAUR; KUMAR; KAUR, 2018). A insulina humana recombinante foi o primeiro produto biofarmacêutico feito por engenharia genética, sendo produzida em *E. coli* com aprovação de marketing em 1982 (WALSH, 2007).

Um sistema de expressão eucariótico interessante e antigo é o de leveduras, representado na maioria das vezes por *Saccharomyces cerevisiae*, mas também por *Hansenulla polymorpha* e *Pichia pastoris* (BALAMURUGAN et al., 2006). Os sistemas eucarióticos permitem a modificação e o processamento de proteínas ao contrário dos bacterianos, o que constitui vantagem (CANÇADO, 2002; GOMES et al., 2016). Como vantagens também caracterizam-se o crescimento rápido em meios relativamente de baixo custo, não há produção de endotoxinas, parede externa resistente a danos físicos, possibilidade de secretar produtos de proteína para o meio mais rapidamente do que a *E. coli*, organismos listados como seguros pela grande aplicação industrial já utilizada, capacidade de processar transcritos de RNA para remover os íntrons e promover glicosilação de proteínas, esta última pode representar também uma desvantagem devido ao padrão de glicosilação variar um pouco das proteínas nativas podendo ocorrer também hiperglicosilação (GROVES, 2006; WALSH, 2007). Outra desvantagem observada é em relação aos níveis de expressão de proteínas heterólogas que situam-se abaixo dos alcançados por *E. coli* (WALSH, 2007) e também a possibilidade de viés do códon (GOMES

et al., 2016). Os principais biofarmacêuticos obtidos através de leveduras são a albumina sérica humana, insulina e seus análogos, e vacinas contra papilomavírus e hepatite (NIELSEN, 2013).

Fungos filamentosos também possuem capacidade de produzir grandes quantidades de proteína e são muito utilizados na indústria de alimentos principalmente como produtores de enzimas, como por exemplo *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Trichoderma reesei* (GOMES et al., 2016; LANDOWSKI et al., 2016). Possuem vantagens em relação ao crescimento rápido e robusto, secreção das proteínas nos meios extracelulares facilitando a purificação e também a capacidade de realizar modificações pós-traducionais como os demais sistemas eucarióticos (HAVLIK et al., 2017; WALSH, 2007). Porém, como desvantagem tem-se a maior complexidade desse sistema e a relativa falta de compreensão de sua fisiologia em comparação às bactérias (SU et al., 2012).

As microalgas, principalmente da espécie *Chlamydomonas reinhardtii*, representam outro sistema para a produção de proteínas recombinantes, devido ao baixo custo e tecnologia simples (DYO; PURTON, 2018). *C. reinhardtii* é um organismo modelo cujos três genomas foram sequenciados, sendo possível então direcionar a modificação genética (TAUNT; STOFFELS; PURTON, 2018). A introdução do gene de interesse no genoma de pequenos cloroplastos é desejada, pois garante uma expressão estável e de alto nível (DYO; PURTON, 2018). Outras vantagens apresentadas são a formação de ligações dissulfeto e dobragem adequada. Muitas proteínas recombinantes, incluindo anticorpos monoclonais, fatores de crescimento e vacinas são produzidas em *C. reinhardtii* (TAUNT; STOFFELS; PURTON, 2018).

Outras células eucarióticas usadas incluem linhagens celulares derivadas de tumor, células de ovário de hamster chinês e células de rim de hamster bebê. O crescimento dessas células é muito mais lento do que leveduras ou bactérias além de serem mais sensíveis às mudanças no pH, temperatura, nível de oxigênio, metabólitos e às forças de cisalhamento. O cultivo para produção em larga escala é mais complicado e apresentam níveis variados de expressão das proteínas heterólogas (GOMES et al., 2016; GROVES, 2006), além de geralmente exigirem a suplementação de fatores de crescimento, aminoácidos, agentes redutores ou vitaminas (ZHU, 2012). Porém, dentre as vantagens encontram-se a capacidade de secretar o produto proteico no meio, de processar adequadamente os transcritos de RNA para expressão gênica e modificar adequadamente a proteína expressa por clivagem, glicosilação e redobramento, por exemplo (GROVES, 2006). A cultura de células de mamíferos geralmente é usada apenas na fabricação de proteínas terapêuticas que mostram modificações pós-traducionais extensas e essenciais, incluindo gonadotrofinas, algumas citocinas, anticorpos monoclonais, fatores de coagulação, enzimas, entre outros (DUMONT et al., 2016; WALSH, 2007). Os promotores do citomegalovírus são amplamente utilizados na construção de cassetes de expressão para células de mamíferos (KHAN, 2014).

Sobre os sistemas de cultura de células de insetos envolve-se a infecção dessas células cultivadas com o vetor de expressão baculovírus geneticamente modificado, que carrega integrado ao seu genoma o gene que codifica a proteína desejada controlado por um potente promotor viral e pelo seu terminador correspondente (FELBERBAUM, 2015; STÖGER et al., 2005). Alguns insetos utilizados são *Spodoptera frugiperda*, *Drosophila*

melanogaster e *Autographa californica* (GECHELE et al., 2015). São células que crescem mais rápido comparadas a de mamíferos, não há risco de contaminação por príons e DNA oncogênico, garantem alto rendimento (CONTRERAS-GÓMEZ et al., 2014; GECHELE et al., 2015) e servem de ferramenta para produção de glicoproteína recombinante. Porém, como desvantagens encontram-se as modificações pós-traducionais que podem ser incompletas, podem diferir dos padrões associados às glicoproteínas humanas nativas e culturas com condições mais exigentes. O antígeno de superfície da hepatite B e IFN- γ são exemplos de proteínas terapêuticas produzidas com sucesso em escala laboratorial em linhas celulares de insetos (WALSH, 2007).

A produção de proteínas heterólogas em animais transgênicos também ganhou um certo destaque, pois como cada célula do animal transgênico resultante abrigará uma cópia do DNA transferido, essa nova informação genética introduzida pode ser transmitida de uma geração para a seguinte, produzindo a proteína de interesse continuamente. Para facilitar a liberação da proteína, uma alternativa foi direcionar a produção de proteínas para a glândula mamária, na qual cabras e ovelhas provaram ser interessantes devido a características como altas capacidades de produção de leite e facilidade de manuseio e criação (WALSH, 2007). A primeira proteína recombinante aprovada em 2006 foi a antitrombina, secretada no leite de cabras (MAKSIMENKO et al., 2013). Além do leite, anticorpos e outras proteínas já foram produzidos no sangue de porcos e coelhos transgênicos. Porém, várias razões tornam esse sistema inviável industrialmente, entre elas a possibilidade de coletar pequenos volumes de sangue, a complexidade do soro que contém uma variedade de proteínas nativas tornando a purificação mais difícil, a falta de estabilidade das proteínas e os efeitos colaterais fisiológicos negativos que podem ser causados pela proteína no animal produtor (WALSH, 2007).

Também foi demonstrada a produção de β -lactamase na clara de ovos de galinhas transgênicas (HARVEY et al., 2002). Algumas vantagens como dobragem adequada das proteínas, glicosilação correta e modificações pós-traducionais adequadas são destacadas (GOMES et al., 2016), porém, o custo mais alto, tempo de produção elevado e baixo rendimento representam problemas, além ainda do risco de contaminação por vírus (CANÇADO, 2002; GOMES et al., 2016; LARRICK; THOMAS, 2001).

O uso de plantas como sistema de expressão de proteínas heterólogas, em comparação aos demais eucariotos, apresenta-se com maior segurança, menor tempo, baixo custo e é superior em termos de armazenamento e distribuição. Constituem um sistema ideal para expressar proteínas heterólogas que requerem modificações pós-traducionais um pouco mais complicadas. Tais proteínas expressas podem ser localizadas em diferentes órgãos da planta e existe a possibilidade de manipular o tempo de expressão para estágios de crescimento específicos (ŁOJEWSKA et al., 2016). Oferecem uma fonte de material menos custosa para seu cultivo em comparação a outros microrganismos e devido a facilidade pode-se cultivar um número maior para aumentar o rendimento total das proteínas (ESPÍRITO SANTO, 2013).

Em relação ao uso de plantas transgênicas, uma gama de proteínas terapêuticas podem ser expressas pelo tecido da planta, pois a planta pode receber a transferência dos genes de interesse através de vetores principalmente pelo patógeno vegetal *Agrobacterium*, no qual uma porção do plasmídeo é translocada e integrada ao genoma da célula vegetal,

ou também através de vetores virais de plantas (BUYEL; TWYMAN; FISCHER, 2017; WALSH, 2007). No primeiro método, plantas transgênicas com uma expressão estável são obtidas, enquanto no segundo caso a expressão transitória do gene é obtido (YAO et al., 2015). Algumas desvantagens do sistema de plantas transgênicas são padrões de glicosilação diferentes da proteína humana nativa (WALSH, 2007), presença de metabólitos que podem contaminar o produto bruto, natureza geográfica/sazonal do crescimento da planta (BALAMURUGAN et al., 2006), a variação dos níveis de expressão de acordo com o destino e a necessidade de melhorar o desenvolvimento dos ensaios (GOMES et al., 2016) invasion and metastasis. Tissue and serum levels of MMP2 and MMP9 correlate with disease prognosis. Real-time PCR is emerging as an alternative or supplementary technique to immunohistochemistry (IHC).

3.2 Análise e seleção dos recombinantes

Quanto ao processo de seleção, o mesmo pode envolver a resistência a antibióticos ou a habilidade das células hospedeiras de crescerem na ausência de certos suplementos nutricionais, capacidade gerada pelos vetores inseridos, como previamente discutido a respeito da inserção do fragmento de interesse no gene lacZ, o que determinará quais colônias foram transformadas pela cor apresentada (WALSH, 2007). Pode-se realizar também uma PCR seguida de sequenciamento para confirmar a presença do gene de interesse.

Além disso, técnicas imunológicas podem ser usadas para detectar a presença da proteína que foi produzida pelos clones (GROVES, 2006), como a verificação da expressão da proteína pela técnica de *Western blotting* acompanhada por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (LIU; YANG, 2012), e ainda, dependendo do produto em questão, existe a possibilidade de encontrar o clone adequadamente transformado que expressou uma enzima, por exemplo, procurando pela atividade dela na célula (GROVES, 2006).

3.3 Purificação de proteínas

Antes da purificação é necessário que a proteína seja retirada da célula hospedeira e o processo vai depender se o sistema de expressão libera o produto no meio intracelular ou extracelular. Nos dois casos, as células podem ser coletadas por centrifugação ou microfiltração (WALSH, 2007). Ainda, no caso de produto intracelular, realiza-se a ruptura celular para obter a proteína de interesse. Essa ruptura é frequentemente alcançada por métodos mecânicos como homogeneização ou agitação vigorosa com abrasivos, mas também pode-se recorrer ao uso de produtos químicos como detergentes, solventes como tolueno, agentes caotrópicos como ureia, através de enzimas como lisozima, exposição a condições alcalinas e sonicação (AHMAD et al., 2014). Após a ruptura das células, ocorre a concentração do produto bruto, podendo ocorrer principalmente por ultrafiltração ou também através de sais que induzem a precipitação (WALSH, 2007).

No caso do produto intracelular produzido em procariotos, a secreção no espaço extra citoplasmático pode ser alcançada fundindo a proteína recombinante a um peptídeo sinal adequado. Alguns exemplos de peptídeos são: OmpA (proteína A da membrana externa), PhoE (proteína E dos poros da membrana externa), Lpp (lipoproteína mureína) e OmpT

(protease VII) (CHOI; LEE, 2004). O peptídeo sinal é clivado e a proteína recombinante se dobra no periplasma com a ajuda de chaperonas e formam-se ligações dissulfeto gerando a conformação correta (KAUR; KUMAR; KAUR, 2018). Geralmente a proteína é expressa em maiores quantidades no citoplasma bacteriano, porém na forma de corpos de inclusão. Então, é necessário um processamento adequado desses agregados para se obter a forma solúvel da proteína, passando pelo isolamento, purificação, solubilização, renaturação e dobramento, através de reagentes específicos e técnicas diversas (CLARK, 2001).

Para purificar proteínas recombinantes são utilizados os mesmos meios de purificação de proteínas tradicionais, porém, a purificação pode ser até mais direta devido a capacidade de alcançar altos níveis de expressão da proteína desejada. Técnicas de cromatografia que as separam considerando suas propriedades específicas e diferenças são amplamente utilizadas, como exemplo cita-se a cromatografia de troca iônica, de afinidade, de imunoafinidade e cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), sendo que essa última poderá ser utilizada desde que a alta pressão aplicada não afete o produto proteico (WALSH, 2007).

O procedimento de purificação consiste na separação da proteína alvo, mantendo sua estrutura química e atividade biológica (LABROU, 2014), e representam entre 45 a 92% dos custos totais da fabricação de proteínas recombinantes (SARASWAT et al., 2013). Como princípio básico da separação cromatográfica tem-se uma fase móvel fluida que transporta espécies em direção a uma fase estacionária sólida, baseando-se nas diferenças de afinidade. Ao longo da coluna, alguns componentes da amostra transportada pelo eluente apresentarão interações mais fortes com a fase estacionária do que outros, gerando perfis de concentração e diferentes velocidades de eluição. Assim, espécies mais retidas eluirão por último, permitindo a coleta do produto de interesse com maior pureza (FARIA; RODRIGUES, 2015).

Cada metodologia de purificação utiliza uma característica particular das proteínas, por exemplo, quando se trata da especificidade do ligante, a cromatografia de afinidade é usada, tendo como base a interação bioespecífica entre uma proteína e um ligante apropriado, sendo o método mais popular; quando as proteínas possuem diferenças na carga a um determinado pH a cromatografia de troca iônica é preferida; quando as proteínas variam em tamanho é utilizada a cromatografia por exclusão de tamanho ou gel filtração; e, quando se trata de hidrofobicidade, são utilizadas a cromatografia de fase reversa e a cromatografia de interação hidrofóbica (OWCZAREK; GERSZBERG; HNATUSZKO-KONKA, 2019). Dependendo da proteína em questão, várias etapas de cromatografia podem ser requeridas (WALSH, 2007).

Algumas considerações importantes sobre o processo de purificação de proteínas são: deve ser simples e com o mínimo de etapas; uso de reagentes mais baratos; deve haver monitoramento constante; o produto final deve ser altamente purificado; gastar pouco tempo; permitir alta reprodutibilidade e sempre utilizar aparelhagem confiável (KHAN, 2014).

A incorporação de 'tags' ou proteínas de fusão podem facilitar o processo de purificação. Utiliza-se da engenharia genética para incorporação de tags específicas de peptídeos ou proteínas à proteína de interesse, que ligam-se às proteínas alvo por

um sítio de reconhecimento de uma protease específica (KOSOBOKOVA; SKRYPNIK; KOSORUKOV, 2016). Foram projetadas com sucesso tags que permitem a purificação rápida e direta da proteína híbrida por técnicas como cromatografia de afinidade, troca iônica, interação hidrofóbica ou imunoafinidade. Dependendo do marcador adicionado pode ser gerada uma carga positiva na proteína o que facilita sua purificação por troca catiônica, por exemplo (WALSH, 2007).

Após a purificação da proteína híbrida, é necessária a remoção do marcador, que pode ser realizada por meios químicos ou enzimáticos (WALSH, 2007), adicionando outra etapa e custo ao processo de produção de proteína recombinante (LI, 2011), porém, dependendo da sequência adicionada pode não afetar a estrutura final da proteína (OWCZAREK; GERSZBERG; HNATUSZKO-KONKA, 2019). Essas proteínas de fusão que se ligam às proteínas recombinantes facilitam não só a purificação, como também podem proteger as proteínas da proteólise, aumentar a solubilidade, facilitar o reconhecimento e melhorar a expressão. Podem ser tanto sequências curtas de aminoácidos como resíduo de histidina (poli-His), resíduo de arginina (poli-Arg) e epítipo FLAG, quanto proteínas como tioredoxina (TRX), proteína ligante da maltose (MBP), glutationa S-transferase (GST) e proteína verde fluorescente (GFP) (BUCHER; EVDOKIMOV; WAUGH, 2002).

Para acompanhar o progresso da purificação de proteínas ensaios analíticos são essenciais, entre eles estão métodos físicos e químicos, para determinar a qualidade da preparação final e a caracterização da proteína (VEDADI et al., 2010). Um método de quantificação do produto final é a medição da absorbância da proteína utilizando a ligação com corantes, e, para avaliar a pureza utiliza-se a técnica de SDS-PAGE, podendo ser acompanhada de *Western blotting*, além também de outras técnicas como eletroforese capilar, HPLC e espectrometria de massas (WALSH, 2007).

Adicionalmente, podem ser realizadas diferentes análises que não somente detectam impurezas proteicas, mas verificam se a substância está em total conformidade com o que foi proposto inicialmente, como mapeamento de peptídeos, análise de aminoácidos, sequenciamento N-terminal e análises espectrofotométricas. O processamento seguinte vai depender do objetivo com a proteína obtida, o que pode envolver a adição de excipientes, filtragem estéril, liofilização ou preparo de solução, por exemplo (WALSH, 2007).

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

A expressão heteróloga de proteínas, que surgiu através da tecnologia do DNA recombinante, permitiu um avanço na produção em larga escala de muitos produtos importantes como hormônios, vacinas, entre outros. No presente capítulo foram descritos de forma geral o histórico, aplicação e todo processo que envolve desde a manipulação do gene de interesse, escolha de vetores, características dos sistemas de expressão heteróloga de proteínas, métodos de análise e identificação até a completa purificação das proteínas.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, M. *et al.* **Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 98, p. 5301–5317, 2014.
- ALBERTS, B. *et al.* **Molecular Biology of the Cell.** 5. ed. New York: Garland Science, 2007.
- BALAMURUGAN, V.; SEN, A.; SARAVANAN, P.; SINGH, R. K. **Biotechnology in the Production of Vaccine or Antigen for animal health.** Journal of Animal and Veterinary Advances, v. 5, n. 6, p. 487–495, 2006.
- BROWN, T. A. **Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction.** 6. ed. Hong Kong: John Wiley & Sons, 2013.
- BUCHER, M. H.; EVDOKIMOV, A. G.; WAUGH, D. S. **Differential effects of short affinity tags on the crystallization of Pyrococcus furiosus maltodextrinbinding protein.** Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, v. 58, p. 392–397, 2002.
- 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, 2017.
- CANÇADO, L. J. **Utilização de Sementes de Tabaco Transgênico como Biorreatores para Produção de um Fragmento scFv de um Anticorpo Monoclonal.** [s.l.] Universidade Estadual de Campinas UNICAMP, 2002.
- CARNEIRO, A. A.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. **Transformação genética de milho utilizando o bombardeamento de partículas.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2004.
- CARUSO, C. S. **Clonagem, expressão e caracterização de proteínas recombinantes de Xylella fastidiosa.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2007.
- CHOI, J. H.; LEE, S. Y. **Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 64, n. 5, p. 625–635, 2004.
- CLARK, E. D. B. **Protein refolding for industrial processes.** Current Opinion in Biotechnology, v. 12, n. 2, p. 202–207, 2001.
- CONTRERAS-GÓMEZ, A. *et al.* **Protein production using the baculovirus-insect cell expression system.** Biotechnology Progress, v. 30, n. 1, p. 1–18, 2014.
- DUMONT, J. *et al.* **Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives.** Critical Reviews in Biotechnology, v. 36, n. 6, p. 1110–1122, 2016.
- DYO, Y. M.; PURTON, S. **The algal chloroplast as a synthetic biology platform for production of therapeutic proteins.** Microbiology, v. 164, n. 2, p. 113–121, 2018.
- EGELKROUT, E.; RAJAN, V.; HOWARD, J. A. **Overproduction of recombinant proteins in plants.** Plant Science, v. 184, p. 83–101, 2012.
- ESPÍRITO SANTO, P. F. R. **Pesquisa de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* para expressão de proteína recombinante.** [s.l.] Universidade de Coimbra, 2013.

FARIA, R. P. V.; RODRIGUES, A. E. **Instrumental aspects of Simulated Moving Bed chromatography**. Journal of Chromatography A, v. 1421, p. 82–102, 2015.

FELBERBAUM, R. S. **The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors**. Biotechnology Journal, v. 10, n. 5, p. 702–714, 2015.

FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

FRANCIS, D. M.; PAGE, R. **Strategies to optimize protein expression in *E. coli***. Current Protocols in Protein Science, n. SUPPL. 61, 2010.

GECCHELE, E. *et al.* **A comparative analysis of recombinant protein expression in different biofactories: Bacteria, insect cells and plant systems**. Journal of Visualized Experiments, n. 97, 2015.

GOMES, A. R. *et al.* **An Overview of Heterologous Expression Host Systems for the Production of Recombinant Proteins**. Advances in Animal and Veterinary Sciences, v. 4, n. 7, p. 346–356, 2016.

GROVES, M. J. **Pharmaceutical Biotechnology**. 2. ed. New York: Taylor & Francis Group, LLC, 2006.

HARTLEY, J. L. **Cloning technologies for protein expression and purification**. Current Opinion in Biotechnology, v. 17, n. 4, p. 359–366, 2006.

HARVEY, A. J. *et al.* **Expression of exogenous protein in the egg white of transgenic chickens**. Nature Biotechnology, v. 20, n. 4, p. 396–399, 2002.

HAVLIK, D. *et al.* **Establishment of *Neurospora crassa* as a host for heterologous protein production using a human antibody fragment as a model product**. Microbial Cell Factories, v. 16, n. 1, p. 128, 2017.

KAUR, J.; KUMAR, A.; KAUR, J. **Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli* : Roadblocks and reinforcements**. International Journal of Biological Macromolecules, v. 106, p. 803–822, 2018.

KHAN, K. H. **Gene Expression Systems and Recombinant Protein Purification**. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, v. 5, n. 6, p. 450–463, 2014.

KOSOBOKOVA, E. N.; SKRYPNIK, K. A.; KOSORUKOV, V. S. **Overview of fusion tags for recombinant proteins**. Biochemistry (Moscow), v. 81, n. 3, p. 187–200, 2016.

LABROU, N. E. **Protein purification: An overview**. Methods in Molecular Biology, v. 1129, p. 3–10, 2014.

LANDOWSKI, C. P. *et al.* **Enabling low cost biopharmaceuticals: high level interferon alpha-2b production in *Trichoderma reesei***. Microbial Cell Factories, v. 15, n. 104, 2016.

LARRICK, J. W.; THOMAS, D. W. **Producing proteins in transgenic plants and animals**. Current Opinion in Biotechnology, v. 12, n. 4, p. 411–418, 2001.

LI, J.; LIN, H. **Numerical simulation of molecular uptake via electroporation**. Bioelectrochemistry, v. 82, n. 1, p. 10–21, 2011.

LI, Y. **Self-cleaving fusion tags for recombinant protein production**. *Biotechnology Letters*, v. 33, n. 5, p. 869–881, 2011.

LIU, Z. Q.; YANG, P. C. **Construction of pET-32 α (+) vector for protein expression and purification**. *North American Journal of Medical Sciences*, v. 4, n. 12, p. 651–655, 2012.

ŁOJEWSKA, E. *et al.* **Extraction and purification methods in downstream processing of plant-based recombinant proteins**. *Protein Expression and Purification*, v. 120, p. 110–117, 2016.

MAKSIMENKO, O. G. *et al.* **Use of Transgenic Animals in Biotechnology: Prospects and Problems**. *Acta Naturae*, v. 5, n. 1, p. 33–46, 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NIELSEN, J. **Production of biopharmaceutical proteins by yeast: Advances through metabolic engineering**. *Bioengineered*, v. 4, n. 4, p. 207–211, 2013.

OWCZAREK, B.; GERSZBERG, A.; HNATUSZKO-KONKA, K. **A Brief Reminder of Systems of Production and Chromatography-Based Recovery of Recombinant Protein Biopharmaceuticals**. *BioMed Research International*, v. 2019, 2019.

RAMANA, K. V.; XAVIER, J. R.; SHARMA, R. K. **Recent Trends in Pharmaceutical Biotechnology**. *Pharmaceutical Biotechnology: Current Research*, v. 1, n. 1, p. 1–10, 2017.

RAI, M.; PADH, H. **Expression systems for production of heterologous proteins**. *Current Science*, v. 80, n. 9, p. 1121–1128, 2001.

RESENDE, R. R. **Biotecnologia aplicada à saúde - vol. 2: fundamentos e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2015.

SAMPATH KUMAR, S.; PUTTARAJU, H. P. **Improved microinjection technique for mosquito vectors**. *Indian Journal of Medical Research*, v. 136, n. 6, p. 971–978, 2012.

SARASWAT, M. *et al.* **Preparative Purification of Recombinant Proteins: Current Status and Future Trends**. *BioMed Research International*, v. 2013, p. 1–18, 2013.

SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. **Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli***. *Journal of Biotechnology*, v. 115, p. 113–128, 2005.

STOGER, E. *et al.* **Sowing the seeds of success: Pharmaceutical proteins from plants**. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 16, n. 2, p. 167–173, 2005.

STUDART-GUIMARÃES, C.; LACORTE, C.; BRASILEIRO, A. C. M. **Transformação Genética em Espécies Florestais**. *Ciência Florestal*, v. 13, n. 1, p. 167–178, 2003.

SU, X.; SCHMITZ, G.; ZHANG, M.; MACKIE, R. I.; CANN, I. K. **Heterologous gene expression in filamentous fungi**. In: GADD, G. M.; SARIASLANI, S. *Advances in Applied Microbiology*. USA: Elsevier, 2012. p 1-61.

TAUNT, H. N.; STOFFELS, L.; PURTON, S. **Green biologics: The algal chloroplast as a platform for making biopharmaceuticals**. *Bioengineered*, v. 9, n. 1, p. 48–54, 2018.

VEDADI, M. *et al.* **Biophysical characterization of recombinant proteins: A key to higher structural genomics success.** Journal of Structural Biology, v. 172, n. 1, p. 107–119, 2010.

WALSH, G. **Pharmaceutical Biotechnology Concepts and Applications.** England: John Wiley & Sons Ltd, 2007.

YAO, J. *et al.* **Plants as factories for human pharmaceuticals: Applications and challenges.** International Journal of Molecular Sciences, v. 16, n. 12, p. 28549–28565, 2015.

ZHU, J. **Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production.** Biotechnology Advances, v. 30, n. 5, p. 1158–1170, 2012.

SOBRE OS ORGANIZADORES

ANDERSON BARROS ARCHANJO – Farmacêutico pela Universidade Federal do Espírito Santo (2014). Doutor em Biotecnologia (Área de concentração: Biotecnologia na Saúde) pela Rede Nordeste de Biotecnologia ponto focal Universidade Federal do Espírito Santo (2018) e pesquisador em Biotecnologia (Nível: Pós-doutorado) pela mesma universidade (2018-2021) com fomento pela FAPES/CAPES (Processo: 83757490). Atuou como professor voluntário, para a graduação, na Universidade Federal do Espírito Santo nas disciplinas de Bioquímica, Bioquímica III, Microbiologia Básica e Biologia Celular, e para a pós-graduação as disciplinas de Metodologia da Pesquisa Científica e Tópicos Especiais em Biotecnologia II: Avanços Metodológicos em Biologia Molecular e Biotecnologia. Tem experiência nas áreas de Patologia Experimental e Laboratorial e Biologia Celular e Molecular, atuando nos seguintes temas: câncer de cabeça e pescoço, regulação de expressão gênica, vias de hipóxia e estresse oxidativo, tabagismo e caracterização elementar em câncer oral.

ALINE RIBEIRO BORÇOI - Pesquisadora FAPES/CNPq-Desenvolvimento Científico Regional. Bacharel em farmácia pela Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), mestre em farmacologia pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), doutorado e pós-doutorado em biotecnologia em saúde pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)/RENORBIO. Atua na área de neurociência, psicofarmacologia e epigenética, com ênfase em comportamento e transtornos mentais.

SUZANNY OLIVEIRA MENDES - Pesquisadora de Pós-Doutorado em Biotecnologia na Universidade Federal do Espírito Santo. Possui Bacharelado em Ciências Biológicas, Mestrado e Doutorado em Biotecnologia pela mesma instituição. Foi Professora Voluntária da disciplina de Imunologia por 2 semestres. Possui 2 especializações na área da Docência. Tem experiência na área de Biologia Molecular, atuando principalmente nos seguintes temas: câncer de cabeça e pescoço, câncer intestinal, regulação de expressão gênica, vias de hipóxia, inflamação e tabagismo. Atualmente desenvolve trabalhos na área de epigenética, hábitos de vida e adoecimento.

ADRIANA MADEIRA ÁLVARES-DA-SILVA - Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho UNESP São José do Rio Preto (1989), Mestrado em Genética pelo Departamento de Anatomia da Universidade Federal de São Paulo (2000), Doutorado em Ciências na área de Genética e Biologia molecular aplicada à Endocrinologia Clínica pela Universidade Federal de São Paulo (2003), Pós-Doutorado em Biologia Molecular pelo projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço no Hospital Heliópolis. Professora do Departamento de Biologia do CCENS/UFES (2010-2020). Atualmente é Professora Associada I do Departamento de Morfologia do CCS/UFES e docente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e RENORBIO da UFES. Tem experiência na área de Genética, com ênfase em Biologia Molecular e Epigenética, atua principalmente nos seguintes temas: carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, epigenética, práticas integrativas e complementares na redução do estresse, estilo de vida, biologia molecular. Na área de extensão é responsável pela criação da Rede do Bem Capixaba - atividade de organização da sociedade civil. Coordenadora do projeto de implantação de práticas integrativas no SUS e criação do ambulatório de redução de estresse em Alegre - ES.

AVANÇOS METODOLÓGICOS EM BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA



www.atenaeditora.com.br



contato@atenaeditora.com.br



[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)



www.facebook.com/atenaeditora.com.br

AVANÇOS METODOLÓGICOS EM BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA



www.atenaeditora.com.br



contato@atenaeditora.com.br



[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)



www.facebook.com/atenaeditora.com.br