



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Avaliação de cloroplastos de alface e cotilédones de soja como
plataformas de produção de Proteína Morfogenética Óssea tipo 2

Lídia Nascimento Queiroz

Orientador: Francisco José Lima Aragão

BRASÍLIA/ 2019

Lídia Nascimento Queiroz

Avaliação de cloroplastos de alface e cotilédones de soja como
plataformas de produção de Proteína Morfogénica Óssea tipo 2

Tese de doutorado apresentada à Banca
Examinadora da pós-graduação em Biologia
Molecular como exigência final para obtenção do
título de Doutora em Biologia Molecular

Orientador: Dr. Francisco José Lima Aragão

Dedicatória

**À minha mãe,
Que já foi doutoranda e cientista,
DEDICO**

Agradecimentos

Sozinha eu jamais teria conseguido chegar a este momento. Todas as presenças, tanto físicas quanto espirituais, e as boas energias emanadas, somaram ao meu lado pessoal e profissional.

Vou iniciar meus agradecimentos lá em Minas Gerais, minha terra amada:

Agradeço ao meu pai, que me apóia de várias formas, inclusive da mais importante, transmitindo amor que me ajuda a seguir em frente. Agradeço à minha irmã, Cecília, que tem um coração maior que ela, e se fez presente nessa jornada do doutorado de muitos jeitos (obrigada pela paciência que teve morando comigo). Agradeço à minha irmã Isabela, que mesmo distante fisicamente, se fez presente em demonstrações sutis, mas profundas, do amor que nos une. Agradeço à Lê, parte importante da família. Agradeço ao Júlio, por todo apoio dado à minha família.

Agradeço à minha Vó Angelina, que é um exemplo de como lidar com a vida de forma simples e sem se abalar. Agradeço ao tio Têti, das pessoas mais leves e solidárias que conheço. Obrigada pelo apoio de sempre!

Agradeço aos meus familiares lá de São Miguel: Tia Rita, Tia Dodôra, Tia Sãozinha (guerreira!), Tio Amadeu (fique com Deus), Tio Dimas, Tio André, Nailla, Nic, Paulinha, Bruno, Abel, Gabi, Vinicius e Maria Laura. Tenho muita sorte de ter uma família unida e animada, que sempre me transmite forças. Agradecimento especial à Tia Cai e Tio Taquinho, sempre próximos lá de casa, cuidando de nós. Tio Taquinho, obrigada também pelos conselhos sábios, que me guiam desde criança. Tia Dôra, obrigado por ter sido (continuar sendo) como uma mãe pra mim, e por ter cuidado da minha com tanta atenção e carinho.

Agradeço à Marina, “primã” que tem que me aguentar pelo telefone quase que diariamente. Das pessoas mais indiretamente envolvidas nesta jornada acadêmica, orienta desde minha vida até experimentos. Já deu três linhas aqui (mais que pro meu pai, hein).

E por falar em irmãs agregadas: obrigada, May! Amizade de colégio que se tornou amizade da BQI e que sei que é amizade pra toda vida. Consegue ser ao mesmo tempo a voz da razão e a voz que chama pro “frevo”. Pro que der e vier, seguimos em frente.

Obrigada à galera linda da BQI que resiste, permanece unida e animada, e tornou o tempo do doutorado mais leve com nossos encontros. Agradecimento especial à Mandinha e à Janis, amigas mais que queridas. De perto ou de longe, compartilhamos bons momentos, histórias, e as agruras da vida de doutoranda.

Agora vem a segunda parte: agradecimentos em Brasília, essa cidade que eu aprendi a amar:

Agradeço ao Tio Teldo, Tia Dalma, Elisa e Vítor. Vocês são verdadeiros anjos na minha vida, que me acolheram e me fizeram me sentir amada. Conviver com vocês foi um privilégio enorme. Um aprendizado de leveza e simplicidade, que me influenciaram a me tornar uma pessoa melhor, tanto pessoal quanto profissionalmente. Tio Teldo, obrigada por me apoiar nas minhas escolhas, por ter sido um irmão cuidadoso e um ombro amigo pra conversar.

Agradeço à Lucinha pelos momentos de diversão e pela ajuda e-nor-me que tem me dado nesta reta final.

Agradeço à Cris Citadin pela irmandade. Compartilhávamos apê, local de trabalho, gatos, risadas, momentos terapêuticos, memes e cultura pop anos 80. Obrigada por toda força que me impulsionou pessoal e profissionalmente.

Agradeço ao Valdi pela amizade, pelo carinho, e conhecimento transmitido.

Aos colegas de trabalho: GRATIDÃO e satisfação enorme por poder trabalhar num grupo tão harmonioso, onde pude conviver com colegas que foram como uma família durante todos esses anos.

Começo agradecendo às primeiras pessoas que eu encontro quando chego na Embrapa: Leane, Paulo, Rogério, Severiano, Quitéria e Seu Zé Antônio, obrigada pelos sorrisos, as conversas ali na correria da chegada e pela paciência.

Agradeço à Dona Antônia, Dona Marlene, Dona Bel, Eduardo e ao Adailton, pelas gentilezas e por cuidarem tão bem do ambiente de trabalho.

Aos agregados do lab e colegas do doutorado: Lílian, Eli, Luciana e Andressa, obrigada por toda ajuda na pesquisa e também pelos momentos de descontração ali no corredor ou fora da Embrapa.

Aos colegas de lab: Giovani, Jéssica, Natália Aline, Renato, Emanuel, Cristobal, Carol, Pabline, Nay, fica aqui o meu muito obrigada por toda ajuda e todo conhecimento compartilhado. Obrigada também pelas piadas ruins que alegram o dia (e as boas, raramente), pelos almoços e pela convivência tranquila.

Agradeço à Kenny pela amizade, bom humor e “enjoamento” ocasional que sempre alegram meu dia. Agradeço à Thaís pela amizade, pelas confidências, ajuda científica e risadas compartilhadas ao longo desses anos. Agradeço à Estela pelos vários momentos terapêuticos, pelo conhecimento científico e de mundo compartilhado, pelos batons e pelos “Bom dia”

forçados que eu arranco dela (hehe). Agradeço ao Tomas por essa amizade que eu compararia ao enigma do gato de schrodinger: ao mesmo tempo que te alegra, também te irrita. Sem mais.

Agradeço à Nati por adoçar metaforicamente e literalmente minha vida. Obrigada pela amizade, pelos memes e pelos protocolos. Agradeço à Tashi, mais conhecida como Jatiane ou Rosa Montero, por ser essa amiga parceira tão especial: parceira de viagens, barzinhos (agradecimento especial ao Matheus também), projetos (porque a gente trabalha também, né) e sofrências comuns do doutorando.

Agradeço ao Pedro por toda ajuda e companheirismo, e agradeço à Regina pela amizade e força transmitida.

Agradeço aos que passaram pelo lab: Rachel, Angélica, Cristiana e Franciele, obrigada por todo suporte científico e pelos bons momentos compartilhados. Agradeço ao Abdul, pelas orientações e também pela “fuleragem” que sempre quebrou o gelo no laboratório.

Agradeço a uma pessoa muito especial, que passou pelo lab mas nunca vai sair dos nossos corações. Parafraseando Paulinho da Viola, “Foi um rio que passou em minha (nossas) vida(s), e o meu coração se encheu de paz”. Mary, onde quer que você esteja, sei que está muito bem. Essa mensagem de gratidão também é uma oração.

Agradeço à Elsa Nogueira Paranaguá e Lago de Orleans e Bragança (hehe), cujo sobrenome é tão extenso quanto a paciência que ela tem pra organizar o laboratório e lidar com os frequentadores. Obrigada pela empatia que é fora da curva, obrigada pelas orações, pela amizade, pelos “trem” do lab que só você consegue achar. Se o LEG fosse um corpo, você corresponderia ao coração.

E como todo corpo precisa de cérebro, o meu agradecimento especial vai ao Francisco e à Gláucia. Francisco, muito obrigada por ter me acolhido nesse grupo tão especial, e por me orientar, me escutar, me apoiar das mais diversas formas durante meu doutorado. Gláucia, obrigada pelas orientações diversas, pela leveza e disposição cotidiana.

Terceira parte: Agradecimentos no hemisfério norte

Agradeço ao Professor Gustavo por ter me recebido tão bem, e por todo ensinamento transmitido durante meu período de doutorado sanduíche. Obrigado também pela confiança! Agradeço à Dani pela acolhida fraterna, você e o Gustavo conseguiram recriar um pedacinho de Minas Gerais através do lar e da personalidade gentil de vocês. Agradeço à Jéssica, Juninho, Rafa, Fábio e ao Chris por terem me recebido tão bem! Obrigada pela paciência e pelos ensinamentos, e também por todos momentos de descontração fora da bancada.

Agradeço ao Oscar por ter sido um companheiro tão atencioso e gentil, que me apoiou quando eu mais precisei.

Finalizando...

Agradeço à Dona Arlete pela orientação valiosa e pelas orações.

Agradeço à CAPES pela bolsa fornecida.

Agradeço aos professores da Universidade de Brasília, por todo conhecimento transmitido e pela dedicação ao bom funcionamento da pós graduação.

Agradeço aos membros da banca por terem aceitado o convite.

Agradeço aos que fizeram parte desta jornada, mas não estão nomeados aqui.

Quero agradecer agora à pessoa mais especial dessa lista singela que eu fiz. Àquela que foi o meu primeiro lar. Ela, que transcende qualquer tentativa de explicação que eu for dar aqui. Sinto muito sua falta, apesar de, ao mesmo tempo, sentir que você está sempre comigo. Obrigada, mãe. Por tudo. Tudo que, em grande parte, veio de você e do amor que você me deu.

Por último e mais importante, agradeço a Deus. Deus, que pode ser Deusa. Pode ser natureza, pode ser cidade, rio ou riso de criança. Pode ser física quântica, metafísica e biologia molecular. É o puro amor que dá vida a cada um de nós.

**“Science, for me, gives a partial explanation for life.
In so far as it goes, it is based on fact, experience and experiment”**

Rosalind Franklin

“Não quero faca, nem queijo. Quero a fome.”

Adélia Prado

RESUMO

A BMP-2 [*Bone Morphogenetic protein 2* (proteína morfogenética óssea)] desempenha um papel crucial na formação e regeneração de ossos e cartilagens, o que é crítico para a manutenção da integridade esquelética e reparo de fraturas ósseas. É uma proteína empregada comercialmente devido ao seu potencial osteoindutor. O objetivo deste trabalho foi de expressar a BMP-2 humana usando dois sistemas vegetais, cloroplastos de alface e sementes de soja. O gene rhBMP2 (que codifica o polipeptídeo de 13 kDa) foi introduzido em duas regiões do genoma do cloroplasto de alface. Dois eventos homoplásmicos foram obtidos, e RT-PCR demonstrou que o gene BMP-2 foi transcrito. No entanto, não foi possível detectar o acúmulo de rhBMP2 nas folhas. Foram obtidos dois eventos de soja para expressar o gene de hBMP2 completo (codificando para a proBMP2 de 45 kDa) fusionado com o peptídeo sinal da α -Coixina, sob controle do promotor de β -conglucina. A proteína BMP-2 foi expressa nas sementes transgênicas a níveis de até 9,28% da proteína solúvel total da semente, como determinado por ELISA. Foi demonstrado que a BMP-2 era biologicamente ativa, pois induziu uma cascata osteogênica em células C2C12, como observado pela expressão aumentada dos genes SP7 (osterix) e ALPI (fosfatase alcalina). Os resultados corroboram nossa observação anterior de que as sementes de soja fornecem uma estratégia eficaz para alcançar o acúmulo estável de proteínas terapêuticas funcionais, como a BMP-2.

Palavras chave: *Biopharming*, BMP-2, Cloroplasto de alface, Semente de soja, Transgênica, Planta transplastômica

ABSTRACT

The bone morphogenetic protein BMP-2 plays a crucial role in the formation and regeneration of bone and cartilage, which is critical for maintaining skeletal integrity and bone fracture repair. Because of its important role in osteogenic properties it has been commercially produced for clinical use. Here we report attempts to express human BMP-2 using two plant systems (lettuce chloroplast and soybean seeds). The *rhBMP2* gene (coding for the 13 kDa polypeptide) was introduced in two regions of the lettuce chloroplast genome. Two homoplasmic events were achieved and RT-PCR demonstrated that the *BMP-2* gene was transcribed. However, it was not possible to detect accumulation of rhBMP2 in leaves. Two soybean events were achieved to express a full-length *hBMP2* gene (coding for the 45 kDa proBMP2) fused with the α -Coixin signal peptide, under control of the β -conglycinin promoter. The BMP-2 protein was expressed in the transgenic seeds at levels of up to 9.28 % of the total soluble seed protein as determined by ELISA. It was demonstrated that BMP-2 was biologically active, because it was able to induce an osteogenic cascade in C2C12 cells, as observed by the enhanced expression of *SP7* (*osterix*) and *ALPI* (alkaline phosphatase) genes. Collectively, these results corroborated our previous observation that soybean seeds provide an effective strategy for achieving stable accumulation of functional therapeutic proteins, such as BMP-2.

Key words: Biopharming, BMP-2, Lettuce chloroplast, Soybean seeds, transgenic, transplastomic plant

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Formação de BMP's.	14
Figura 2. Representação esquemática do monômero de BMP-2.	14
Figura 3. Transdução do sinal de BMP-2.	15
Figura 4. Representação esquemática do genoma de cloroplasto de <i>Lactuca sativa</i>	18
Figura 5. Representação dos vetores de transformação.	24
Figura 6. Caracterização molecular das linhagens de alface transformadas com o vetor pCLLsBMP2 (ALF 1) e pLsCLOROBMP2 (ALF2)	25
Figura 7. RT-PCR mostrando a presença dos transcritos de BMP-2 (bandas superiores) nas folhas das linhagens de alface transplastômica ALF1 e ALF2.	26
Figura 8. Análises das linhagens transgênicas de soja.	26
Figura 9. Expressão relativa de genes alvo em C2C12.	28
Tabela 1. Produtos aprovados e comercialmente disponíveis produzidos em plantas transgênicas.	7
Tabela 2. Proteínas terapêuticas humanas produzidas em plastídeos nos últimos anos	9
Tabela 3. Sequências dos <i>primers</i> utilizados para detecção de transgenes em alface e soja	19
Tabela 4. Sequências dos <i>primers</i> utilizados para detecção de transcritos de rhBMP2	20

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Microgramas
µl	Microlitro
AlpI	Fosfatase alcalina
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMP-2	Bone Morphogenetic Protein 2
BglapII	Osteocalcina
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
C2C12	Células de mioblasto de camundongo
CHO	Chinese hamster ovary
CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ou Ensaio Imuno-enzimático
FBS	Soro bovino fetal
FDA	Federal Drug Administration
g	Velocidade de sedimentação gravitacional
g	Gramas
GFP	Green Fluorescent Protein
h	Horas
hBMP2	Human Bone Morphogenetic Protein 2
IgG	Imunoglobulina G
kDa	Kilo Dalton
M	Molar
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MS	Meio Murashigue-Skoog
ng	Nanogramas
°C	Graus Celsius
pb	Pares de base
PBS	Tampão de fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase

pH	Concentração de íon hidrogênio livre
proBM2	Pre-propeptide Bone Morphogenetic Protein 2
Proteína E	Proteína do Envelope
PST	Proteína solúvel total
rhBMP2	Recombinant human Bone Morphogenetic Protein 2
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Transcrição reversa – Reação em cadeia da polimerase
RunX2	Runt related transcription fator 2
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio -Gel de eletroforese de poliacrilamida
SP7	Osterix
TGF- β	Transforming Growth Factor β

Sumário

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
Plataformas de produção de biomoléculas	3
Expressão de biofármacos em sistemas vegetais: histórico e vantagens	5
Cloroplastos: expressão gênica.....	8
Cloroplastos de alface.....	10
Produção de biofármacos em soja	10
Proteína Morfogenética Óssea tipo 2.....	11
Histórico do uso de BMP-2	11
Caracterização da BMP-2	13
Sinalização mediada por BMP-2 em tecido ósseo.....	13
OBJETIVOS	16
Objetivo Geral	16
Objetivos específicos:	16
METODOLOGIA.....	17
Construção dos vetores	17
pLsCloroBMP2.....	17
pCLLsBMP2.....	17
pBMP2ahas.....	17
Transformação e regeneração de alface.....	18
Transformação e regeneração de soja.....	19
Extração de DNA e PCR (reação em cadeia da polimerase) de alface e soja	19
Confirmação da integração dos transgenes no genoma de alface.....	19
RT-PCR (transcrição reversa e reação em cadeia pela polimerase)	20
Imunoblot.....	20
Quantificação de hBMP2 em sementes transgênicas de soja	21

Cultivo de células C2C12	21
Ensaio de atividade biológica de BMP-2.....	21
RESULTADOS	23
Vetores de transformação e análises genômicas.....	23
pCLLsBMP2.....	23
pLsCloroBMP2.....	23
pBMP2ahas.....	23
RT-PCR de alface (transcriptase reversa).....	23
Imunoblot.....	25
Quantificação de hBMP2 em soja	27
Ensaio de atividade biológica de BMP-2.....	27
DISCUSSÃO	29
PERSPECTIVAS	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

BMP'S [*Bone morphogenetic proteins* (proteínas morfogenéticas ósseas)] constituem uma classe de proteínas humanas que foram inicialmente descritas em 1965, por Marshall Urist, como componentes da matriz óssea envolvidas na formação e regeneração de tecido muscular esquelético (Urist, 1965). Desde então, mais de 22 tipos de BMP's humanas têm sido descritas (Brazil et al., 2015), com destaque para a BMP-2, que é produzida comercialmente para emprego clínico, pelo seu potencial osteoindutor.

A BMP-2 é uma proteína pertencente à superfamília TGF- β [Transcription growth factor beta (Fator de transcrição de crescimento beta)], que induz ossificação endocondral/intramembranosa e condrogênese a partir da diferenciação de células-tronco mesenquimais a células da linhagem osteoblástica. Este é um processo crítico para a manutenção da integridade do esqueleto e reparo de fratura óssea (Carreira et al., 2014a). De fato, Tsuji et al. (2006) demonstraram em experimentos com camundongos BMP-2 *knock out* que os primeiros passos de cura da fratura nos ossos pareciam estar bloqueados.

Embora o reparo ósseo seja, em geral, bem-sucedido, há uma estimativa de que 5 a 10% das fraturas que ocorrem anualmente apresentem atraso no processo de cura/ ossificação (Bibbo et al., 2015). O emprego clínico de BMP-2 levou a redução do número de intervenções cirúrgicas nos casos citados e no tempo de recuperação, diminuindo o desconforto dos pacientes (Gautchi et al., 2007). A proteína recombinante foi aprovada para uso clínico em casos de fraturas da tíbia (2004), certos tipos de intervenções oral-maxilares (2007) e para fusão espinhal (2002) pelo órgão de administração de drogas e alimentos americano (FDA-*food and drug administration*).

Os sistemas atuais de síntese desta proteína para uso terapêutico utilizam a forma recombinante, rhBMP2 [recombinant human BMP-2 (BMP2 recombinante humana)], produzida principalmente em células CHO [*Chinese Hamster Ovary* (células de ovário de hamster chinês)] e *Escherichia coli* (Bessho et al., 2000). Estes sistemas de produção apresentam alto custo e baixos níveis de produtividade, dificultando o acesso ao tratamento (Walsh, 2014). Para fins terapêuticos, é necessário expressar a proteína em maior escala e em um sistema que assegure a atividade biológica sem imunogenicidade (Carreira et al., 2014a).

O uso de sistemas vegetais como plataformas para síntese de biofármacos representa uma alternativa promissora, especialmente pela possibilidade de se obter altos níveis de expressão da proteína de interesse, e pela diminuição dos custos de produção iniciais. Plantas

podem funcionar como biorreatores, substituindo sistemas procariotos e sistemas de cultivo em células de mamíferos, que, apesar de funcionarem bem, demandam alto investimento pelo custo de manutenção de fermentadores (De Martinis et al., 2016).

O emprego de plantas como biofábricas engloba diferentes estratégias, e a escolha da estratégia deve priorizar as características do produto preferencialmente à plataforma (Tschofen et al., 2016).

Dentre as plataformas disponíveis, o sistema de transformação plastidial oferece vantagens que vão além da economia e aumento da produtividade. Nesse sentido, características como contenção do transgene no cloroplasto, devido à herança materna que evita dispersão pelo pólen, e efeitos pleiotrópicos mínimos, devido à compartimentalização celular dos produtos, favorecem estabilidade e biossegurança na produção (Zhang et al., 2017). Características comerciais e alimentares da planta de alface, aliadas à grande concentração de cloroplastos presentes nas células foliares, fazem desta planta um alvo biotecnológico para produção de proteínas transplastômicas (Kanamoto et al., 2006).

O sistema de expressão em sementes também constitui outra ferramenta interessante, no sentido de oferecer a possibilidade de maior acúmulo protéico e armazenamento a longo prazo (Boothe et al., 2010). O direcionamento da expressão para retículo endoplasmático ou estruturas de reserva na semente, como vacúolos, também minimiza questões relacionadas à instabilidade protéica. Sementes de soja possuem vacúolos de armazenamento capazes de acumular altos níveis de proteínas, tecnologia que já foi empregada com sucesso para produção de biofármacos (Vianna et al., 2011).

Sendo assim, a busca por novos sistemas de produção pode representar uma solução para aumento da produtividade de BMP-2, com conseqüente diminuição de custos, viabilizando o acesso a esta proteína terapêutica. O emprego dos sistemas de transformação plastidial de alface e transformação nuclear para expressão em sementes de soja abrangem vantagens intrínsecas levando em consideração as condições necessárias para expressão adequada de uma proteína humana.

REVISÃO DE LITERATURA

Plataformas de produção de biomoléculas

Em meados dos anos 80 ocorreu o advento da engenharia genética como ferramenta para inserção de genes de interesse no genoma de microorganismos, e, em paralelo, se seguiu a busca por sistemas de expressão com capacidade de produção de moléculas alvo em larga escala para posterior purificação, processamento e comercialização, com destaque para iniciativas voltadas à indústria farmacêutica. A partir daí foi cunhado o termo “*Biopharming*”: O conceito de *biopharming* se refere à produção de medicamentos recombinantes fora de sua fonte natural. Por definição, o termo *biopharming* é precedido pela identificação de uma proteína com uma atividade diagnóstica ou terapêutica desejável, determinação e conhecimento da sequência protéica e do DNA, e finalmente sua expressão em um hospedeiro heterólogo (Fischer & Emans, 2000).

As principais plataformas empregadas na produção dos denominados “biofármacos” foram os sistemas de expressão em microorganismos ou em células de mamíferos, por apresentarem maior segurança e capacidade produtiva à época (Andersen & Krummen, 2002).

Sistemas procariotos foram a plataforma pioneira na indústria biofarmacêutica, com o registro do primeiro trabalho em 1977. Naquela ocasião, pesquisadores produziram heterologicamente Somastatina, uma proteína humana que atua na regulação da glicemia, em *E. coli* (Itakura et al., 1977). A partir daí, em 1982, foi aprovada comercialmente a produção de insulina para tratamento de diabetes, seguida da aprovação de fator de crescimento humano (hGH) em 1985, também empregando *E. Coli* (Gregory & Heyneker, 1988). Estas proteínas possuem estrutura relativamente simples e não são glicosiladas. Sistemas procariotos não possuem maquinaria pós-traducional, que dá suporte à expressão de proteínas mais complexas que necessitam de glicosilação e/ou pontes dissulfeto para correto enovelamento e funcionalidade. Estes fatores complicam a síntese de proteínas eucarióticas, que até podem, em alguns casos, ser tóxicas para bactérias. Mesmo apresentando benefícios como alto conhecimento sobre a genética do sistema e prazo curto para geração do produto, os índices de produtividade podem ser baixos (Schmidt, 2004; Assenberg et al., 2013). A presença de endotoxinas em culturas de bactérias é outro fator preocupante (Twyman et al., 2005). Recentemente foi possível obter algumas modificações pós-traducionais em bactérias por co-expressão com enzimas envolvidas neste processo. Isto resultou em diminuição da taxa de crescimento, além de vários vetores não terem sido expressos numa única estirpe (Jia & Jeon,

2016), o que invoca a necessidade de estudo de plataformas alternativas com suporte para expressão de proteínas mais complexas.

Leveduras são um sistema popularmente empregado para produção de proteínas farmacêuticas quando o sistema bacteriano não oferece suporte. São capazes de realizar alterações pós-traducionais e atingir altos níveis de expressão, aliado à secreção da proteína alvo. Ao contrário dos organismos eucarióticos mais complexos, os sistemas de expressão de levedura não contêm pirogênios, patógenos ou inclusões virais (Çelik & Çalik, 2012). *Komagataella phaffii* (anteriormente denominada *Pichia pastoris*) e *Sacharomyces* são as leveduras mais explorados com esta finalidade. A expressão em *Komagataella* levou à produção de proteínas humanas comerciais como Interferon alfa, albumina sérica humana, insulina e vacina contra hepatite B (Gasser et al., 2013). *Sacchoromyces cerevisiae* também constitui um hospedeiro estável para a produção de fármacos como insulina, glucagon e hirundina. Apesar das vantagens intrínsecas, algumas limitações importantes, principalmente quanto ao padrão de glicosilação, que difere dos padrões das proteínas humanas, pode levar a falhas na atividade proteica ou até imunogenicidade gerada pela proteína recombinante produzida (Çelik & Çalik, 2012).

O sistema de produção heteróloga em células de insetos, em especial os baseados em baculovírus, possibilitaram produção de proteínas humanas em larga escala atendendo condições adequadas de glicosilação (Assenberg et al., 2013). Muitos estudos relatam eficácia. Todavia, a tecnologia de baculovírus possui várias limitações. Por exemplo, o processo de infecção lítica resulta na libertação de proteases virais no hospedeiro, que podem ter impacto na qualidade da proteína (Hitchman et al., 2010). As propriedades funcionais e bioquímicas da proteína recombinante podem igualmente ser afetadas por um padrão de glicosilação derivado de células de insectos (Assenberg et al., 2013).

O outro sistema mais amplamente utilizado, células de mamíferos, tem a vantagem de possibilitar a expressão de proteínas com conformação igual ou similar à proteína nativa. A grande maioria dos produtos biológicos aprovados para comercialização são produzidos em células de mamíferos, incluindo todos os anticorpos (Lagassé et al., 2017). Esse sistema oferece suporte para montagem protéica com glicosilação adequada, diferente de leveduras e fungos. A presença de potenciais vírus, príons, e outros componentes indesejáveis, é uma preocupação constante, e os cuidados na produção encarecem o processamento e purificação (Butler, 2005). Como as linhagens celulares aderentes podem ser difíceis de escalonar, a produção industrial geralmente usa linhagens de células adaptadas para crescer em suspensão, o que facilita o

processamento *downstream*. No entanto, estas células demandam meios de cultura celular especializados, com vários suplementos para melhorar o seu cultivo, e conseqüentemente a produtividade da proteína alvo (Wurm, 2004).

A produção de proteínas biofarmacêuticas em animais transgênicos, como caprinos e bovinos, abrange vantagens comparadas ao sistema de expressão em células de mamíferos quanto ao processamento protéico, que pode ocorrer da mesma forma que em humanos (Kues & Niemann, 2011). No entanto, as desvantagens associadas à susceptibilidade a patógenos e vírus, somado a outros desafios como efeito de posição, pouco conhecimento de genômica de embriões e alterações epigenéticas, precisam ser superados para otimizar os sistemas de animais transgênicos para produção de proteína recombinante (Houdebine, 2009).

Neste contexto, tem havido, nos últimos anos, esforço por parte de pesquisadores para otimização ou substituição destes sistemas, com destaque para o emprego de sistemas vegetais como alternativa competitiva aos sistemas vigentes (De Martinis et al., 2016). Embora o rendimento, a estabilidade e a qualidade das moléculas possam variar entre os diferentes sistemas, as plantas são extremamente competitivas analisando caso a caso, por apresentarem vantagens associadas à plasticidade e custo da produção (De Martinis et al., 2016).

Expressão de biofármacos em sistemas vegetais: histórico e vantagens

O hormônio do crescimento humano foi a primeira proteína humana terapêutica expressa em plantas, em 1986, quando Barta et al. mostraram que o tecido do calo do tabaco e do girassol (tecido vegetal indiferenciado) poderiam produzir transcritos de um gene de fusão compreendendo o gene de hormônio de crescimento humano (*hGH-human growth hormone*) e a enzima nopalina sintase de *Agrobacterium tumefaciens* (gene *nos*) (Barta et al., 1986). A partir daí, em 1989, um anticorpo humano funcional foi produzido em plantas de tabaco (Hiatt et al., 1989), seguido por outros polipeptídeos farmacológicos como citocinas e hemoderivados. Baixos níveis de expressão iniciais levaram ao desenvolvimento de novas tecnologias, como fusão a proteínas de alta expressão, uso de novas plataformas vegetais, como cereais e oleaginosas, além de escolha de alvos diferentes do genoma, com emprego de transformação plastidial (Staub et al., 2000; Stoger et al., 2000; Yu & Langridge, 2001).

Estima-se que os custos em sistemas vegetais representem cerca de 2 a 10% dos custos de sistemas de fermentação eucarióticos e procarióticos, e cerca de 1% dos de cultura de células de mamíferos. Além disso, as suspensões celulares de células animais são susceptíveis a

infecções por patógenos e vírus humanos, o que soma risco ao emprego desta plataforma de produção (Twyman et al., 2003).

Em um estudo de estimativa de custos recente, usando dólar como moeda base, o sistema de expressão em células CHO foi comparado com sistemas baseados em plantas. O custo de meio de cultura para células CHO, por litro, é de cerca de 55-90 dólares, o que corresponde a um gasto de 14-22 milhões de dólares por lote, só em meio de cultura. Levando em conta o risco de contaminação, constitui um investimento de alto risco. Em contraste, o custo anual de meios para um sistema de expressão em plantas seria ~4,5 milhões de dólares, baseado em índices de biomassa e fertilizantes (Buyel & Fischer, 2012; Buyel et al. 2017)

Outra vantagem dos sistemas vegetais reside no fato das plantas possuírem vias secretórias semelhante às de mamíferos, o que lhes permite dobrar e montar proteínas complexas de forma eficiente. Isto pode ocorrer através da ação de chaperonas e dissulfeto isomerases que catalisam a formação de ligações dissulfeto, uma capacidade não compartilhada por sistemas de produção bacteriana (Tschofen et al., 2016).

A forma de distribuição do biofármaco é outro quesito no qual plantas podem oferecer vantagem. Em países pobres, onde os sistemas de transporte do material são limitados, optar por plataformas que permitam estoque a longo prazo é uma questão estratégica. Neste sentido, o uso de sementes de cereais pode oferecer suporte para expressão do medicamento e proteção para conservar as características do produto (Ma et al., 2013).

Um exemplo prático de redução de custos na produção de um biofármaco a partir de plataforma vegetal pode ser encontrado num caso de glicosilação regulada implementada em sistema de expressão em células de cenoura. Neste caso, a produção de α -taliglucerase, forma recombinante ativa de β -glucocerebrosidase (enzima terapêutica), foi feita num sistema que ofereceu suporte para glicosilação com exposição de resíduos de manose necessários para bioatividade protéica (Shaaltiel et al., 2007). A forma recombinante de β -glucocerebrosidase produzida em células CHO, denominada Imiglucerase, requer adição de enzimas extras ao processo para exposição dos resíduos de manose que compõe a forma ativa da referida enzima, gerando aumento de custo *downstream* na cadeia. De fato, a redução do custo do produto no mercado, com adoção da plataforma vegetal, chega a 25% (Fischer et al., 2013).

A aprovação comercial de “Elelyso” em 2012 (Protalix / Pfizer, α -taliglucerase recombinante produzida em células de cenoura para tratamento da doença de Gaucher) e o recente sucesso aparente no combate ao vírus Ebola com anticorpos feitos em plantas (Lyon et al., 2014), colocam um foco no enorme potencial da próxima geração de medicamentos a partir

de sistemas vegetais, feitos especialmente em nome do princípio da redução de custos. Estes medicamentos ajudarão a reduzir as disparidades de direito à saúde, além de servirem como ferramentas para garantir uma proteção à saúde adequada nos países em desenvolvimento (Ma et al., 2013).

Algumas biomoléculas produzidas em plantas, como proteínas com aplicação diagnóstica ou científica, já se encontram disponíveis para comercialização (tabela 1), demonstrando a viabilidade desse sistema para produção de biomoléculas.

Tabela 1: Produtos aprovados e comercialmente disponíveis produzidos em plantas transgênicas. (Adaptado de Sharma & Sharma, 2009).

Nome do produto	Nome da companhia	Sistema vegetal	Nome comercial	nº Catálogo
Avidina	Prodigene	Milho	Avidin	#A8706, Sigma-Aldrich
B-glucoronidase	Prodigene	Milho	GUS	#G2035, Sigma-Aldrich
Tripsina	Prodigene	Milho	TrypZean™	#T3568, Sigma-Aldrich
Lactoferrina Humana Recombinante	Meristem therapeutics; Ventria bioscience	Milho/ arroz	Lacromim™	#L4040, Sigma-Aldrich
Lisozima Humana Recombinante	Ventria bioscience	Arroz	Lysobac™	#L1667, Sigma-Aldrich

Aparentemente a produção de biofármacos em plantas realizada em larga escala tem muitas vantagens comparado a plataformas de cultura de células em etapas produtivas iniciais, enquanto que etapas posteriores de captura e refino transcorreriam de forma similar ao que já ocorre em sistemas de células de mamíferos ou bactérias (Buyel et al., 2017).

As plataformas variam de células vegetais ou plantas simples que crescem em biorreatores contendo meios sintéticos totalmente definidos até plantas inteiras crescendo no solo ou em ambientes hidropônicos, e as tecnologias abrangem integração estável do transgene e expressão transiente usando vetores bacterianos, virais ou híbridos. (Stoger et al., 2014)

O uso de cloroplastos para expressão de biofármacos é uma estratégia que vem apresentando resultados promissores, principalmente pelos altos níveis de expressão, compartimentalização do produto e por diminuir o custo de produção de proteínas recombinantes outrora sintetizadas em sistemas de fermentação dispendiosos (Jin & Daniell, 2015).

Cloroplastos: expressão gênica

Os cloroplastos são os plastídeos mais abundantes em células foliares na maioria das plantas angiospermas, com uma quantidade que pode chegar a centenas por célula, dependendo da espécie (Lelivelt et al., 2005). Apresentam várias cópias do seu genoma por célula, o que suporta a produção e manutenção do aparato fotossintético durante o desenvolvimento da planta (Jarvis & López-Ruez, 2013). Cloroplastos possuem genoma circular dupla-fita organizado na forma de nucleóide, ancorado nos tilacóides e membrana interna. Os nucleóides consistem de *clusters* com aproximadamente 10 cópias de DNA plastidial (Sakamoto et al., 2008). São organelas parcialmente autônomas, codificando e sintetizando algumas de suas próprias proteínas. Dentre as proteínas codificadas pelo cloroplasto, uma das mais abundantes é a subunidade maior da Rubisco, de 55 kDa. A Rubisco representa 50% do conteúdo de proteínas solúveis totais em folhas, e é tida como uma das proteínas mais abundantes do planeta. Seu padrão de quebra e reposição contínuo explica o alto número de ribossomos presentes nos cloroplastos (Spreitzer & Salvucci, 2002).

Por oferecer suporte para expressão gênica em altos níveis, dado seu metabolismo protéico, cloroplastos representam uma ótima alternativa para expressão de proteínas heterólogas. Além das vantagens apresentadas com relação ao alto nível de expressão protéica, cloroplastos possuem sistema de recombinação homóloga ativo, que permite inserção do transgene em local específico do genoma, o que minimiza efeitos pleiotrópicos (Daniell et al., 2016). Sendo o sistema genético de cloroplastos altamente poliplóide, os transgenes são amplificados para um grande número de cópias. Outra vantagem da transformação plastidial é a compartimentalização da proteína recombinante (Meyers et al., 2010). A transmissão do genoma do cloroplasto para a progênie ocorre pela via materna, favorecendo a contenção do transgene pela não dispersão no pólen. A transcrição de genes no cloroplasto é policistrônica para a maioria das espécies, o que possibilita expressão multigênica, que é difícil de se obter através da transformação nuclear (Quesada-Vargas et al., 2005). Diversos trabalhos na literatura relatam expressão de biofármacos em cloroplastos com sucesso, mas algumas restrições para expressão se aplicam. Um exemplo é a N-glicosilação, que não se sabe se ocorre em cloroplastos (Daniell et al., 2010).

A engenharia de genomas plastidiais foi primeiramente obtida em *Chlamydomonas reinhardtii*, uma alga verde unicelular (Boynton et al., 1988). Posteriormente, em 1990, a primeira planta superior transplastômica de tabaco foi gerada (Svab et al., 1990).

O nível de expressão de um biofármaco bactericida em cloroplastos de tabaco foi tão alto que chegou a representar 70% do conteúdo total de proteína solúvel (Oey et al., 2009). Em outro trabalho, visando produção de proinsulina em cloroplastos de tabaco e alface, os índices de proteína solúvel total atingiram 47% em tabaco e conteúdo total de proteína foliar de 53% em alface, sendo que a proinsulina obtida foi capaz de reduzir nível de glicose em cobaias (Boyhan & Daniell, 2011).

Várias proteínas terapêuticas humanas foram produzidas em sistema plastidial ao longo dos últimos anos, como demonstrado na tabela 2.

Tabela 2: Proteínas terapêuticas humanas produzidas em plastídeos nos últimos anos. PST=proteína solúvel total; PFT=proteína foliar total; ND=não determinado (adaptada de Ahmad et al., 2016)

Proteína humana	Gene	Planta Hospedeira	Expressão observada	Referências
Somatotropina humana	hST	Tabaco	7% PST	Staub et al, 2000
Albumina sérica humana	hsa	Tabaco	11% PST	Férrandez-San Millán et al, 2003
IFN- γ	Gus-IFN γ	Tabaco	6% PST	Leelavathi e Reddy, 2003
Interferon- α 2b (IFN- α 2b)	IFN- α 2b	Tabaco	21% PST	Arlen et al, 2007
Pro-insulina humana	CTB-Pins	Tabaco/Alface	16%/2,5% PST	Ruhlman et al, 2007
Pro-insulina humana	Pins-Protein A	Tabaco	0,2% PST	Yarbakht et al, 2015
Cardiotropina-1	rhct1	Tabaco	5% PST	Farran et al, 2008
α 1-antitripsina	SERPINA1	Tabaco	2% PST	Nadai et al, 2009
Fator de crescimento tipo insulina	IGF-1n/IGF-1s	Tabaco	32% PST	Ruiz et al, 2009
Fator de coagulação IX	CTB-FIX	Tabaco	3,8% PST	Verma et al, 2010b
Fator de coagulação IX	CTB-FIX	Alface	0,56 % PFT	Su et al, 2015
Tiorredoxina-1	hTrx1	Alface	1% PST	Lim et al, 2011
Fator de estímulo de colônia de granulócito humano	hG-CSF	Alface	ND	Sharifi Tabar et al, 2013
Fator de crescimento básico de fibroblasto	bFGF	Tabaco	0,1% PST	Wang et al, 2016

Cloroplastos de alface

O interesse na produção de proteínas biofarmacêuticas em plantas não tóxicas levou ao desenvolvimento de uma metodologia para obtenção de alface transplastômico.

A alface possui características alimentares e comerciais favoráveis, e são facilmente cultiváveis. Em um dos primeiros estudos sobre transformação plastidial de alface, 15 anos após a primeira transformação plastidial em plantas (realizada em tabaco por Daniell et al., 1990), Lelivelt et al. (2005) relataram a integração estável de transgenes em plastídeos de protoplastos de alface. Pouco depois, Kanamoto et al. (2006) desenvolveram uma metodologia de transformação mais eficiente, direcionando DNA via biobalística, e obtiveram transformantes de alface geneticamente estáveis. A regeneração das linhagens transplastômicas rendeu plantas que acumularam até 36% de proteína verde fluorescente (GFP, *Green Fluorescent Protein*) no total de proteínas solúveis (Kanamoto et al., 2006).

Desde então, vários trabalhos demonstraram a viabilidade da alface como plataforma para síntese de biofármacos, como é o caso do Fator IX bioencapsulado para tratamento de pacientes hemofílicos (Su et al., 2015), que já está em fase de teste em animais de grande porte (Herzog et al., 2017).

Em outro caso, plantas de alface transplastômica para expressão de Tiorredoxina 1, uma proteína humana de interesse biotecnológico, relataram acúmulo de 1% da PST (proteína solúvel total), apesar de terem utilizado a mesma estratégia empregada por Kanamoto et al. (2006), que relatou acúmulo de quase 1/3 de PST (Lim et al., 2011). Isto indica que interações complexas podem estar envolvidas na estabilidade de RNA mensageiro ou da proteína alvo, específicas em diferentes casos (Ruhlman, 2014).

Com o sistema de transformação genética cloroplasmática de alface estabelecido no grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia Genética (LEG-Cenargen), foi possível expressar um tetra-epítoto com uma região que engloba parte dos domínios I e II da proteína de envelope do vírus da Dengue (DENV) com finalidade diagnóstica sorológica da Dengue, atualmente com pedido de depósito de patente feito pela Universidade de Brasília, Embrapa, Fiocruz e Universidade Católica de Brasília (Maldaner et al., 2013).

Produção de biofármacos em soja

A produção de proteínas em sementes oferece atrativos comparado com outros sistemas vegetais, principalmente com relação à estabilidade a longo prazo e teor protéico acumulado.

Sementes de soja representam uma fonte barata de biomassa, e seu alto teor protéico se deve, principalmente, à presença de vacúolos de estoque de proteínas (Rech et al., 2012).

De fato, proteínas terapêuticas como pró-insulina (Cunha et al., 2010), fator VIII de coagulação (Cunha et al., 2011b) e hormônio de crescimento humano (Cunha et al., 2011a) são exemplos bem sucedidos de expressão protéica em sementes de soja.

Dentre os fatores que influenciam o acúmulo de proteínas heterólogas em sementes estão os promotores e enhancers utilizados, que favorecem a expressão nesta região. Além disso, sequências regulatórias que codificam peptídeo sinal direcionando a proteína pro retículo endoplasmático também podem promover aumento do acúmulo, em geral. Há alguns casos em que foi relatado acúmulo de proteínas heterólogas em sementes, especificamente na produção de hGH e proteína anticoagulante hirsudina, onde não houve sinalização para vias secretórias (Boothe et al., 2010). Outros estudos relataram acúmulo de proteínas heterólogas em sementes de soja utilizando sequências regulatórias direcionando a produção aos vacúolos de reserva da semente (Vianna et al., 2011).

Proteína Morfogenética Óssea tipo 2

Histórico do uso de BMP-2

Desde 1965, quando o professor e pesquisador Michael Urist demonstrou pela primeira vez atividade de reparo ósseo pela matriz óssea desmineralizada (Urist, 1965), os estudos acerca dos elementos envolvidos no processo apontam para o papel regulatório das proteínas morfogenéticas ósseas (BMP's). Com o avanço das pesquisas, tem sido observado que estas proteínas multifuncionais também participam na organogênese, desenvolvimento muscular, metabolismo de ferro, biologia vascular e câncer (Brazil et al., 2015).

Inicialmente, procedimentos clínicos de reparo ósseo empregavam somente auto-enxertia. Apesar de serem funcionais, implantes autógenos ainda apresentavam muitas deficiências, incluindo: necessidade de cirurgia secundária para colher o enxerto, disponibilidade limitada de osso doador e reabsorção irregular do tecido ósseo transplantado. Estas limitações levaram a uma extensa pesquisa de alternativas para procedimentos de indução de regeneração óssea (Giannoudis et al., 2005).

Clinicamente, BMP's demonstraram potencial para substituir o uso de osso autógeno em muitas aplicações. Em trabalhos avaliando funcionalidade das distintas BMP's, os tipos 2, 4, e 7 demonstraram potencial osteogênico (Carreira et al., 2014a). Dentre estas, BMP-2 é uma proteína de destaque por sua atuação primordial, orquestrando a cascata de eventos de reparo

ósseo.(Tsuji et al., 2016). A interação da BMP-2 com células osteoprogenitoras leva à indução de formação de osteoblastos, um evento chave para desencadear regeneração óssea (Ghodadra & Singh, 2008).

A forma comercializada de BMP-2 emprega expressão somente do domínio ativo (rhBMP-2). No entanto, também foi demonstrado que a proBMP2 (codificando pré-proteína) é funcional, uma vez que induziu ALP (fosfatase alcalina, enzima marcadora para diferenciação osteoblástica) em células C2C12 (linhagem de células responsiva a BMP-2) (von Einem et al., 2011). Além disso, demonstrou-se que tanto a rhBMP2 como a proBMP2 foram internalizadas em células C2C12 e que a proBMP2 foi processada em BMP2 madura.

As plataformas de produção de BMP-2 englobam expressão em células CHO, células HEK e *E. coli*.

A rhBMP2 produzida em *E. coli* possui rendimento protéico relativamente elevado, atingindo níveis de cerca de 100 mg/L após reenovelamento e dimerização (Vallejo et al. 2002). Embora o rendimento proteico seja elevado em *E. coli*, os inconvenientes do sistema de expressão de *E. coli* são que a rhBMP-2 produzida requer vários passos de purificação e concentração demorados antes da tentativa de reenovelar, além do custo de manutenção de fermentadores.

No caso de células CHO, a baixa produtividade constitui um dos fatores mais limitantes. O principal desafio de um sistema de expressão em mamíferos é o seu baixo rendimento, que fica na faixa de $\mu\text{g} / \text{L}$. Além do baixo rendimento, um sistema de expressão em células de mamífero é dispendioso devido aos custos associados aos meios de cultivo e mão-de-obra especializada necessária (Dingermann, 2008).

A BMP-2 foi previamente expressa em plantas, fundida a outras proteínas. Suo et al. (2006) expressaram rhBMP2 fundida com β -glucuronidase em plantas de tabaco, obtendo 0,02% de BMP-2 purificada a partir de proteína solúvel total. Ceresoli et al. (2016) expressaram sequência de proBMP2, e rhBMP2 (domínio ativo) fusionado ao N-terminal da γ -zeína de milho. A versão fusionada acumulou até 1% do total de proteínas foliares solúveis.

A utilização terapêutica generalizada de BMP-2 tem sido limitada por dificuldades na obtenção de grandes quantidades da proteína biologicamente ativa pura, o que encarece o produto final (von Einem et al., 2011). Apesar dos altos custos de produção, o mercado global de rhBMP-2 movimentou US\$ 612 milhões em 2013. Estimativas de mercado apontam para um aumento crescente de uso ao longo dos anos, especialmente nos casos de fusão espinhal.

Com isso, a busca por plataformas alternativas de produção pode ajudar a suprir a demanda de mercado com um produto mais acessível.

Caracterização da BMP-2

BMP-2 é uma proteína pertencente à super família TGF-beta de fatores de crescimento humano. Os membros desta família protéica modulam diferenciação celular, proliferação celular, apoptose, dentre outros processos (Dennler et al., 2002). BMP's são sintetizadas dentro da célula, como grandes precursores inativos, pré-propeptídeos de 390 aminoácidos (proBMP2). Este pré-propeptídeo consiste num peptídeo sinal N-terminal hidrofóbico que o direciona para a via secretória, um pro-domínio que media o envelhecimento e um peptídeo maduro C-terminal. Para indução óssea ocorre dimerização, em que inicialmente o pró-domínio é clivado numa região Arg-X-X-Arg, para posteriormente gerar homodímeros maduros (Carreira et al., 2014) (Figura 1).

Estruturalmente, BMP's são caracterizadas por possuírem seis resíduos de cisteína altamente conservados, formando um motivo de nó de cisteína ligado por três pontes dissulfeto (Figura 2). Um nó de cisteína é uma assinatura estrutural em que duas pontes dissulfeto formam um anel através do qual uma terceira ponte dissulfeto é enroscada. Um sétimo resíduo de cisteína está envolvido na estabilização do dímero através de uma ligação dissulfeto intramolecular entre dois monômeros. (Hogan, 1996; Carreira et al., 2014)

Sinalização mediada por BMP-2 em tecido ósseo

Nos primeiros 5 dias após uma fratura, ocorre uma cascata de eventos integrados, iniciando pela migração de células osteoprogenitoras ao local danificado, que interagem com a BMP-2. A sinalização celular inicia através da ligação de BMP-2 ao BMP RI (receptor de membrana tipo I) ou ALK's- *activin like kinases*, formando um complexo que ativa BMP RII (receptor de membrana tipo II). Posteriormente, BMP RII fosforila BMPRI, que desencadeia fosforilação de um grupo de proteínas receptoras R-Smad1/5/8. Este grupo então se liga à proteína Smad4, que é nuclear, e se desloca para o núcleo. Este complexo é recrutado pela maquinaria transcricional e pode ativar genes alvos da BMP, que contenham SBE [*Smad binding element* (elementos de resposta a Smad)] (Brazil et al., 2015). Os genes induzidos por essa via atuam diretamente regulando o processo de osteogênese, como *runx2* (fator de transcrição relacionado a nanismo), que por sua vez induz expressão de *sp7* (osterix). Outros genes chave são ativados tardiamente, como *alp I* e *bglap II* (osteocalcina) (Figura 3) (Ryoo et al., 2006).

BMP completa (Pré-pro proteína)

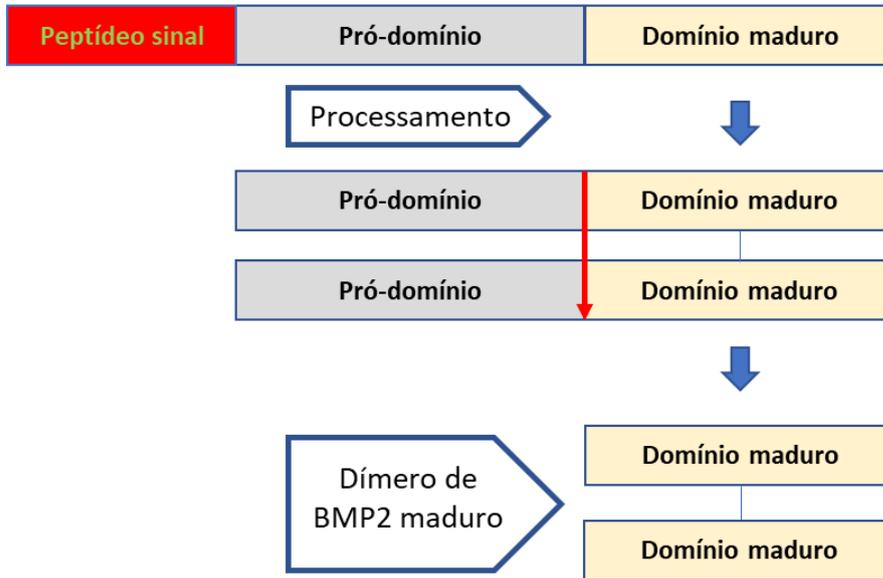


Figura 1: Formação de BMPs. BMP de comprimento total consiste em uma seqüência de sinal, um pró-peptídeo e a região madura. A proteína madura é secretada como um homodímero ligado por ligações dissulfureto. A proteína madura C-terminal é proteoliticamente clivada do pró-domínio numa seqüência Arg-X-X-Arg por proteases antes da dimerização (adaptado de Carreira et al., 2014).

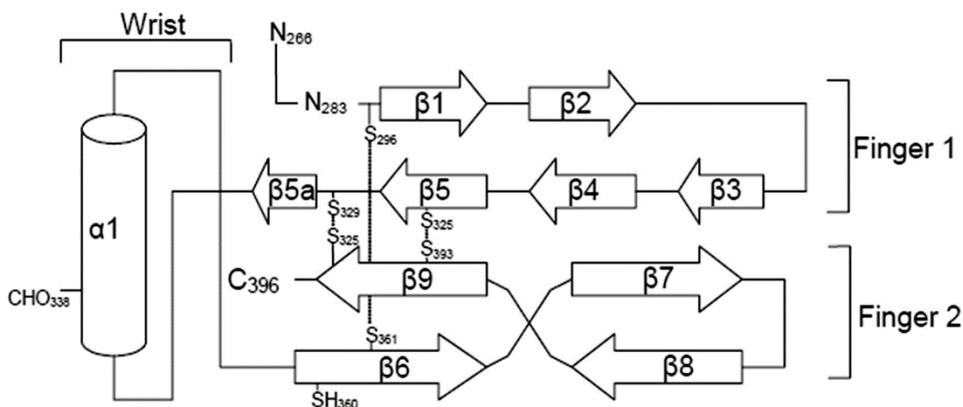


Figura 2: Representação esquemática do monômero de BMP-2. O monômero é estabilizado por três ligações bissulfeto representadas por linhas entre duas moléculas de enxofre (S). O “nó” de cisteína constitui o núcleo do monômero do qual emanam quatro vertentes de folhas β anti-paralelas ($\beta 1 - \beta 9$), formando duas projeções do “dedo”, com a α -hélice direcionada perpendicularmente, criando a estrutura de “pulso” (Carreira et al., 2014).

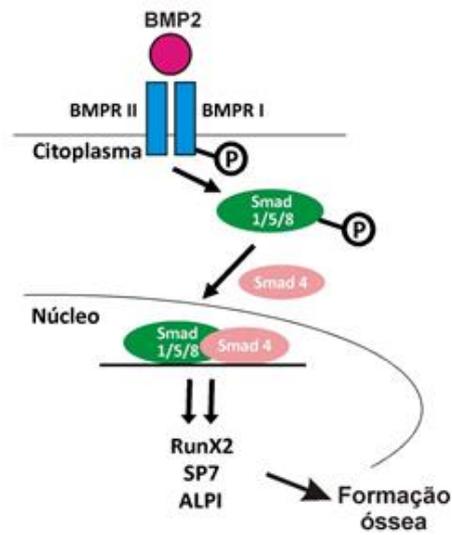


Figura 3: Transdução do sinal de BMP's osteogênicas(incluindo BMP-2). BMP's se ligam ao receptor do tipo I, que é constitutivamente ativo, e ao do tipo II, que é dependente de ligação e ativado por serina/treonina quinases .O receptor II fosforila o receptor I, que é então ativado e fosforila Smad 1/5/8. Smad 1/5/8 fosforilada se complexa a Smad 4. Este complexo é capaz de migrar para o núcleo e ativar genes-alvo que induzem formação óssea (Katagiri et al., 2015)

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho é expressar Proteína Morfogenética Óssea humana tipo 2 (hBMP2) em folhas de alface (transformação cloroplasmática) e em sementes de soja (transformação nuclear) e testar a atividade biológica da proteína recombinante produzida.

Objetivos específicos:

- Obter plantas de alface geneticamente modificadas por transformação cloroplasmática via biobalística contendo o gene hBMP2.
- Análises moleculares de transformantes obtidos em meio seletivo
- Obter e caracterizar plantas de alface homoplásmicas, quanto à presença do transgene
- Detecção e quantificação da proteína de interesse em plantas homoplásmicas de alface e sementes de soja transgênicas.
- Avaliar a expressão gênica de Runx2, SP7 (Osterix), ALP (*alkaline phosphatase*) e Bglap II (osteocalcina) em células C2C12 tratadas com extrato protéico de alface ou soja geneticamente modificadas expressando BMP-2

METODOLOGIA

Construção dos vetores

pLsCloroBMP2

Este vetor específico para transformação cloroplasmática de alface contém uma região intergênica repetida do genoma, que funciona como a região alvo para a recombinação homóloga do transgene com o DNA de cloroplasto de alface. Essa região repetitiva foi descrita na literatura como um bom alvo de recombinação homóloga propiciando uma maior eficiência de transformação (figura 4) (Lelivelt et al., 2005; Ruhlman et al., 2007; Ruhlman et al., 2010; Lakshmi et al., 2013). O vetor contém como agente seletivo o gene *aadA*, que confere resistência ao antibiótico espectinomicina, e está sob controle do promotor do operon ribossomal 16S *LsPrn* e terminador do gene *psbA* de tabaco. O gene rhBMP 2 (acesso genbank ABR20911.1) está sob controle de sequências *psbA* regulatórias que são específicas para cloroplasto de alface.

pCLLsBMP2

Este vetor, baseado no vetor pRL 1001 (Kanamoto et al., 2006), difere do anterior na região de recombinação homóloga, que neste último compreende a região gênica entre rubisco (*rbcl*) e *accD* (figura 4). Além disso, neste vetor, as sequências regulatórias que dirigem a expressão de rhBMP-2 são específicas de cloroplasto de tabaco. Este vetor foi utilizado anteriormente no nosso grupo, com sucesso, para transformar alface e expressar o tetraepítipo de dengue (Maldaner et al., 2013).

pBMP2ahas

Na construção de pBMP2ahas, a sequência completa do gene hBMP2 foi fusionada ao peptídeo sinal da 6 α -coixina de *Coix lacryma-jobi* (acesso do GenBank KF475763; posição 71-133), sob o controle do gene da proteína de armazenamento de beta-conglicina, do promotor (α' -*bcp*) (*bcp5'*; acesso ao GenBank M13759; posição 1607-2448) e terminador (*bcp3'*; acesso ao GenBank AB610665; posição 2969-3401) de *Glycine max*. O cassete de expressão contendo hBMP2 foi clonado no vetor pAC321 (Rech et al., 2008), que contém o gene *ahas*. Este gene corresponde a uma versão mutada, cuja proteína resultante confere tolerância aos herbicidas da classe das imidazolininas, e continua sendo funcional, sendo este o marcador seletivo empregado em meio de cultura (imazapir).

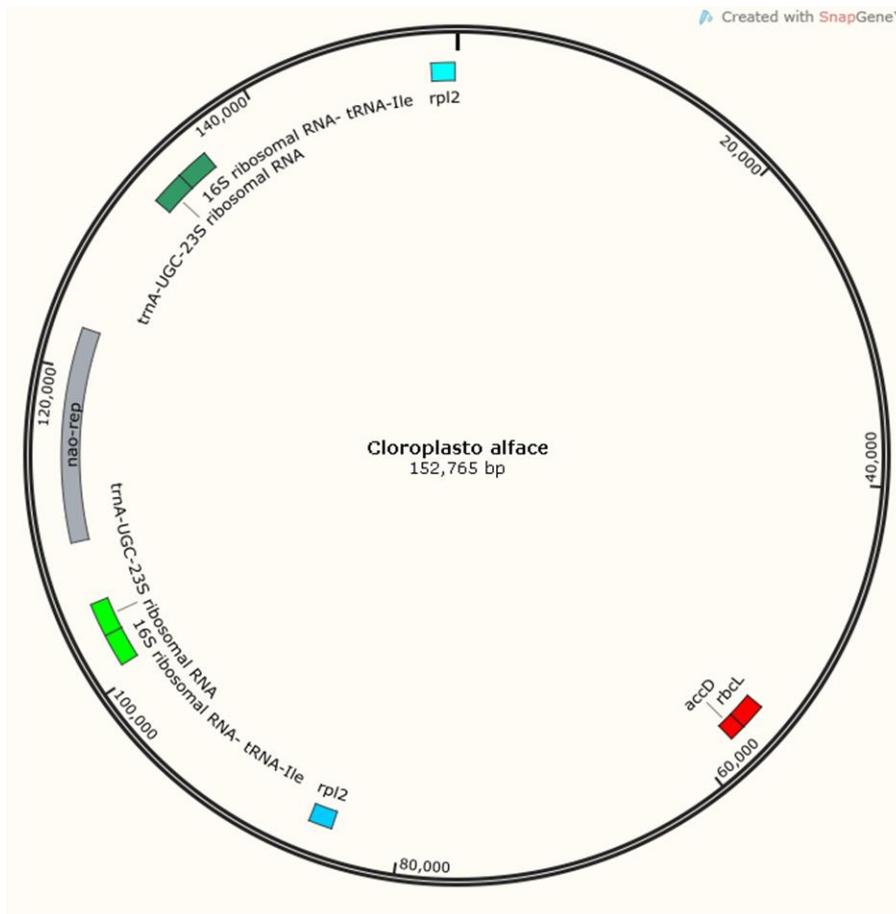


Figura 4: Representação esquemática do genoma de cloroplasto de *Lactuca sativa*. Uma das regiões alvo de recombinação homóloga é a região entre *rbcL* e *accD*. Outra região alvo é entre *trnA-UGC-23S* e *tRNA-Ile*, que é repetida no genoma plastidial de alface.

Transformação e regeneração de alface

O protocolo de transformação e regeneração cloroplasmática de alface utilizado foi descrito por Kanamoto et al (2006) e já reproduzido em nosso laboratório (Maldaner et al., 2013)

Dois dias após o bombardeamento, as folhas de alface bombardeadas foram cortadas em pedaços de aproximadamente 4 mm x 4 mm, e a face adaxial foi colocada diretamente em contato com meio MS seletivo contendo espectinomicina (50µg/mL), benzilaminopurina (0,1µg/mL), ácido naftalenoacético (0,1 µg/mL), 0,2% (w/v) de ágar e Polivinilpirrolidona- PVP (500 µg/mL). Os fragmentos de folha bombardeada foram incubados em câmara de crescimento, em condições ideais, por aproximadamente 45 dias. Calos regenerados foram transferidos para frascos contendo ½ da concentração de meio MS com fito-hormônios para posterior enraizamento. Após o enraizamento, a planta foi transferida primeiramente para um vaso contendo vermiculita com 50% de solo, posteriormente para um vaso contendo terra preparada com a adubação adequada. A planta foi mantida em casa de vegetação autorizada

para manutenção de plantas transgênicas pela CTNBio. As sementes desta planta foram semeadas em sistema hidropônico para posterior extração de proteínas e colheita das sementes.

Transformação e regeneração de soja

A transformação da soja (cv BRS16) foi realizada como previamente descrito por Aragão et al. (2000) utilizando o vetor pBMP2ahas.

Extração de DNA e PCR (reação em cadeia da polimerase) de alface e soja

A extração de DNA foi feita a partir de um pedaço de folha de aproximadamente 0,1 grama, e o protocolo de extração seguiu parâmetros descritos por Brasileiro & Carneiro (1998). A amostra foi macerada com bastões autoclavados, 400µl de tampão CTAB 2x (1,4 M de cloreto de sódio, 100 mM de Tris-HCl pH 8.0, 20 mM de ácido etilenodiamino tretra-acético-EDTA, 25mM de brometo de cetil-trimetilamônio CTAB, 2% de polivinilpirrolidona-PVP) foram adicionados, e a suspensão mantida em agitador a 60°C por 20 minutos. Foram então adicionados 400µl de clorofórmio, homogeneizado e centrifugado a 14000 x g por 5 minutos. O sobrenadante contendo o DNA foi precipitado utilizando isopropanol. O precipitado lavado e seco foi ressuspenso em 20µl de água Milli-Q para futuras análises.

A análise inicial foi realizada por PCR, e foram utilizados *primers* específicos para a sequência do gene alvo (Tabela 3).

Tabela 3: Sequências dos “primers” utilizados para detecção de transgenes em alface e soja

pLsCloroBMP2(alface)	
pCLOROF	5'-TGAAAATTCGTGCGCTTGGG-3'
pCLOROR	5'-AATACCGAGCACTTCGCCAA-3'
pCLLsBMP2(alface)	
BMPCLF	5'-GGATTGTTGCTCCTCCTGGAT-3'
Trps16R	5'-GAATTTCAAGCTTCGGAAGGGCG-3'
pBMP2ahas (soja)	
SOJAMATF	5'-CCGGGGTATCACGCCTTTTA-3'
SOJAMATR	5'-CCACAACCCTCCACAACCAT-3'

Confirmação da integração dos transgenes no genoma de alface

Análises de “Southern blot” foram realizadas para determinar o status homoplasmático das plantas de alface transplastômicas regeneradas. O DNA total foi isolado usando o método

CTAB, e o Southern blot foi realizado conforme descrito por Lacorte et al. (2010). DNA de cloroplasto (20 µg) foi digerido com as enzimas *BalI* (para plantas transformadas com o vetor pLsCLOROBMP2) e *XbaI* (para plantas transformadas com o vetor pCLLsBMP2). Para as plantas pCLLsBMP2 foi utilizada a sonda “a” (Figura 5). A sonda “a” corresponde a um fragmento de 500 pb do gene *rbcL* e foi gerada por PCR com o par de primers *rbcLF* (GGACGCGATCTTGCTACTGA) / *rbcLR* (TGCATGTTGGATTCGGCTCA) de acordo com Maldaner et al. (2013). Para a planta pLsCLOROBMP2 utilizou-se a sonda “b” (na região *trnA-UGC-23S rRNA*). A sonda “b” (379 pb) foi gerada por PCR (como descrito acima) utilizando o par de primers *cLsrRNAF* (CACCGTAAGCCTTTCCTCGT) e *cLsrRNAR* (TGGGATTCCAACCTCAGCACC) (Figura 5).

RT-PCR (transcrição reversa e reação em cadeia pela polimerase)

O RNA total de plantas de alface foi extraído utilizando o kit *Ambion* (Thermo Scientific) seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente, os RNA foram tratados com DNase I, quantificados e cerca de 100 ng utilizados como molde para a reação de transcriptase reversa juntamente com a PCR em uma mesma reação, feita com o kit *Superscript III one step®* (Invitrogen), conforme recomendações do fabricante, utilizando os primers descritos na tabela 4.

Tabela 4: Sequências dos primers utilizados para detecção de transcritos de *rhBMP2*

BMPCLF	5'-GGATTGTTGCTCCTCCTGGAT-3'
BMPCLR	5'-TCCACATCCTTCAACAACCAT-3'

Imunoblot

Proteínas totais foram extraídas de folhas de alface transgênica e sementes de soja de acordo com Maldander et al. (2013) e Cunha et al (2010), respectivamente. Os extratos protéicos foram filtrados utilizando um filtro de seringa de 0,45µM e quantificados utilizando ensaio *Bradford Quick Start* (Bio-Rad Laboratories, Inc., EUA).

Para Western blot, as amostras foram incubadas com tampão de amostra (SDS a 20%, Tris-HCl 0,5 M, 10% de p-mercaptoetanol, 20% de glicerol, 0,04% de azul de bromofenol) na proporção de 1: 1 v/ v a 95 °C durante 5 min, e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (gel concentrador 4% e gel separador a 12%). As proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF durante 60 min, a 24 V. As membranas foram bloqueadas com 30 mL de solução de bloqueio [5% de leite desnatado em TBS (0,02 M Tris base e 0,137 M

NaCl, pH 7,5)] por 18h a 4 ° C e lavadas três vezes com tampão TBST (TBS com tween 0,1 %, pH 7,5).

Para a análise de proteína de alface, a membrana foi incubada com anticorpos monoclonais específicos anti-BMP2 produzidos em camundongo (10R-7775, Fitzgerald Industries International, EUA) diluídos em TBS contendo leite desnatado a 1% (1: 1.000), por 6h a TA (temperatura ambiente). Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com TBST e incubada com anticorpo secundário IgG anti-camundongo produzido em coelho conjugado com fosfatase alcalina, na proporção de 1: 10.000 (Sigma Aldrich, EUA), por 2 h a TA. Após lavagem com TBST, a membrana foi revelada utilizando uma pastilha de NBT / BCIP (Sigma Aldrich, EUA) dissolvida em 10mL de água, por 15 min a TA.

Para análise de proteínas de soja, a membrana foi incubada com anticorpos policlonais IgG anti-BMP2 produzidos em cabra (Santa Cruz Biotechnology, EUA) diluídos na proporção de 1:500 em TBS contendo leite desnatado a 1%, durante 6h a TA. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com TBST, incubada com anticorpos IgG anti-cabra conjugado com fosfatase alcalina (produzido em coelho, Santa Cruz Biotechnology, EUA) na proporção 1: 5.000 por 2h. Após lavagem com TBST, a membrana foi revelada utilizando uma pastilha de NBT / BCIP (Sigma Aldrich, EUA) dissolvida em 10mL de água, por 15 min a TA.

Quantificação de hBMP2 em sementes transgênicas de soja

A quantificação de BMP-2 foi realizada utilizando o imunoenensaio Quantikine Human BMP-2 (R & D Systems, Inc., EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. O resultado foi expresso em porcentagem da BMP-2 da proteína solúvel total (PST).

Cultivo de células C2C12

Clones da terceira passagem de células de mioblasto de camundongo C2C12 foram subcultivados em frascos T-75 cm² contendo meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Gibco) suplementado com FBS (soro bovino fetal) a 10% e antibiótico/antimicótico, mantidos em incubadora de CO₂ com umidade a 5% temperatura de 37°C .As células cresceram até atingir 80% de confluência, quando foram transferidas para placas e submetidas a análises.

Ensaio de atividade biológica de BMP-2

Células C2C12 cultivadas conforme descrito anteriormente foram transferidas para placas de 24 poços na densidade de 2x10⁴ células/poço, em 0,5mL de meio DMEM. As células

foram mantidas *overnight*, e no segundo dia de crescimento foi adicionado meio DMEM contendo extrato protéico de alface ou soja rhBMP2 a 25µg/mL. Para os controles foi utilizado meio DMEM contendo extrato protéico total de alface ou soja não transformados, controle positivo com BMP-2 comercial a 50ng/mL (quantidade mínima definida anteriormente para induzir atividade osteogênica) e meio regular DMEM puro. Todos os tratamentos foram feitos em triplicata. Os meios de cultura foram repostos diariamente, e a coleta de RNA foi feita no segundo e quarto dias de experimento.

Foi realizado RT-qPCR para determinar o nível expressão de mRNA de Runx2, SP7 (Osterix), ALP e BglapII (Osteocalcina), utilizando *primers* específicos comerciais (Qiagen, Valencia, CA).

O RNA total de células C2C12 foi extraído utilizando Trizol (Invitrogen) conforme instruções do fabricante, e digerido com DNase I RNase free (Qiagen, Valencia, CA) para remover a contaminação com DNA. A concentração do RNA isolado foi determinada pela absorvância a 260 nm de comprimento de onda em espectrofotômetro. A qualidade do RNA foi verificada pela razão A260/A280 em equipamento Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE). O cDNA foi gerado utilizando o kit *iScript™ cDNA Synthesis Kit* (BioRad), de acordo com as instruções do fabricante. A RT-qPCR foi realizada de acordo com Mendonça et al. (2013), utilizando o *Real-Time PCR System 7500* (Applied Biosystems). Para confirmar a especificidade da amplificação, os produtos de PCR foram submetidos a uma análise da curva de dissociação. Os ciclos de limiar (Ct) de cada reação foram normalizados para os obtidos para mRNA de GAPDH utilizando o método $-\Delta \Delta Ct$ (Livak, 2001). Todas as reações de PCR foram realizadas em triplicata.

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão de pelo menos três experimentos independentes. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com valores de $P < 0,05$, utilizando-se os testes ANOVA de dois fatores / Tukey comparações múltiplas. Foi empregado o software GraphPad Prism (versão 6.02).

RESULTADOS

Vetores de transformação e análises genômicas

pCLLsBMP2

Após sucessivas transformações foi detectado um evento transplastômico com a construção *pCLLsBMP2* (Figura 5). A planta obtida foi cultivada em meio seletivo, e algumas plantas derivadas foram selecionadas para análises posteriores. Análise por PCR confirmou a presença do gene *rhBMP2* (Figura 6). A hibridização por Southern blot utilizando sonda específica (sonda a) confirmou inserção do transgene, e a presença somente da banda de 5kb numa das plantas geneticamente modificadas indicou se tratar de um evento homoplásmico. A planta homoplásmica, denominada ALF 1, foi selecionada para análises posteriores (Figura 6).

pLsCloroBMP2

Foi obtido um evento de alface transplastômico com a construção *pLsCloroBMP2* (Figura 5). Análise de PCR mostrou amplicons no tamanho esperado de 950pb, utilizando *primers* específicos que flanqueiam o gene *rhBMP-2*. Após sucessivas passagens em meio seletivo contendo espectinomicina foi detectada uma planta homoplásmica, com inserção do cassete em duas cópias. Isto pode ser observado pela presença, após hibridização com a sonda “b”, somente das bandas de 18,8kb e 10kb (Figura 6). Este evento, denominado ALF 2, foi selecionado para as análises posteriores.

pBMP2ahas

O vetor *pBMP2ahas* (Figura 5) foi empregado para transformação nuclear de soja, via biobalística. Duas linhagens transgênicas foram geradas, SOY 7 e SOY 11 (Figura 8a). Estas linhagens foram usadas nos ensaios posteriores a fim de se avaliar a presença e provável atividade da *proBMP2* heteróloga.

RT-PCR de alface (transcriptase reversa)

As amostras de RNA de alface foram extraídas em triplicata para cada um dos eventos, ALF 1 e ALF 2. Também foi feita extração de alface não transgênico (controle). Posteriormente

foi feita a reação de transcriptase reversa acoplada ao PCR, numa mesma etapa, com *primers* específicos para a região gênica de rhBMP2. Os resultados demonstraram que a rhBMP-2 está sendo expressa em cloroplastos de alface, com amplificação no tamanho esperado, nos dois eventos distintos obtidos (Figura 7a).

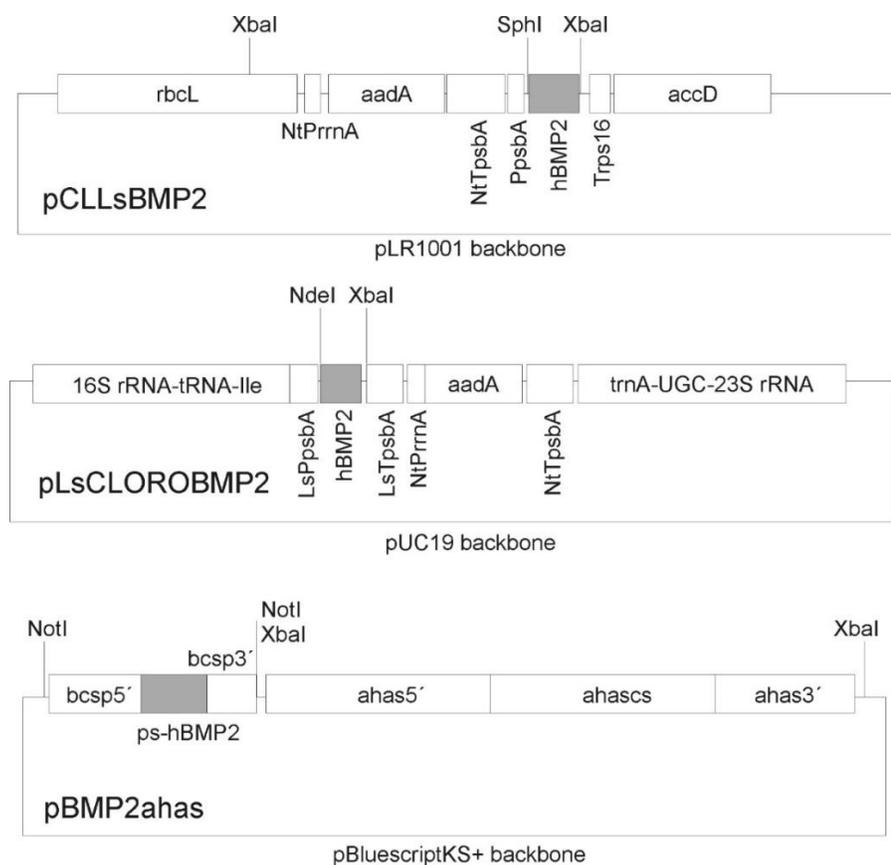


Figura 5. O vetor pCLLsBMP2 foi baseado no vetor pRL1001 descrito por Kanamoto et al. (2006). O vetor pRL1001 contém fragmento da região *rbcL* do genoma plastidial de alface (Acesso Genbank DQ383816; 55039-56678) e da região de *accD* (posição 56695-57748) como bordas para recombinação homóloga. Além disso, contém um cassete *aadA*, que consiste de promotor *rrn*, gene *aadA* e terminador *psbA* de tabaco, que confere tolerância à espectinomicina, utilizada para selecionar plantas transgênicas. pCLLsBMP2 também contém um cassete de expressão *gfp*, constituído por promotor *psbA* do tabaco - sequência codante de *gfp* - terminador *rps16* do tabaco. A *gfp* foi substituída pela sequência codificante de *hBMP2* (acesso ABB20911.1 do GenBank) entre os sítios de *SphI* e *XbaI*. A sequência codante de *rhBMP2* foi sintetizada de acordo com otimização de cloroplasto de *L. sativa*. O vetor pLsCLOROBMP2 contém os cassetes *aadA* e *hBMP2* (nos quais o promotor *PpsbA* do tabaco foi substituído pelo promotor *LsPpsbA* de alface). O *trnA-UGC-23S* (acesso Genbank DQ383816; posição 103005-105141) e *16S rRNA-tRNA-Ile* (posição 100942-103004) são regiões intergênicas repetidas de cloroplasto de alface usadas como sítio alvo para recombinação homóloga. O vetor pBMP2ahas contém *ps-hBMP2* (*hBMP2* fusionada com o peptídeo sinal da 6α -coixina *lacrymajobi*) sob controle do gene da proteína de armazenamento β -conglícinina (*bcsp5'*; GenBank M13759; posição 1607-2448) e terminador (*bcsp3'*; acesso GenBank AB610665; posição 2969-3401) de *Glycine max.*). O cassete *ahas5'-ahascs-ahas3'* é o gene *ahas* mutado de *Arabidopsis thaliana*, que confere tolerância ao imazapyr, herbicida usado para selecionar plantas transgênicas.

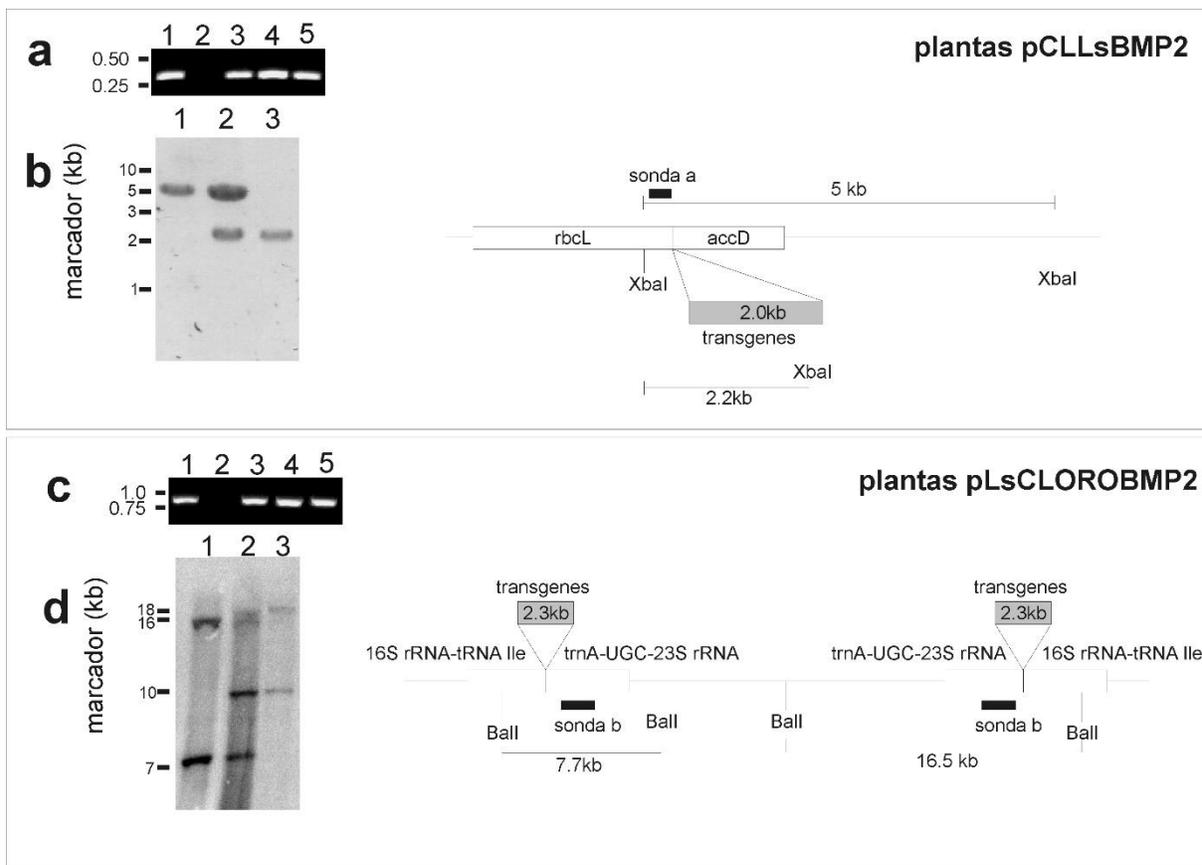


Figura 6: Caracterização molecular das linhagens de alface transformadas com o vetor pCLLsBMP2 (ALF1) e pLsCLOROBMP2 (ALF2). (a) Análises de PCR para detecção do transgene rhBMP2 em plantas ALF1. 1: plasmídeo; 2: planta não transformada; 3-5: plantas transgênicas de 3 passagens. (b) Análise de Southern blot (utilizando a sonda “a”) demonstrando que os transgenes foram inseridos no genoma do cloroplasto diferenciando: não transgênica (1, presença da banda de 5 kb) heteroplásmica (2, presença das bandas de 2,2 kb e 5 kb) e planta homoplásmica (3, presença da banda de 2,2kb). (c) análises de PCR para detecções de transgene rhBMP2 em plantas ALF2. 1: plasmídeo; 2: planta não transgênica; 3-5: plantas transgênicas de 3 passagens. (d) Análise de Southern (usando a sonda “b”) mostrando que os transgenes foram inseridos no genoma do cloroplasto diferenciando as linhagens não transgênicas (1, presença de 7,7 kb e 16,5 kb) heteroplásmicas (2, presença de 7,7 kb, 10 kb, 16,5 kb e Bandas de 18,8 kb) e homoplásmica (3, presença das bandas de 10 kb e 18,8 kb). A presença de 10 kb e 18,8 na linhagem ALF2 demonstrou que os transgenes foram inseridos duas vezes no genoma do cloroplasto.

Imunoblot

Para as análises de imunoblot de soja foi utilizado um anticorpo policlonal contra a BMP-2. Nas análises de alface foi utilizado um anticorpo monoclonal anti-BMP2. Não foi possível identificar BMP-2 em extratos protéicos de nenhuma das linhagens de alface transplastômico (Figura 7b). Já na linhagem de soja SOY 7 foi possível observar a proteína proBMP2 na altura esperada de 45kDa, que também pôde ser visualizada na análise de SDS-PAGE após coloração com azul de Comassie (Figura 8b).

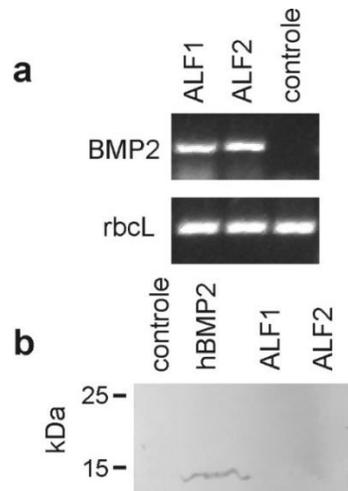


Figura 7. (a) RT-PCR mostrando a presença dos transcritos de rhBMP2 (bandas superiores) nas folhas das linhagens de alface transplastômica ALF1 e ALF2. As bandas inferiores correspondem a transcritos do gene rbcL (Rubisco) (controle interno). (b) Análise de Western blot para detecção de rhBMP2 em folhas de alface ALF1 e ALF2. Controle: planta não transgênica; rhBMP2: controle positivo (proteína comercial de GenScript) (1 µg).

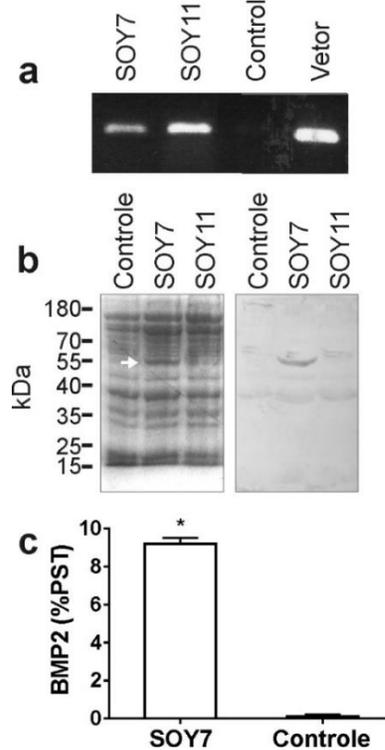


Figura 8. (a) Análise por PCR das linhagens transgênicas de soja (SOY7 e SOY11) demonstrando a presença do transgene BMP2. Controle: planta não transgênica. Vetor: plasmídeo usado como controle positivo. (b) Análises de Western blot para detecção de BMP-2 em sementes das linhagens de soja SOY7 e SOY11 (à direita). SDS-PAGE de proteínas de semente total (25 µg) coradas com azul de coomassie à esquerda. A seta branca demonstra a posição de hBMP2. Controle: planta não transgênica. (c) ELISA em fase sólida realizada utilizando o imunoenensaio TMQuantikine Human BMP-2 para detectar e quantificar a proBMP2 em sementes de soja (linhagem SOY7). Controle: sementes não transgênicas. Asterisco representa diferença significativa em relação ao controle (P < 0,01, n = 3).

Quantificação de hBMP2 em soja

A técnica ELISA sanduíche revelou que a proteína BMP-2 foi expressa na linhagem transgênica SOY7 em níveis de até 9,28% da proteína total solúvel da semente (Figura 8c).

Ensaio de atividade biológica de BMP-2

Os resultados de PCR quantitativo se referem a amostras provenientes de ensaio com 2 e 4 dias (figura 9). Nos ensaios com células tratadas com extrato protéico de alface não foi possível observar diferença significativa na expressão dos genes avaliados, comparando as amostras teste e controle (dados não mostrados). Nas células tratadas com extrato protéico de soja transgênica SOY 7 foi possível detectar aumento na expressão relativa de dois genes testados da via de formação óssea: SPT7 (Osterix) e ALPI (fosfatase alcalina). Os outros genes avaliados não apresentaram aumento da expressão relativa. Os valores de fold change foram expressos em função do valor de expressão de soja NT (não transformada) com 2 dias de ensaio. Os resultados para a linhagem de soja SOY7 mostraram um aumento significativo da expressão de SP7 e ALPI. O gene SP7 apresentou aumento de expressão da ordem de 6,6 e 7,8 vezes. ALPI apresentou aumento de expressão de 4 vezes no dia 2, porém demonstrou uma pequena redução para 3,2 vezes no dia 4.

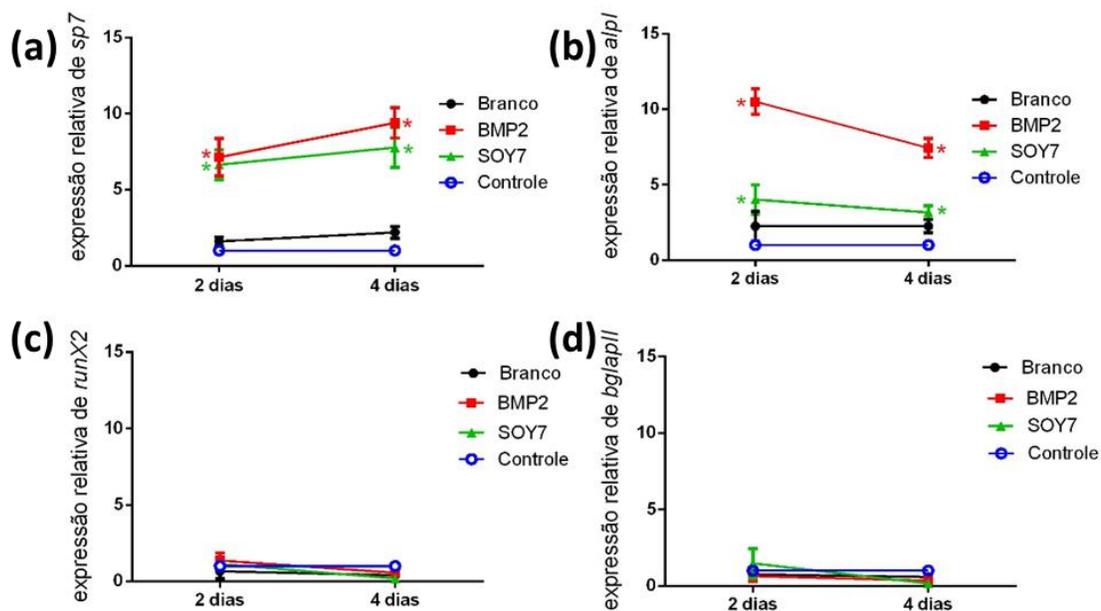


Figura 9: Expressão relativa de genes da via osteogênica. A expressão relativa dos genes SP7 (a), ALPI (b), RunX2 (c) e BglapII (d) em células C2C12 incubadas por dois e quatro dias com proteínas isoladas de sementes de soja (linhagem SOY 7 expressando a BMP-2, na concentração de 25 μ g/mL), 0 ng / mL (branco) e 50 ng / mL BMP-2. Os dados foram representados como *fold change* em relação ao controle (soja não transformada), que foi igual a 1,0. A normalização dos dados foi realizada com GAPDH. Os dados representam média \pm se, n = 3 réplicas biológicas. Os asteriscos representam diferenças estatísticas significativas em relação ao controle (GAPDH) (P < 0,05).

DISCUSSÃO

A expressão de proteínas heterólogas em sistemas vegetais tem vários atrativos, e pode ser considerada mais segura devido à ausência de patógenos humanos, além de mais eficiente devido à possibilidade de se obter um grande número de moléculas funcionais (Ma et al., 2013). Novos sistemas para produção de proteínas terapêuticas têm sido estudados, com o objetivo de produzir maiores quantidades de moléculas valiosas com custo reduzido (Lomonossoff & D'Aoust, 2016).

Uma das principais vantagens de todos os sistemas de expressão baseados em plantas é a redução significativa do custo de produção comparado a células de mamíferos. Células animais possuem maquinaria pós-traducional, mas a manipulação, meios de cultura e sistemas fermentativos para cultivá-las não são triviais, o que acaba levando a baixas quantidades de proteínas recombinantes (Karg & Kallio, 2009).

Os custos de uma instalação para crescimento de plantas compatível com as normas vigentes são muito menores se comparados com os custos de uma instalação para produção de biofármacos em fermentadores celulares, com capacidade de produção equivalente. Além disso, o cultivo de plantas não requer alto nível de *input* tecnológico, o que facilita adoção deste método produtivo por parte de países em desenvolvimento (Ma et al., 2013).

A visão inicial da cadeia de *biopharming* em plantas era de produção altamente escalonável de proteínas recombinantes valiosas a uma fração do custo dos sistemas convencionais. Esta meta ainda é válida, mas foi contrabalanceada pela percepção de que as plantas provavelmente não substituirão os sistemas-padrão da indústria, embora permaneçam interessantes para fabricação de produtos de determinados nichos que provavelmente definirão o mercado a curto e médio prazo (Paul et al., 2013)

A BMP-2 está associada a vários processos durante a regeneração óssea, sendo um fator importante que impulsiona as primeiras etapas das vias envolvidas. Neste estudo, dois sistemas vegetais foram avaliados para produção de BMP-2. Verificou-se que a transformação estável de soja para expressar o gene hBMP2 completo (expressando a pré-proteína) foi uma estratégia efetiva para produzir uma proteína biologicamente ativa.

Duas linhagens de alfaca transplastômico foram obtidas, com a inserção dos transgenes em duas regiões do genoma do cloroplasto. Em uma linhagem, duas cópias dos transgenes foram inseridas nas regiões repetitivas do genoma. Na outra, foi usado um vetor baseado em pRL1001

para inserir os transgenes na região intergênica entre *rbcL* e *accD* (Kanamoto et al., 2006). Vetores baseados nesta estratégia têm sido usados para expressar, de forma eficiente, Interferon- γ , uma lipoproteína bacteriana (*OspA*) e fator de crescimento β -3 em cloroplastos de tabaco (Leelavathi & Reddy 2003; Glenz et al., 2006; Gisby et al., 2011), Tiorredoxina humana tipo1 e Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos Humanos em cloroplastos de alface (Lim et al., 2011; Tabar et al., 2013). Um vetor baseado em pRL1001 foi anteriormente usado para produzir grandes quantidades de um peptídeo funcional de 12,1 kDa, correspondente a epítomos da proteína E do vírus da dengue (Maldaner et al., 2013). Foi testado um novo vetor para inserir os transgenes duas vezes na região repetitiva, entre *tRNA-Ile* e *trnA-UGC*. Há relatos na literatura demonstrando eficiência na expressão de proteínas terapêuticas recombinantes com a inserção dos transgenes no genoma do cloroplasto de alface e tabaco, entre *tRNA-Ile* e *trnA-UGC*, para produção de antígenos vacinais contra cólera e malária, proteína L1 do papilomavírus humano e Fator IX encapsulado (Fernández et al., 2008; Davoodi-Semiromi et al., 2010; Su et al., 2015). Krichevsky et al. (2010) alcançaram 25 vezes mais luciferase (*lux*) com inserção do transgene nessa região, quando comparado com a inserção em outras regiões, como a região espaçadora transcricionalmente silenciada (conceito Maliga) (Jin & Daniell, 2015). Neste trabalho, foram geradas plantas transgênicas homoplásmicas para expressar BMP-2 em ambas as regiões, descritas como espaçador transcricionalmente silenciadas e ativa (conceito Daniell) (Jin & Daniell, 2015). No entanto, não foi possível observar quantidades detectáveis de BMP-2 em folhas de plantas transformadas com os conceitos de Maliga e Daniell. Apesar disso, os resultados indicaram a presença de mRNA em *steady-state*, sugerindo que os genes estão sendo transcritos corretamente. A ausência de quantidades detectáveis de BMP-2 pode estar relacionada à instabilidade ou degradação da proteína. Da mesma forma, Lelivelt et al (2005) tentaram expressar uma proteína imunogênica contra o vírus influenza no cloroplasto de alface, e a proteína heteróloga também não foi identificada, a despeito de se ter encontrado transcritos em análises de Northern blot.

Elghabi et al. (2011) relataram que não expressaram, inicialmente, Cianovirina-N em cloroplasto de tabaco. No entanto, após a fusão de Cianovirina-N com GFP ou PlyGBS (proteína antimicrobiana) foi possível atingir 0,3% de proteína total solúvel utilizando a combinação Cianovirina-GFP. Tem sido sugerido que vários fatores-chave podem influenciar o acúmulo correto de proteína recombinante terapêutica em cloroplastos, como instabilidade relacionada ao

N-terminal, dobramento inadequado e sequência interna (Apel et al., 2010; De Marchis et al., 2012; Bock, 2014). Alguns desses fatores podem estar associados a um baixo acúmulo de BMP-2 na alface.

Sementes de várias espécies de plantas têm sido usadas para produzir proteínas farmacêuticas, como *Arabidopsis*, arroz e milho (Stoger et al., 2005; Boothe et al., 2010). As principais vantagens destes sistemas incluem maiores quantidades de proteínas acumuladas, menor teor de protease, estabilidade e armazenamento a longo prazo de proteínas recombinantes (Stoger et al., 2005). Como alternativa para o acúmulo de BMP-2 em plantas, avaliamos o sistema de expressão em sementes de soja. Utilizamos anteriormente sementes de soja como veículo para a produção de hormônio de crescimento humano bioativo (2,9% PST) e fator IX (0,23% TSP) com genes controlados pelo promotor da β -conglucininina e adição do peptídeo sinal da α -Coixina (Cunha et al. al., 2011a, b).

A BMP-2 foi expressa em folhas de tabaco como a sequência do gene completo ou fusionada a β -glucuronidase ou γ -zeína de milho (Ceresoli et al. 2016; Suo et al. 2006), acumulando de 0,02% a 1% da proteína solúvel total. Em nosso trabalho, foi observado que a linhagem de soja SOY7 acumulou até 9,28% de PST, sugerindo que poderia ser um sistema melhor para a produção de BMP-2 recombinante em plantas. Além disso, demonstramos que a BMP-2 produzida na semente de soja era funcional.

Células C2C12 são linhagens contínuas de células de mioblastos de camundongo, que são altamente responsivas a BMP-2, e podem se diferenciar a células da linhagem osteoblástica. Essas células possuem atividade de ALPI muito aumentada em resposta à BMP-2 no meio, em comparação com células em meio de crescimento padrão (Lee et al. 2014). A diferença no *fold change* entre os tratamentos com extratos de soja e rhBMP2 pode estar relacionada ao fato de que a proteína no extrato de soja não foi purificada e reduziu a quantidade de BMP-2 efetivamente entregue às células. Também pode estar relacionada às modificações pós-traducionais da proBMP2 ocorridas na semente de soja ou mesmo nas células C2C12 (von Einem et al. 2011). Antes de expressar ALP1, as células têm que expressar o fator de transcrição SP7, para iniciar a diferenciação a linhagem osteoblástica (Sondag et al. 2014). RunX2 é um dos primeiros genes ativos da cascata, no entanto, é expresso num curto espaço de tempo, o que dificulta detecção do mRNA. No caso de BglapII (osteocalcina), a não detecção do mRNA está relacionada ao fato deste

gene ser expresso em etapas posteriores da via, além do intervalo de dias analisado (Ryoo et al., 2006). A expressão do transgene tem sido estável por pelo menos quatro gerações de plantas homozigotas (dados não mostrados), corroborando nossa observação anterior de que as sementes de soja fornecem um sistema eficaz para alcançar o acúmulo estável de proteínas terapêuticas funcionais.

Em conclusão, foram avaliados dois sistemas para a expressão estável de moléculas de BMP-2 humanas recombinantes biologicamente ativas. Foi avaliada a expressão de rhBMP2 de 13kDa em folhas de alface (*Lactuca sativa*) (via transformação do genoma do cloroplasto) e de proBMP2 de 45kDa em sementes de soja (*Glycine max*) (via transformação nuclear). Os extratos de proteínas foram avaliados quanto à atividade biológica usando ensaios estabelecidos com linhagens celulares sensíveis à BMP-2. Tecidos de soja cotiledonar demonstraram ser um hospedeiro adequado para a BMP-2 em termos de bioatividade protéica e nível de expressão.

PERSPECTIVAS

Embora dois sistemas de expressão de proteínas em tecidos vegetais tenham sido estudados, não se pode comparar a eficiência de cada um, uma vez que foram usadas sequências distintas de BMP-2. No entanto, se torna provável que o sistema baseado em expressão em sementes de soja venha a ser útil para expressar BMP-2 recombinante em larga escala. Na continuação desse trabalho, é fundamental que se avalie a possibilidade de expressar a porção funcional da BMP-2 (rhBMP2 de 13 kDa) em plantas de soja.

Seria interessante estudar o processamento da proBMP2 produzidas em sementes de soja em células C2C12 a fim de se observar a forma madura da proteína.

Uma vez que se observou a indução de genes da cascata de osteogênese em células C2C12, seria importante a condução de um estudo *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad N, Michoux F, Lössl AG, Nixon PJ (2016) Challenges and perspectives in commercializing plastid transformation technology. *J Exp Bot.* 67:5945-5960
- Andersen DC & Krummen L (2002) Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Current Opinion in Biotechnology.* 13:117-123.
- Apel W, Schulze WX, Bock R (2010) Identification of protein stability determinants in chloroplasts. *Plant Journal.* 63:636-650
- Aragão FJL, Sarokin L, Vianna GR, Rech EL (2000) Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. *Theor Appl Genet* 101:1-6
- Arlen PA, Falconer R, Cherukumilli S, et al (2007) Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon- α 2b. *Plant Biotechnol J.* 5:511-525
- Assenberg R, Wan PT, Geisse S, Mayr LM. (2013) Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. *Curr Opin Struct Biol.* 23:393-402
- Barta A, Sommergruber K, Thompson D, Hartmuth K, Matzke MA, Matzke AJM (1986) The expression of a nopaline synthase — human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue *Plant Molecular Biology.* 6:347-357.
- Bessho K, Konishi Y, Kaihara S, Fujimura K, Okubo Y, Iizuka T (2000) Bone induction by *Escherichia coli*-derived recombinant human bone morphogenetic protein-2 compared with Chinese hamster ovary cell-derived recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Br J Oral Maxillofac Surg* 38:645-649
- Bibbo C, Nelson J, Ehrlich D, Rougeux B (2015) Bone morphogenetic proteins: indications and uses. *Clin Podiatr Med Surg.* 32:35-43
- Bock R (2014) Genetic engineering of the chloroplast: Novel tools and new applications. *Curr Opin Biotechnol* 26:7-13
- Boothe J, Nykiforuk C, Shen Y, et al. (2010) Seed-based expression systems for plant molecular farming. *Plant Biotechnol J* 8:588-606
- Boyhan D and Daniell H (2011) Low-cost production of proinsulin in tobacco and lettuce chloroplasts for injectable or oral delivery of functional insulin and C-peptide. *Plant Biotechnol J* 9:585-598

- Boynthon, JE, Nicholas W, Elizabeth H, Jonathan P, Anita M., Sanford, JC, (1988). Chloroplast Transformation in Chlamydomonas with High Velocity Microprojectiles. *Science* 240: 1534-1538.
- Brasileiro, ACM & Carneiro, VT (1998). Manual de transformação genética de plantas. Brasília, Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen.
- Brazil, DP, Church, RH, Surae, S, Godson, C, Martin, F (2015) BMP signalling: agony and antagonism in the family. *Trends in Cell Biology* 25:249–64
- Butler M. (2005). Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:283-291.
- Buyel, JF & Fischer, R, (2012). Predictive models for transient protein expression in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) can optimize process time, yield, and downstream costs. *Biotechnol. Bioeng.* 109: 2575–2588.
- Buyel JF, Twyman RM, Fischer R. (2017). Very-large-scale production of antibodies in plants : The biologization of manufacturing. *Biotechnol Adv.* 35:458-465.
- Carreira AC, Lojudice FH, Halcsik E, Navarro RD, Sogayar MC, Granjeiro JM (2014a) Bone morphogenetic proteins: Facts, challenges, and future perspectives. *J Dent Res* 93:335-345
- Carreira, AC, Alves, GG, Zambuzzi, WF, Sogayar, MC, Granjeiro, JM (2014b) Bone Morphogenetic Proteins: structure, biological function and therapeutic applications. *Archives of biochemistry and biophysics* 561:64–73
- Ceresoli V, Mainieri D, Del Fabbro M, Weinstein R, Pedrazzini E (2016). A Fusion between domains of the human bone morphogenetic protein-2 and maize 27 kD γ -zein accumulates to high levels in the endoplasmic reticulum without forming protein bodies in transgenic tobacco. *Frontiers in Plant Science* 7: 1-13
- Çelik E & Çalik P (2012). Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances* 30:1108-1118.
- Cunha NB, Araújo ACG, Leite A, Murad AM, Vianna GR, Rech EL (2010) Correct targeting of proinsulin in protein storage vacuoles of transgenic soybean seeds. *Genet Mol Res* 9:1163-1170
- Cunha NB, Murad AM, Cipriano TM, et al (2011a) Expression of functional recombinant human growth hormone in transgenic soybean seeds. *Transgenic Res* 20(4):811-826

- Cunha NB, Murad AM, Ramos GL, et al. (2011b) Accumulation of functional recombinant human coagulation factor IX in transgenic soybean seeds. *Transgenic Res* 20:841-855
- Daniell H, Singh ND, Mason H, Streatfield SJ (2010) Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends Plant Sci* 14:669-679
- Daniell H, Lin C, Yu M, Chang W (2016). Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering. *Genome Biol.* 17:1-29.
- Davoodi-Semiromi A, Schreiber M, Nalapalli S, et al. (2010) Chloroplast-derived vaccine antigens confer dual immunity against cholera and malaria by oral or injectable delivery. *Plant Biotechnol J* 8:223-242
- De Marchis F, Pompa A, Bellucci M (2012) Plastid Proteostasis and Heterologous Protein Accumulation in Transplastomic Plants. *Plant Physiol* 160:571-581
- De Martinis D, Rybicki EP, Fujiyama K, Franconi R, Benvenuto E (2016) Plant Molecular Farming: Fast, Scalable, Cheap, Sustainable. *Frontiers in plant science* 7:1148
- Dennler S, Goumans MJ, ten Dijke P (2002). Transforming growth factor beta signal transduction. *J Leukoc Biol.* 71: 731–740
- Dingermann T (2008) Recombinant therapeutic proteins: Production platforms and challenges. *Biotechnol. J*; 3: 90-97.
- Elghabi Z, Karcher D, Zhou F, Ruf S, Bock R (2011) Optimization of the expression of the HIV fusion inhibitor cyanovirin-N from the tobacco plastid genome. *Plant Biotechnol J* 9:599-608
- Farran I, Ríó-Manterola F, Íñiguez M, Gárate S, Prieto J, Mingo-Castel AM (2008) High-density seedling expression system for the production of bioactive human cardiotrophin-1, a potential therapeutic cytokine, in transgenic tobacco chloroplasts. *Plant Biotechnol J* 6:516-527
- Fernández-San Millán A, Ortigosa SM, Hervás-Stubbs S, et al. (2008) Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Plant Biotechnol J* 6:427-441
- Fischer, R & Emans N, (2000). Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Research* 9: 279-299.
- Fischer R, Schillberg S, Buyel JF, Twyman RM. (2013). Commercial Aspects of Pharmaceutical Protein Production in Plants. *Current Pharmaceutical Design*; 19: 5471-5477.

- Fu T-S, Chang Y-H, Wong C-B, et al (2015) Mesenchymal stem cells expressing baculovirus-engineered BMP-2 and VEGF enhance posterolateral spine fusion in a rabbit model. *Spine J* 15:2036-2044
- Gasser B, Prielhofer R, Marx H, et al. (2013). *Pichia pastoris*: protein production host and model organism for biomedical research. *Future Microbiology*. 8:191-208.
- Gautschi OP, Frey SP, Zellweger R. (2007) Bone morphogenetic proteins in clinical applications. *ANZ J. Surg.* 77:626-631.
- Ghodadra N & Singh, K (2008) Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the treatment of bone fractures. *Biologics: Targets & Therapy*; 2:345-354.
- Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E (2005) Bone substitutes : An update. *Injury, Int. J. Care Injured*; 36:20-27.
- Gisby MF, Mellors P, Madesis P, et al. (2011) A synthetic gene increases TGF β 3 accumulation by 75-fold in tobacco chloroplasts enabling rapid purification and folding into a biologically active molecule. *Plant Biotechnol J* 9:618-628
- Glenz K, Bouchon B, Stehle T, Wallich R, Simon MM, Warzecha H (2006) Production of a recombinant bacterial lipoprotein in higher plant chloroplasts. *Nat Biotechnol* 24:76-77
- Gregory G & Heyneker HL (1988) Secretion of correctly processed human growth hormone in *E. coli* and *Pseudomonas*. US patent 4755465
- Herzog RW, Nichols TC, Su J, et al (2017). Oral Tolerance Induction in Hemophilia B Dogs Fed with Transplastomic Lettuce. *Mol Ther.* 25:512-522.
- Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K. (1989). Production of antibodies in transgenic plants. *Nature.* 342:76-78.
- Hitchman RB, Possee RD, Siaterli E, et al. (2010). Improved expression of secreted and membrane-targeted proteins in insect cells. *Biotechnol. Appl. Biochem*; 93:85-93.
- Hogan BLM. (1996). Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes & Development* 10:1580-1594.
- Houdebine L. (2009). Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.* 32:107-121.
- Itakura K, Hirose T, Crea R, Riggs AD. (1977). Expression in *Escherichia coli* of a Chemically Synthesized Gene for the Hormone Somatostatin. *Science.* 198: 1056-1063

- Jarvis P & López-Juez E. (2013). Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 14: 787-802
- Jia B, Jeon CO (2016) High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open Biol*. 6: 160-196
- Jin S and Daniell H (2015) The engineered chloroplast genome just got smarter. *Trends in Plant Science* 20: 622-640
- Kanamoto H, Yamashita A, Asao H, et al. (2006) Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids. *Transgenic Res* 15:205-217
- Karg SR & Kallio PT. (2009). The production of biopharmaceuticals in plant systems. *Biotechnology advances*, 27: 879-894.
- Krichevsky A, Meyers B, Vainstein A, Maliga P, Citovsky V (2010) Autoluminescent plants. *PLoS One* 5:1-6
- Kues WA & Niemann H. (2011). Advances in farm animal transgenesis. *Prev Vet Med*. 102:146-156.
- Lacorte C, Vianna G, Aragão FJL, Rech EL (2010) Molecular Characterization of Genetically Manipulated Plants. In: *Plant Cell Cult Essent Methods*, pp 261-279
- Lagassé HAD, Alexaki A, Simhadri VL, et al. (2017). Recent advances in (therapeutic protein) drug development. *F1000Research* 2017, 6(F1000 Faculty Rev):113.
- Lakshmi PS, Verma D, Yang X, Lloyd B, Daniell H (2013) Low Cost Tuberculosis Vaccine Antigens in Capsules: Expression in Chloroplasts, Bio-Encapsulation, Stability and Functional Evaluation In Vitro. *Plos One*; 8(1): e54708.
- Lee HL, Park HJ, Kwon A, et al. (2014) Smurf1 plays a role in EGF inhibition of BMP2-induced osteogenic differentiation. *Exp Cell Res* 323:276-287
- Lee M-H, Kwon T-G, Park H-S, Wozney JM, Ryoo H-M (2003) BMP-2-induced Osterix expression is mediated by *Dlx5* but is independent of *Runx2*. *Biochem Biophys Res Commun* 309:689-694
- Leelavathi S & Reddy VS (2003) Chloroplast expression of His-tagged GUS-fusions: A general strategy to overproduce and purify foreign proteins using transplastomic plants as bioreactors. *Mol Breed* 11:49-58

- Lelivelt CL, McCabe MS, Newell CA, Desnoo CB, van Dun KM, Birch-Machin I, Gray JC, Mills KH, Nugent JM (2005) Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant Mol Biol* 58:763-774
- Lim S, Ashida H, Watanabe R, et al. (2011) Production of biologically active human thioredoxin 1 protein in lettuce chloroplasts. *Plant Mol Biol* 76:335-344
- Lissenberg-Thunnissen SN, De Gorter DJJ, Sier CFM, Schipper IB (2011) Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *International Orthopaedics*. 35:1271–1280
- Livak, KJ (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods* 25:402-408
- Lomonosoff GP & D’Aoust MA (2016) Plant-produced biopharmaceuticals: A case of technical developments driving clinical deployment. *Science* 353:1237-1240
- Lyon GM, Mehta AK, Varkey JB, et al. (2014) Clinical Care of Two Patients with Ebola Virus Disease in the United States. *N Engl J Med*. 371:2402-2409
- Ma JKC, Drake PMW, Christou P (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet* 4:794-805
- Ma JKC, Christou P, Chikwamba R, et al. (2013) Realising the value of plant molecular pharming to benefit the poor in developing countries and emerging economies. *Plant Biotechnol J*.11:1029-1033
- Maldaner FR, Aragão FJL, Dos Santos FB, et al. (2013) Dengue virus tetra-epitope peptide expressed in lettuce chloroplasts for potential use in dengue diagnosis. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:5721-5729
- Mendonça G., Mendonça DBS, Oliveira LS, Araújo CA (2013). Effect of hydrophilic implant surfaces on differentiation of human mesenchymal stem cells, *Implant News Perio*; 10: 97–102.
- Maruoka Y, Oida S, Iimura T, Takeda K, Asahina I, Enomoto S, Sasaki S (1995) Production of functional human bone morphogenetic protein-2 using a baculovirus/Sf-9 insect cell system. *Biochemistry and molecular biology international* 35:957-963
- Mendonça G, Baccelli D, Mendonça S. (2013) Effect of hydrophilic implant surfaces on differentiation of human mesenchymal stem cells. *Implant News Perio* 10:97-102

- Meyers, B, Zaltsman, A, Lacroix, B, Kozlovsky, SV & Krichevsky, A. (2010). Nuclear and plastid genetic engineering of plants: comparison of opportunities and challenges. *Biotechnology advances*, 28: 747-756.
- Nadai M, Bally J, Vitel M, et al (2009) High-level expression of active human alpha1-antitrypsin in transgenic tobacco chloroplasts. *Transgenic Res* 18:173-183
- Oey M, Lohse M, Kreikemeyer B and Bock R (2009) Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. *The plant journal*, 57, 436-445
- Paul MJ, Teh AYH, Twyman RM, Ma JK. Target Product Selection - Where Can Molecular Pharming Make the Difference. *Current Pharmaceutical Design*, 19:5478-5485
- Quesada-Vargas T, Ruiz ON, Daniell, H. (2005). Characterization of heterologous multigene operons in transgenic chloroplasts. Transcription, processing, and translation. *Plant Physiology*. 138: 1746-1762.
- Rech EL, Vianna GR, Aragão FJL (2008) High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. *Nat Protoc* 3:410-418
- Rech EL. (2012). Seeds, recombinant DNA and biodiversity. *Seed Science Research*; 22:36-44.
- Ruhlman T, Ahangari R, Devine A, Samsam M, Daniell H (2007). Expression of cholera toxin β -proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplasts-oral administration protects against development of insulinitis in non-obese diabetic mice. *Plant Biotechnology Journal*; 5: 495–510
- Ruhlman, T., Verma, D., Samson, N., & Daniell, H. (2010). The role of heterologous chloroplast sequence elements in transgene integration and expression. *Plant physiology*, 152: 2088-2104.
- Ruhlman, TA (2014). Plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.) by biolistic DNA delivery. In *Chloroplast Biotechnology* (pp. 331-343). Humana Press, Totowa, NJ.
- Ryoo H, Lee M, Kim Y (2006). Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene*; 366:51-57.
- Sakamoto W, Miyagishima S, Jarvis P, Sakamoto W, Miyagishima S, Jarvis P (2008). Chloroplast Biogenesis: Control of Plastid Development, Protein Import, Division and Inheritance. *The Arabidopsis Book*. 1-30.

- Schmidt FR. (2004). Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl Microbiol Biotechnol.*65:363-372.
- Shaaltiel Y, Bartfeld D, Hashmueli S, et al. (2007) Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant Biotechnology Journal.* 5:579-590
- Sharma AK & Sharma MK (2009). Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances.* 27: 811-832.
- Sondag GR, Salihoglu S, Lababidi SL, et al. (2014) Osteoactivin induces transdifferentiation of C2C12 myoblasts into osteoblasts. *J Cell Physiol* 229:955-966
- Spreitzer RJ & Salvucci ME (2002). Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annual review of plant biology.* 53: 449-475
- Staub JM, Garcia B, Graves J, et al (2000) High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat Biotechnol* 18:333-338
- Stoger E, Vaquero C, Torres E et al. (2000) Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Mol. Biol.* 42: 583–590
- Stoger E, Ma JKC, Fischer R, Christou P (2005) Sowing the seeds of success: Pharmaceutical proteins from plants. *Curr Opin Biotechnol* 16:167-173
- Stoger E, Fischer R, Moloney M, Ma JK. (2014) Plant Molecular Pharming for the Treatment of Chronic and Infectious Diseases. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65:743–68
- Svab Z, Hajdukiewicz P, Maliga P (1990) Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 8526–8530
- Su J, Zhu L, Sherman A, et al. (2015) Low cost industrial production of coagulation factor IX bioencapsulated in lettuce cells for oral tolerance induction in hemophilia B. *Biomaterials* 70:84-93
- Suo G, Chen B, Zhang J, Gao Y, Wang X, He Z, Dai J (2006) Expression of active hBMP2 in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Reports* 25:1316–1324
- Tabar MS, Habashi AA and Memari HR (2013) Human granulocyte colony-stimulating factor (hg-csf) expression in plastids of lactuca sativa. *Iran Biomed J* 17:158-164
- Tschofen M., Knopp D, Hood E, Stöger E. (2016). Plant molecular farming: much more than medicines. *Annual Review of Analytical Chemistry.* 9: 271-294.

- Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, Rosen V (2006) BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nature genetics* 38:1424–1429
- Twyman RM, Schillberg S, Fischer R. (2005) Transgenic plants in the biopharmaceutical market. *Expert Opinion Emerging Drugs* 1472:1-34.
- Urist, MR (1965) Bone: formation by autoinduction. *Science* 150:893-899
- Vallejo, FL, Brokelmann M, Marten S, et al. (2002) Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. 94:185-194.
- Verma D, Moghimi B, LoDuca PA, et al (2010) Oral delivery of bioencapsulated coagulation factor IX prevents inhibitor formation and fatal anaphylaxis in hemophilia B mice. *Proc Natl Acad Sci* 107:7101-7106
- Vianna GR, Cunha NB, Murad AM, Rech EL (2011) Soybeans as bioreactors for biopharmaceuticals and industrial proteins. *Genet Mol Res* 10:1733-1752
- von Einem, S, Erler, S, Bigl, K, Frerich, B, & Schwarz, E (2011) The pro-form of BMP-2 exhibits a delayed and reduced activity when compared to mature BMP-2. *Growth Factors* 29: 63–71.
- Walsh G (2014) Biopharmaceutical benchmarks. *Nat Biotechnol* 24:831-833
- Wang EA, Rosen V, Alessandro JSD, et al. (1990) Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci* 87:2220-2224
- Wang Y-P, Wei Z-Y, Zhong X-F, et al. (2015) Stable Expression of Basic Fibroblast Growth Factor in Chloroplasts of Tobacco. *Int J Mol Sci* 17:19
- Wurm FM. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*. 22:1393-1398.
- Yarbakht M, Jalali-Javaran M, Nikkhah M, Mohebodini M (2015) Dicistronic expression of human proinsulin-protein A fusion in tobacco chloroplast. *Biotechnol Appl Biochem* 62:55-63
- Yu J. & Langridge W. H (2001) A plant-based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases. *Nature Biotechnol*. 19: 548–552
- Zhang B, Shanmugaraj B, Daniell H (2017) Expression and functional evaluation of biopharmaceuticals made in plant chloroplasts. *Curr Opin Chem Biol* 38:17-23