

Leonor Brás de Oliveira Bandeira de Melo

Licenciada em Biologia

**Culturas Celulares de Tabaco BY2 para a Produção de
Biofármacos: O Papel da Metilação do ADN na
Expressão do Transgene**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre
em Bioquímica para a Saúde

Orientador: Doutora Rita Abranches, ITQB NOVA

Leonor Brás de Oliveira Bandeira de Melo

Licenciada em Biologia

**Culturas Celulares de Tabaco BY2 para a Produção de
Biofármacos: O Papel da Metilação do ADN na
Expressão do Transgene**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre
em Bioquímica para a Saúde

Orientador: Doutora Rita Abranches, ITQB NOVA

Presidente: Doutor Pedro Manuel H. M. Matias
Arguente: Doutora Helena Manuela Gil Azinheira
Vogais: Doutora Margarida Archer Franco Frazão
Doutora Rita Sobral Moutinho Abranches

Instituto de Tecnologia Química e Biológica

Dezembro 2017

Culturas Celulares de Tabaco BY2 para a Produção de Biofármacos: O Papel da Metilação do ADN na Expressão do Transgene

Copyright © Leonor Brás de Oliveira Bandeira de Melo, ITQB NOVA, UNL

O Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Culturas Celulares de Tabaco BY2 para a Produção de Biofármacos: O Papel da Metilação do ADN na Expressão do Transgene

Agradecimentos

Gostaria de agradecer em primeiro lugar ao laboratório Plant Cell Biology por me ter acolhido da melhor maneira possível, em especial à minha orientadora Rita Abranches, por me ter concedido a oportunidade de realizar a minha dissertação de mestrado e por me acompanhar em cada etapa da mesma. Quero também agradecer aos restantes membros do laboratório, Bárbara Rebelo e Rita Santos, por todo o apoio prestado sempre que eu precisava, e em especial à Sofia Pires e André Folgado, por me terem ajudado a ultrapassar todos os obstáculos e a manterem-me sempre positiva, fosse qual fosse o resultado.

Gostaria também de agradecer à Denise Coutinho do laboratório Bacterial Cell Surfaces and Pathogenesis, por todo o apoio prestado ao longo deste ano.

Ao meu grupo de amigos de licenciatura e mestrado que me acompanharam durante a vida académica, e que sem o apoio constante deles eu provavelmente não teria chegado até aqui, Sara Moreira, Renato Mateus, Margarida Silva, Joana Ferreira, Miguel Correia, Andreia Vieira e Raquel Sousa, um obrigado por fazerem a minha vida mais feliz.

Quero agradecer a três pessoas especiais que me acompanham há mais de 15 anos e que, apesar de seguirmos caminhos diferentes, sempre estiveram presentes em todos os altos e baixos e sempre souberam como animar mais a minha vida, Ana Margarida, Cátia Ferreira e Joana Rodrigues, com a vossa alegria constante tudo é mais fácil.

À minha prima Ana Brás de Oliveira, muito obrigada por me incentivar a continuar sempre em frente e pelo grande apoio que foi durante este último ano.

À Rita Nogueira, a minha companheira de laboratório e amiga, por me ter ajudado nos momentos em que precisava, tendo sempre paciência para me ouvir. Obrigada por todos os momentos de diversão, que ajudaram que cada dia fosse melhor e mais alegre.

Quero agradecer a duas pessoas que, mesmo estado longe sempre me mandaram cartas de incentivo para que eu tivesse mais força para continuar este trabalho sem nunca desistir, mana do meu coração (Maria Amaral) e Catarina Petrucci, muito obrigada pelo vosso apoio ao longo da minha vida académica e em especial neste último ano que teve um começo difícil.

À minha mãe e ao meu pai, Isabel e Fernando, pelo suporte fundamental que têm sido ao longo de toda a minha vida, e por me ajudarem a alcançar os meus sonhos. Um especial obrigado à minha mãe por me ouvir sempre que eu precisava de ajuda, mesmo não sendo da área.

Por fim, um muito obrigado à pessoa que me atura já há 7 anos consecutivos e que sem o seu apoio constante provavelmente não teria acabado a tempo. Por ter aturado todas as minhas desistências pelo caminho e mesmo assim reerguer-me, o meu apoio incondicional e que me alegra todos os dias, Ricardo Ribeiro.

A todos vós dedico esta dissertação de mestrado.

Leonor Melo

Resumo

Estratégias de engenharia genética como *molecular farming*, essenciais para a produção de proteínas recombinantes e outros metabolitos secundários em plantas, possuem o potencial para fornecer quantidades praticamente ilimitadas de proteínas recombinantes para uso como ferramentas de diagnóstico e terapêuticas em cuidados de saúde e ciências da vida. Culturas celulares em suspensão, como as células de tabaco BY2 (Bright Yellow 2) podem ser facilmente transformadas, e têm surgido várias abordagens no âmbito de aumentar a produção, incluindo a otimização do meio ou o uso de vetores de expressão otimizados. O objetivo deste trabalho passou por tentar otimizar a produção, aumentando os níveis de transcrição do transgene que codifica a proteína de interesse Prostaglandina D sintase do tipo lipocalina (L-PGDS), através de modulação epigenética usando agentes de hipometilação. O tratamento de células vegetais e animais com 5-azacitidina resulta na desmetilação do ADN tanto direta como indiretamente. Procurou-se estabelecer a concentração ótima de 5-azacitidina nas linhas celulares através da aplicação de concentrações diferentes do composto, tendo sido efetuada posteriormente a imunodeteção de citosinas metiladas em núcleos de BY2, bem como estudos relativos a metilação através dos métodos do *Dot-Blot* e conversão por bissulfito. Encontrada a concentração ótima de 1 μ M com adição diária, não foi possível aumentar os rendimentos da L-PGDS através da desmetilação do ADN do promotor do transgene, uma vez que este já se encontrava desmetilado. Contudo, foi vantajoso abordar o efeito do composto 5-azacitidina em células BY2 na metilação do ADN, bem como o seu efeito em certas regiões do ADN, uma vez que não existem muitos estudos em células BY2 com este composto.

Palavras-chave: *Molecular Farming*, *Nicotiana tabacum*, Bright Yellow 2 (BY2), 5-azacitidina, Metilação do ADN, L-PGDS

Abstract

Genetic engineering strategies such as molecular farming, essential for the production of recombinant proteins and other secondary metabolites in plants, have the potential to provide virtually unlimited amounts of recombinant proteins for use as diagnostic and therapeutic tools in health care and life sciences. Tobacco cell suspension cultures such as BY2 (Bright Yellow 2) can be easily transformed and a number of approaches have been developed to increase production, including medium optimization or the use of improved expression vectors. The aim of this work was to try to optimize the production, by increasing the transcription levels of the transgene encoding the protein of interest lipocalin-type Prostaglandin D synthase (L-PGDS), through epigenetic modulation using hypomethylation agents. Treatment with 5-azacytidine in plant and animal cells results in demethylation of DNA both directly and indirectly. We attempted to establish the optimum concentration of 5-azacytidine in the cell lines by applying different concentrations of the compound, and subsequently performed the immunodetection of methylated cytosines in BY2 nuclei, as well as methylation studies using Dot-Blot methods and conversion by bisulfite. At the optimum concentration of 1 μ M, added daily, it was not possible to increase the yields of L-PGDS by transgene promoter DNA demethylation, since it was already demethylated. However, it was advantageous to address the effect of the 5-azacytidine on BY2 cells in DNA methylation, as well as its effect on certain regions of the DNA, since there are not many studies in BY2 cells with this compound.

Keywords: *Molecular Farming, Nicotiana tabacum, Bright Yellow 2 (BY2), 5-azacytidine, DNA Methylation, L-PGDS*

Índice

1. Introdução	1
1.1. <i>Molecular Farming</i>	1
1.2. Plantas como sistema de produção proteica	2
1.2.1. Sistemas de expressão em plantas	4
1.2.2. Culturas de células vegetais em suspensão	5
1.2.2.1. Culturas celulares <i>Bright Yellow 2 (BY2)</i>	7
1.3. Otimizar a produção de proteínas recombinantes em plantas	8
1.3.1. Otimização da estabilidade do transgene	8
1.3.2. Otimização da expressão do transgene	9
1.3.2.1. Otimização da transcrição do gene de interesse	9
1.3.3. Humanização de proteínas em plantas	10
1.4. Espécies de plantas utilizadas em <i>Molecular Farming</i>	11
1.4.1. <i>Nicotiana tabacum</i> como sistema de expressão	11
1.5. Prostaglandina D sintase do tipo lipocalina (L-PGDS)	12
1.6. Processos de <i>Upstream</i> e <i>Downstream</i> na produção proteínas recombinantes	13
1.7. Epigenética	14
1.7.1. Metilação do ADN	15
1.7.1.1. Metilação nas plantas vs metilação nos animais	17
1.7.1.2. ADN metiltransferases	18
1.7.1.3. Desmetilação do ADN	19
1.7.1.4. Agentes hipometilantes do ADN	19
1.7.1.5. Métodos de Mapeamento de padrões globais de metilação do ADN	20
1.7.2. Modificação das histonas	21
1.7.3. ARN não codificante (ncARN)	22
1.8. Objetivos	23
2. Materiais e Métodos	25
2.1. Material Vegetal	25
2.2. Manutenção da linha celular BY2 BTAH 4	26
2.3. Determinação da curva de crescimento de BY2 BTAH 4	26

2.3.1. Determinação do peso seco do extrato celular	27
2.3.2. Quantificação da proteína total solúvel pelo método de <i>Bradford</i>	27
2.3.3. Perfil da proteína total e detecção da proteína recombinante	28
2.3.3.1. Preparação de amostras para SDS-PAGE	28
2.3.3.2. Preparação dos géis SDS-PAGE 12,5% acrilamida	28
2.3.3.3. Transferência horizontal semi-seca de proteínas	29
2.3.3.4. Quantificação por <i>western-blot</i> da proteína recombinante L-PGDS	30
2.4. Adição de 5-azacitidina a culturas celulares de BY2	31
2.4.1. Determinação das curvas de crescimentos de BY2 BTAH 4 com adição de 5-azacitidina a diferentes concentrações	32
2.5. Observação de células de linha BY2 BTAH 4 por microscopia de fluorescência	33
2.5.1. Obtenção de protoplastos e isolamento de núcleos de BY2	33
2.5.2. Imunodeteção da 5-metilcitosina em núcleos de BY2	34
2.6. Extração e determinação do estado de metilação do ADN total de BY2 BTAH 4	36
2.6.1. Determinação do grau de metilação do genoma total através do método do <i>Dot blot</i>	37
2.7. Determinação do estado de metilação do promotor 35SS	38
2.7.1. Amplificação por PCR	39
2.7.2. Sequenciação das amostras de PCR	41
3. Resultados e Discussão	43
3.1. Caracterização da linha celular BY2 BTAH 4	43
3.1.1. Determinação da curva de crescimento e quantificação da proteína total solúvel	43
3.1.2. Perfil da proteína total por SDS-PAGE e detecção da proteína recombinante por <i>western-blot</i>	45
3.2. Determinação da concentração ótima de 5-azacitidina	46
3.2.1. Adição de 5-azacitidina 5µM em culturas de BY2 BTAH 4	46
3.2.1.1. Determinação da curva de crescimento e quantificação da proteína total solúvel para a concentração de 5µM	46
3.2.1.2. Perfil da proteína total por SDS-PAGE e detecção da proteína recombinante por <i>western-blot</i> para a concentração de 5µM	48
3.2.2. Adição de 5-azacitidina 2,5µM	50
3.2.2.1. Determinação da curva de crescimento e quantificação da proteína total solúvel para a concentração de 2,5µM	50
3.2.2.2. Perfil da proteína total por SDS-PAGE e detecção da proteína recombinante por <i>western-blot</i> para a concentração de 2,5µM	51
3.2.3. Adição de 5-azacitidina 15µM, 50µM, 100µM e 150µM.....	52

3.2.3.1. Determinação da curva de crescimento e quantificação da proteína total solúvel para as concentrações de 15µM, 50µM, 100µM e 150µM	53
3.2.3.2. Perfil da proteína total por SDS-PAGE e deteção da proteína recombinante por <i>western-blot</i> para as concentrações de 15µM, 50µM, 100µM e 150µM	54
3.2.4. Adição diária de 5-azacitidina 1µM	55
3.2.4.1. Determinação da curva de crescimento e quantificação da proteína total solúvel para a concentração de 1µM	56
3.2.4.2. Perfil da proteína total por SDS-PAGE e deteção da proteína recombinante por <i>western-blot</i> para a concentração de 1µM	57
3.3. Imunodeteção da 5-metilcitosina em núcleos de BY2 BTAH 4 na presença de 5-azaC	59
3.4. Determinação do estado de metilação do ADN total de BY2 BTAH 4	61
3.4.1. Determinação do grau de metilação do genoma total através do método do <i>Dot blot</i>	62
3.5. Determinação do estado de metilação do promotor 35SS	63
4. Conclusões e Perspetivas Futuras	67
5. Bibliografia	71
6. Anexos	77

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Vantagens e limitações dos vários sistemas de produção de proteínas recombinantes	4
Figura 1.2 - Esquema representativo do processo de estabelecimento de culturas de células vegetais em suspensão para a produção de proteínas recombinantes	6
Figura 1.3 - Isomerização de PGH ₂ a PGD ₂ catalisada pela enzima L-PGDS	12
Figura 1.4 - Modificações da cromatina mediada pela metilação do ADN e acetilação das histonas	16
Figura 1.5 - Tratamento de 5-azacitidina evidenciando os resultados da desmetilação do ADN com incorporação do análogo no lugar da citosina durante a replicação do ADN e inibição da ação das enzimas metiltransferases	20
Figura 1.6 - Ilustração da reação da conversão por bissulfito, bem como a amplificação por PCR das bases de citosinas metiladas e não metiladas	21
Figura 1.7 - Maquinaria do ARN interferente (ARNi) pelo silenciamento de genes endógenos (miARN) e pelo silenciamento de genes exógenos (dsARN) que levam a um produto final de ARN mensageiro não funcional	23
Figura 2.1 - Plasmídeo pTRA-BTAH (L-PGDS)	25
Figura 2.2 - T-ADN de L-PGDS na forma secretada	26
Figura 2.3 - Trans-blot SD Semi-Dry Transfer Cell da BioRad utilizado para a transferência horizontal semi-seca	30
Figura 2.4 - ChemiDoc™ XRS+System da BioRad utilizado para visualizar as bandas do <i>western-blot</i>	33
Figura 2.5 - Thermo Electron Corporation Omnislide Thermal Cycler da Thermo Fisher Scientific, usada para incubar as lâminas com o anticorpo	35
Figura 2.6 - Tina de eletroforese horizontal Mini-Sub Cell GT da BioRad para corrida géis de agarose	36
Figura 2.7 - Sequência do promotor 35SS do plasmídeo pTRA-BTAH convertido a evidenciar a localização de ligação do par de <i>primers</i>	39

Figura 3.1 - Gráfico da curva de crescimento das células BY2 BTAH 4 e da produção de proteína total ao longo de 14 dias	43
Figura 3.2 - SDS-PAGE e <i>western-blot</i> para deteção da proteína total e de L-PGDS da curva padrão BY2 BTAH 4	45
Figura 3.3 - Gráficos da curva de crescimento e da produção de proteína total em células BY2 BTAH 4 ao longo de 7 dias com adição do composto a uma concentração de 5 μ M ao 2 ^a e 4 ^a dia	47
Figura 3.4 - SDS-PAGE para deteção da proteína total, <i>western-blot</i> para deteção de L-PGDS e gráfico relativo à densidade relativa de cada banda do <i>western-blot</i> da curva BY2 BTAH 4 na presença do composto 5-azacitidina 5 μ M	48
Figura 3.5 - Gráficos da curva de crescimento e da produção de proteína total em células BY2 BTAH 4 ao longo de 7 dias com adição do composto a uma concentração de 2,5 μ M ao 2 ^a dia	50
Figura 3.6 - SDS-PAGE para deteção da proteína total, <i>western-blot</i> para deteção de L-PGDS e gráfico relativo à densidade relativa de cada banda do <i>western-blot</i> da curva BY2 BTAH 4 na presença do composto 5-azacitidina 2,5 μ M	51
Figura 3.7 - Gráficos da curva de crescimento e da produção de proteína total em células BY2 BTAH 4 ao longo de 7 dias com adição do composto a uma concentração de 15 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 150 μ M ao 2 ^a dia	53
Figura 3.8 - SDS-PAGE para deteção da proteína total, <i>western-blot</i> para deteção de L-PGDS e gráfico relativo à densidade relativa de cada banda do <i>western-blot</i> da curva BY2 BTAH 4 na presença do composto 5-azacitidina 15 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 150 μ M	54
Figura 3.9 - Gráficos da curva de crescimento e da produção de proteína total em células BY2 BTAH 4 ao longo de 9 dias com adição do composto a uma concentração de 1 μ M com adição diária	56
Figura 3.10 - SDS-PAGE para deteção da proteína total, <i>western-blot</i> para deteção de L-PGDS e gráfico relativo à densidade relativa de cada banda do <i>western-Blot</i> da curva BY2 BTAH 4 na presença do composto 5-azacitidina 1 μ M com adição diária	57
Figura 3.11 - Imunodeteção dos resíduos 5-metilcitosina em núcleos de BY2 BTAH 4 sem tratamento - controlo e com tratamento - ensaio (5-azacitidina)	59
Figura 3.12 - Gel de agarose evidenciando as bandas correspondentes à extração de ADN genómico de BY2 BTAH 4 com adição diária do composto 5-azacitidina 1 μ M	61

- Figura 3.13** - *Dot blot* evidenciando o estado de metilação geral do ADN genómico no controlo e no ensaio nos respetivos dias e coloração da membrana com azul metileno 0,04% 62
- Figura 3.14** - Gel de agarose resultante da amplificação por PCR da sequência parcial do promotor 35SS de BY2 BTAH 4 e sequência do promotor 35SS do plasmídeo pTRA-BTAH convertido 64
- Figura 3.15** - Alinhamento da sequência parcial do promotor 35SS, do controlo e ensaio com 5-azacitidina com conversão por bissulfito 65

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Produtos derivados de <i>molecular farming</i> que se encontram já em utilização ou em fase de testes clínicos com aplicações variadas no campo da saúde	2
Tabela 2.1 - Quantidades de reagentes necessário para a preparação dos géis de concentração e resolução	29
Tabela 2.2 - Concentrações de 5-azacitidina utilizadas em cada ensaio com o respetivo dia da sua adição e número de dias de cada curva de crescimento	31
Tabela 2.3 - Concentrações de 5-azacitidina utilizadas com os respetivos dias a que foram recolhidos os extratos celulares para o estudo da curva de crescimento	32
Tabela 2.4 - Sequência dos <i>primers</i> utilizados para o tratamento com o bissulfito	38
Tabela 2.5 - Concentrações finais a utilizar dos vários reagentes para preparação da <i>Master Mix</i>	40
Tabela 2.6 - Programa utilizado no termociclador Mastercycle Eppendorf para amplificação do promotor 35SS	40

Abreviaturas

5-azaC - 5-azacitidina

5-mC - 5-metilcitosina

APS - Persulfato de Amónia

ARNi - ARN de interferência

BER - Reparação de excisão de base

BSA - Albumina soro de bovino

BTAH - β -trace excretada para o meio de cultura

BY2 - Bright Yellow 2

CaMV 35S - Promotor 35S do Vírus do Mosaico da Couve-flor

CGIs - Ilhas CpG

DAPI - 4',6-Diamidino-2-fenilindol dicloridrato

DCL- Dicer-like

DDSs - Sistema de Administração de Fármacos

DME - gene Demeter

DNMT3L - DNMT3-like

DNMTs - ADN metiltransferases

dsARN - ARNs de cadeia dupla

ECL - Luminol-based Enhanced Chemiluminescent

FDA - Food and Drug Administration

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

GSH - Glutathiona

HATs - Histonas acetilases

HDACs - Histonas desacetilases

H-PGDS - PGDS Hematopoiética

L-PGDS - Prostaglandina D Sintase do tipo Lipocalina

MAR - Matrix Attachment Regions

mARNs - ARN mensageiro

MeCP - Proteína que se liga a CpGs metilados

MFP - Molecular Farming em Plantas

miARN - micro ARN

MSP - PCR específica de metilação

NBT/BCIP - Nitroazul de tetrazólio/5-bromo-4-cloro-3'-indolfosfato

NIB - Tampão de isolamento de núcleos

NT - *Nicotiana tabacum*

P35SS - Promotor constitutivo 35SS

PBS-T - Tampão fosfato salino - Tween 20

PGD₂ - Prostaglandina D₂

PGDS - Prostaglandina D Sintase

PGH₂ - Prostaglandina H₂

rARN - ARN ribossomais

RdDM - Metilação do ADN dependente do ARN

RISC - Complexo de silenciamento induzido por ARN

ROS1 - Repressor de silenciamento 1

SAM - S-adenosilmetionina

SDS-PAGE - Electroforese em gel de poliacrilamida de dodecil-sulfato de sódio

siARNs - Pequenos ARNs de Interferência

SPTG - Silenciamento Pós-Transcricional de Genes

STG - Silenciamento Transcricional de Genes

tARN - ARN transferência

TBE - Tampão Tris/Borato/EDTA

TEMED - Tetrametiletilenodiamina

TP - Proteína Recombinante Total

Ubi-1 - Ubiquitina-1

1. Introdução

1.1. Molecular Farming

O uso de plantas em medicina remonta aos primeiros estádios da civilização, mas a aplicação da engenharia genética em plantas para produzir biofármacos desejados é muito mais recente (Fischer & Emans, 2000; Daniell *et al.*, 2001). À semelhança da evolução de novos organismos biológicos, novas tecnologias podem aparecer numa sucessão rápida, conforme certos avanços técnicos vão sendo alcançados (Horn *et al.*, 2004).

Molecular farming em plantas (MFP) refere-se à produção de proteínas recombinantes (incluindo proteínas farmacêuticas e industriais) e outros metabolitos secundários em plantas. Todo este processo envolve o crescimento, colheita, transporte, armazenamento, processos de extração *downstream* e purificação das proteínas (Obembe *et al.*, 2011). A prática de *molecular farming* existe desde que a primeira planta superior foi transformada com sucesso em 1983 (Fraley *et al.*, 1983), uma vez que qualquer proteína tem o potencial de ser transformada num produto com finalidade farmacêutica ou industrial (Horn *et al.*, 2004).

A primeira proteína recombinante farmacêutica a ser produzida em plantas (hormona de crescimento humana) e o primeiro anticorpo recombinante, foram produzidos em plantas transgênicas em 1986 e 1989, respetivamente (Barta *et al.*, 1986; Hiatt *et al.*, 1989), tendo sido produzido mais tarde em 1990 em plantas transgênicas de tabaco e batata a albumina de soro humana (Sijmons *et al.*, 1990). No entanto, a primeira proteína a ser produzida em plantas com um propósito específico de extração, purificação e comercialização da mesma foi por Hood *et al.*, (1997), que descreveu a produção da avidina, uma proteína do ovo com várias propriedades importantes (Horn *et al.*, 2004). O primeiro produto de *molecular farming* em plantas produzido em larga escala a alcançar o mercado foi a *TrypZean*, um produto de tripsina bovina recombinante derivado do milho (Horn *et al.*, 2004).

Desde 1994, mais de 100 proteínas farmacêuticas foram expressas e caracterizadas em plantas. Até 2011, mais de 20 fármacos produzidos em plantas foram colocados em ensaios pré-clínicos ou clínicos (Yao *et al.*, 2015). Vários produtos já completaram a segunda fase dos ensaios e um dos produtos já foi aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) (Yao *et al.*, 2015).

Vários medicamentos derivados de plantas têm sido comercializados como reagentes de pesquisa e diagnóstico (como a aprotinina derivada do tabaco e a lisozima derivada do arroz pela companhia *Sigma-Aldrich*) (Yao *et al.*, 2015).

O primeiro produto a ser aprovado para uso humano teve a sua aprovação em maio de 2012, a primeira enzima derivada de *molecular farming* em plantas, *ELELYSO™* (taliglucerase alfa da *Protalix BioTherapeutics*) (Yao *et al.*, 2015). Este fármaco é baseado no uso de células de cenoura para produzir taliglucerase alfa recombinante, que é usado na terapia de reposição enzimática para tratar pacientes adultos com a doença de Gaucher (Yao *et al.*, 2015).

O *molecular farming* em plantas tem o potencial para fornecer quantidades praticamente ilimitadas de proteínas recombinantes para o uso como ferramentas terapêuticas e de diagnóstico em cuidados de saúde e nas ciências da vida (Tabela 1.1) (Fischer & Emans, 2000).

Tabela 1.1: Produtos derivados de *molecular farming* que se encontram já em utilização ou em fase de testes clínicos com aplicações variadas no campo da saúde; (adaptado de Yao *et al.*, 2015).

Produto	Hospedeiro	Aplicação	Estado
Taliglucerase alfa; Glucocerebrosidase	Cultura de células de cenoura	Doença de Gaucher	Fase 3 completa (2012); Aprovação FDA (2012)
ZMApp	Tabaco	Vírus de Ébola	Fases 1 e 2 (2015)
PRX-102	Cultura de células de tabaco	Doença de Fabry	Fases 1 e 2 (2014)
Vacina Pfs25 VLP	Tabaco	Malária	Fase 1 (2015)
Vacina Antígeno protetor recombinante	Tabaco	Antraz	Fase 1 (2014)
HAI-05	Tabaco	Vacina H5N1	Fase 1 (2011)
Factor recombinante intrínseco humano	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Deficiência em vitamina B12	Fase 2 completa (2006)
Vacina H5-VLP + GLA-AF	Tabaco	Infeção Influenza A sub-tipo H5N1	Fase 1 completa (2014)
Anticorpo P2G12	Tabaco	HIV	Fase 1 completa (2011)

1.2. Plantas como sistema de produção proteica

A produção de proteínas terapêuticas em plantas provou ser uma alternativa atrativa em relação aos outros sistemas de expressão, tais como os de origem bacteriana, culturas de células de mamíferos, fungos e animais transgênicos (Dirisala *et al.*, 2017).

A expressão em plantas surgiu como uma alternativa promissora e economicamente vantajosa para a produção de proteínas farmacêuticas à escala industrial, uma vez que as proteínas expressas são funcionais, estáveis e quase indistinguíveis dos seus homólogos em mamíferos (Fischer & Emans, 2000; Dirisala *et al.*, 2017).

Sendo eucariotas superiores, as plantas são capazes de sintetizar pequenos péptidos, polipéptidos e proteínas multiméricas complexas, muitas das quais não podem ser produzidas por sistemas microbianos (Ma *et al.*, 2003). Embora as bactérias sejam um sistema de produção económico e conveniente, são incapazes de realizar a maioria das modificações pós-tradução necessárias para a actividade de muitas proteínas de mamíferos, verificando-se igualmente a inabilidade de produzir correctamente complexos de proteínas funcionais (Abranches *et al.*, 2005). No caso dos fungos, estes possuem inúmeras limitações tais como o baixo rendimento, baixa estabilidade do plasmídeo, hiperglicosilação de glicoproteínas recombinantes humanas e secreção ineficiente da proteína (Twyman *et al.*, 2005). Apesar dos sistemas de mamíferos sintetizarem e processarem correctamente os produtos humanos, são muito dispendiosos de manter e as condições da cultura têm de ser reguladas cuidadosamente para evitar contaminações. Estes aspectos negativos levaram à exploração de plantas como uma alternativa económica, segura e eficiente (Abranches *et al.*, 2005; Fischer & Emans, 2000).

Para muitas moléculas, como os anticorpos, a presença de *chaperones* de plantas que são homólogas às das células de mamífero é um factor importante, uma vez que os *chaperones* controlam a eficiência da ligação da proteína e a extensão da degradação da mesma. Além disso, direccionar proteínas recombinantes para a via secretora das plantas assegura a ocorrência de N-glicosilação e outras modificações pós-tradução (Ma *et al.*, 2003).

A principal vantagem das plantas como sistemas de produção deve-se, em primeiro lugar, ao baixo custo de produção. Em segundo lugar, as preocupações com a contaminação com patógenos humanos ou animais ou a co-purificação de patógenos transmitidos pelo sangue e sequências oncogénicas são totalmente evitadas através do uso de plantas. E ainda ao facto de elas terem uma via de síntese de proteínas de eucariotas superiores muito semelhante à das células animais, com apenas pequenas diferenças na glicosilação proteica (Figura 1.1) (Daniell *et al.*, 2001).

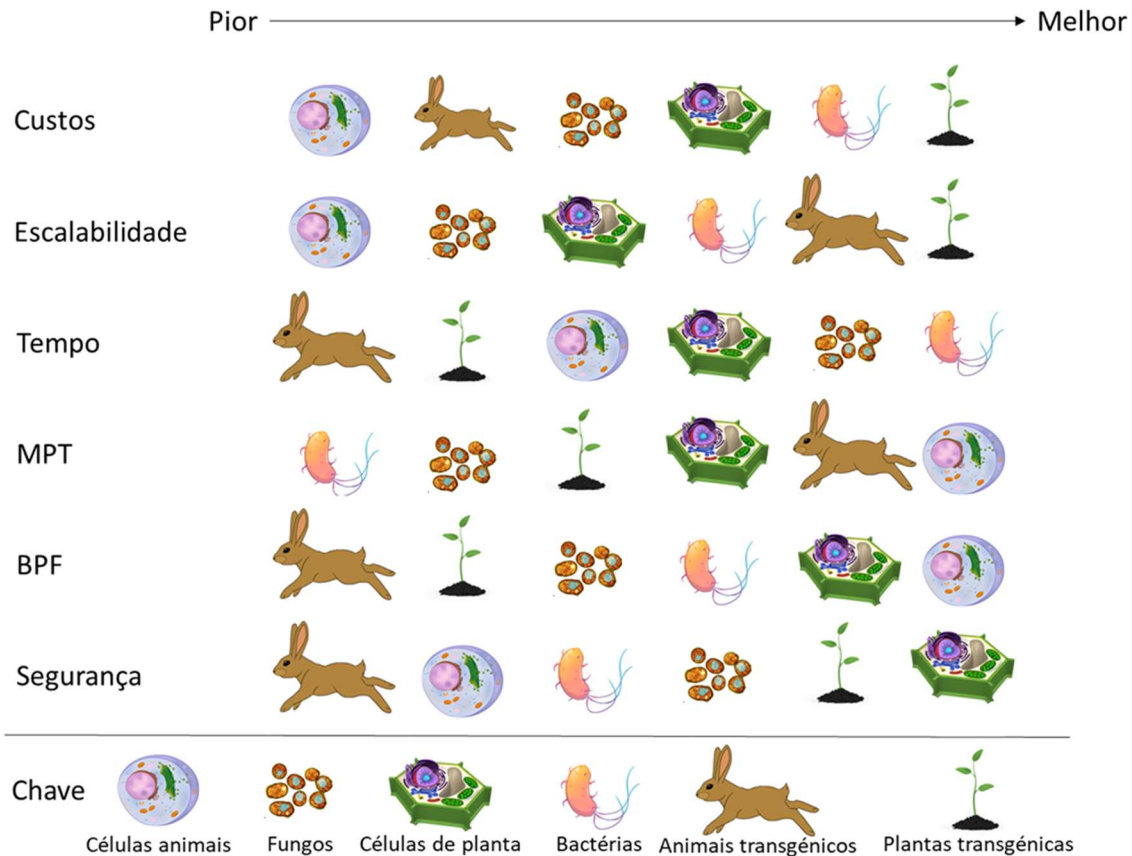


Figura 1.1: Vantagens e limitações dos vários sistemas de produção de proteínas recombinantes. MPT: Modificações pós-tradução; BPF: Boas práticas de fabrico; (adaptado de Twyman *et al.*, 2005).

1.2.1. Sistemas de expressão em plantas

Existem diferentes processos para a expressão de proteínas heterólogas em plantas, as quais podem ser categorizadas pela abordagem usada para gerar o veículo de produção e pelo tipo de tecido no qual a proteína recombinante é produzida: como é o exemplo do *callus*, planta completa ou cultura de células em suspensão sujeitas a transformação nuclear ou *plastid*, com expressão estável ou transiente, como sistema de expressão. A maioria das proteínas terapêuticas derivadas de plantas foram produzidas por transformação nuclear e as proteínas expressas foram isoladas e purificadas a partir de plantas transgênicas regeneradas. A abordagem mais comum e que é aplicável a uma ampla gama de espécies tem sido a utilização de biolística ou utilização de agrobactérias para gerar plantas transformadas de forma estável (Desai *et al.*, 2010; Streatfield, 2007).

A transformação nuclear estável envolve a incorporação de um ou mais genes exógenos de interesse no genoma nuclear da planta, alterando assim a sua composição genética e levando à expressão do transgene após a sua integração no genoma do hospedeiro, conferindo desta forma características

estavelmente hereditárias que não estavam presentes na planta hospedeira não transformada. Como método mais comum, a transformação nuclear estável é responsável pela produção de grande parte das proteínas recombinantes até à data (Obembe *et al.*, 2011). No entanto pode ser um processo demorado, uma vez que o tempo para desenvolver as linhas de plantas a expressar proteínas recombinantes pode levar cerca de 8 a 12 semanas até que as mesmas fiquem disponíveis, sendo que este tempo pode ainda variar entre espécies de plantas (Fischer & Emans, 2000).

Como a transformação nuclear estável é um processo lento, existem outros sistemas de expressão clássicos que permitem a confirmação dos níveis de expressão de vectores e proteínas antes de prosseguir com este processo, como é o caso do sistema de expressão transiente (Fischer & Emans, 2000).

Existem três grandes sistemas de expressão transiente para introduzir o gene nas células da planta: inserção de projéteis revestidos com "ADN puro" por bombardeamento de partículas, infiltração do tecido intacto com agrobactérias recombinantes (agroinfiltração) ou infecção com vetores virais modificados. O nível geral de transformação varia entre esses três sistemas. O bombardeamento de partículas abrange geralmente apenas algumas células e para a transcrição o ADN tem que conseguir alcançar o núcleo celular. A agroinfiltração visa muito mais células do que o bombardeamento de partículas e o T-ADN que contém o gene de interesse é transferido ativamente para o núcleo. Um vetor viral pode infectar sistematicamente a maioria das células numa planta e a transcrição do gene introduzido no ARN viral é alcançado através da replicação viral no citoplasma, a qual gera transitoriamente vários transcritos do gene de interesse (Fischer & Emans, 2000).

1.2.2. Culturas de células vegetais em suspensão

As culturas de células em suspensão são utilizadas para a produção de proteínas recombinantes, uma vez que possuem inúmeras vantagens em *molecular farming* devido ao elevado nível de contenção que oferecem, bem como a possibilidade de produzir proteínas de acordo com as boas práticas de fabrico atual (Obembe *et al.*, 2011).

Mais de 20 proteínas recombinantes diferentes foram já produzidas em culturas de células de plantas, incluindo anticorpos, enzimas, hormonas, fatores de crescimento e citocinas (Hellwig *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2015).

As células vegetais em suspensão são preparadas a partir de tecidos de *callus* friáveis que são colocados em frascos de agitação para formar células únicas e pequenos agregados. O *callus* é um tecido indiferenciado obtido por cultura de explantes em meio sólido contendo uma mistura apropriada de

hormonas vegetais para manter o seu estado indiferenciado. As células são mantidas em meio de cultura líquido contendo as mesmas hormonas, para promover o crescimento rápido e evitar a diferenciação (Figura 1.2) (Hellwig *et al.*, 2004; Shillberg *et al.*, 2013).

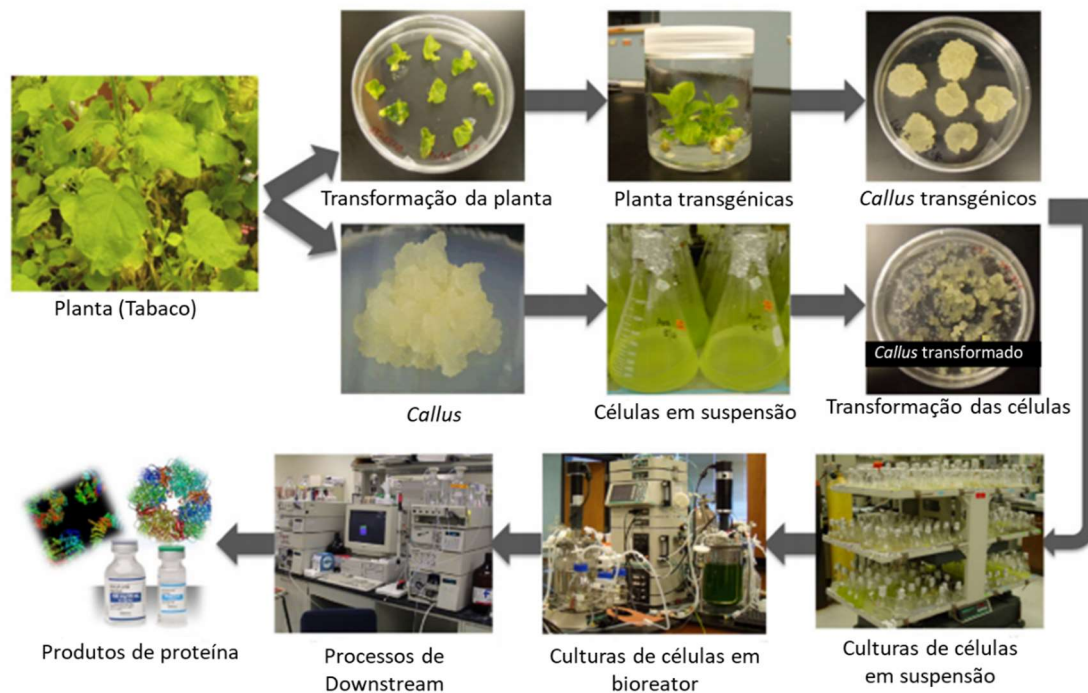


Figura 1.2: Esquema representativo do processo de estabelecimento de culturas de células vegetais em suspensão para a produção de proteínas recombinantes (adaptado de Xu *et al.*, 2011).

As culturas de células de plantas combinam os benefícios dos sistemas da planta inteira com a cultura de células microbianas e animais. Em comparação com as plantas inteiras, as culturas celulares de plantas oferecem maior controlo sobre o ambiente de produção, ciclos de produção mais curtos e, para proteínas que são secretadas pelas células, purificação e processos de *downstream* mais simples e mais baratos, uma vez que apenas requerem nutrientes simples para o seu crescimento (Doran, 2006; Yao *et al.*, 2015; Hellwig *et al.*, 2004).

Tal como acontece com outros sistemas baseados em fermentadores, a escalabilidade das culturas de células de plantas é limitada pela capacidade do biorreator, mas o produto pode ser recuperado a partir do meio, permitindo a produção contínua, ou pode ser direcionado para um compartimento interno específico se isso for mais apropriado (Santos *et al.*, 2016). Esta localização vai depender de dois fatores: (i) a presença de péptido alvo (da planta ou de origem heteróloga) na proteína recombinante e (ii) na permeabilidade da parede celular da planta para macromoléculas (Shillberg *et al.*, 2013).

As células em suspensão mais populares para a produção de proteínas recombinantes são as células de tabaco, uma vez que estas proliferam rapidamente, são fáceis de transformar e não precisam de luz para o seu crescimento, podendo crescer até densidades muito altas. Os principais representantes das células de tabaco são a *Nicotiana tabacum* cv Bright Yellow 2 (BY2) e *Nicotiana tabacum* 1 (NT-1), derivadas de células de meristema de raízes embrionárias (Shillberg *et al.*, 2013; Yao *et al.*, 2015).

1.2.2.1. Culturas celulares Bright Yellow 2 (BY2)

As células de tabaco BY2 foram isoladas pela primeira vez por Kato e colegas (1972), a partir de *callus* de uma planta jovem de *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2 no Instituto Central de Pesquisa do Japão *Tobacco Science Research Laboratory, Inc* (Boehm, 2007; Kato *et al.*, 1972).

Esta linha encontra-se bem caracterizada e pode ser facilmente transformada sem a necessidade de preparação de protoplastos, sendo que facilmente são obtidos *callus* transgênicos estáveis e culturas de células em suspensão. É altamente homogênea e possui uma taxa de crescimento bastante alta, ocorrendo a duplicação a cada 24h em condições ótimas de crescimento, verificando-se ainda a ausência de nicotina na linha celular *Nicotiana tabacum* BY2 (Boehm, 2007; Kato *et al.*, 1972; David & Rechenmann, 2001; Nagata *et al.*, 1992; Shillberg *et al.*, 2013).

Estas características tornam esta linha celular uma ferramenta poderosa para explorar a biologia molecular e celular das células vegetais, uma vez que a informação sobre processos biológicos ainda é muito inferior à de outros eucariotas como células animais e leveduras (Boehm, 2007; David & Rechenmann, 2001; Nagata *et al.*, 1992).

Várias proteínas terapêuticas foram já expressas com sucesso nestas culturas celulares em suspensão, tendo sido feitos também estudos comparativos de expressão. A título de exemplo, o anticorpo para o antígeno carcinoembrionário (CEA) foi produzido nesta linha, tendo a mesma demonstrado maior quantidade de proteína funcional (92%) da proteína recombinante total (TP), em comparação com a *Escherichia coli* (12% TP) e *Pichia pastoris* (40% TP) (Nagata *et al.*, 1992; Boehm, 2007).

1.3. Otimizar a produção de proteínas recombinantes em plantas

Apesar das inúmeras vantagens dos sistemas de produção de proteínas em plantas em relação aos sistemas estabelecidos, existem no entanto algumas limitações que as tornam menos aceitas. O problema do baixo rendimento (que pode dever-se ao baixo nível de transcrição ou à instabilidade da proteína recombinante) e a glicosilação não mamífera são os dois principais desafios que limitam a exploração total de plantas como biorreatores alternativos em relação às culturas de células de mamíferos (Obembe *et al.*, 2011; Doran, 2006).

1.3.1. Otimização da estabilidade do transgene

Existem diversos factores que influenciam a estabilidade de um transgene, e estes levam a uma expressão altamente variável entre populações de plantas originadas da mesma experiência de transferência de genes. Um dos factores mais importantes é o efeito de posição, que reflete a influência do ADN genómico em torno do local onde ocorreu a inserção do transgene (como é o caso da influência de elementos reguladores locais sobre o transgene, integração do transgene numa zona de cromatina repressiva e desencadamento da metilação *de novo* pelo ADN endógeno) (Kohli *et al.*, 2010). Outro factor é a estrutura do *locus*, incluindo o número de cópias do transgene, a sua integridade, e a sua organização relativa, os quais influenciam a probabilidade de interações físicas e subsequente recombinação dentro do *locus* (instabilidade física) e a indução do silenciamento através da metilação do ADN e/ou a produção de espécies aberrantes de ARN do locus (Kohli *et al.*, 2010). Estima-se que a estrutura do *locus* de um transgene possa ter uma grande influência na estabilidade da expressão do mesmo, envolvendo-se em mecanismos de integração do ADN, nomeadamente a interação do transgene com o mecanismo de reparação do ADN da planta e o sistema de defesa do genoma (Twyman *et al.*, 2003).

Para ultrapassar o efeito de posição é benéfica a inclusão de MAR (Matrix attachment regions) em cassetes de expressão. Geralmente as MARs, sequências regulatórias que garantem a colocação do transgene em regiões adequadas para mobilizar factores de transcrição para os promotores, exercem um efeito positivo na expressão do transgene e podem reduzir significativamente o efeito de posição. Adicionalmente, as MARs contribuem para a redução da ocorrência de silenciamento de genes e, consequentemente, para a redução da variabilidade de expressão entre populações (Obembe *et al.*, 2011; Streatfield, 2007; Kohli *et al.*, 2010; Abranches *et al.*, 2005).

1.3.2. Otimização da expressão do transgene

Tanto a transcrição como a tradução podem ser maximizadas tomando precauções contra o silenciamento do transgene, um problema potencial durante a expressão de proteínas heterólogas em plantas, surgindo aparentemente correlacionado com o nível de expressão e o número de cópias do transgene. Ou seja, a presença do transgene em múltiplas cópias ou a sua expressão através de um promotor forte e constitutivo são mais propensos a serem silenciados (Desai *et al.*, 2010). Dois tipos de silenciamento de genes têm sido observados em plantas: silenciamento transcripcional de genes (STG) e silenciamento pós-transcripcional de genes (SPTG). O STG é baseado na inativação do promotor e no aumento da metilação e remodelação da cromatina, sendo que tanto a metilação como o silenciamento têm tendência para ser hereditárias através da meiose, enquanto que o SPTG é uma destruição específica da sequência de transcritos devido à presença de ARN de dupla cadeia homóloga interferente (dsARN), com o efeito do silenciamento a ser reiniciado na meiose (Desai *et al.*, 2010; Twyman *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2003).

1.3.2.1. Otimização da transcrição do gene de interesse

A regulação epigenética e os fenómenos de silenciamento estão relacionados com mudanças na organização do *locus* e, portanto, influenciam a expressão (Kohli *et al.*, 2006).

Sendo a metilação do ADN um marcador epigenético, está geralmente associada a um estado da cromatina fechada e à inibição da expressão de um gene, através da inibição da atividade do promotor. A metilação do ADN contribui para a repressão do gene em duas etapas. Primeiro, as citosinas metiladas inibem a ligação de alguns fatores de transcrição com as suas sequências de reconhecimento, e em segundo, as CpGs metiladas podem afetar os estados de cromatina através do recrutamento de proteínas de ligação a CpGs metilados que modificam a cromatina em volta, afetando a sua estrutura (Siegfried & Simon, 2010). Estas alterações devem ser consideradas quando abordamos um transgene que foi integrado no genoma de um hospedeiro (Kohli *et al.*, 2006).

1.3.3. Humanização de proteínas em plantas

As plantas apresentam vantagem para a produção de proteínas recombinantes devido à sua capacidade de realizar várias modificações pós-tradução, incluindo a glicosilação e adição de lípidos (Obembe *et al.*, 2011; Fischer *et al.*, 2013). A glicosilação é a ligação covalente de carboidratos às proteínas, facilitando o seu *folding*, atividade biológica, solubilidade e biodisponibilidade (Obembe *et al.*, 2011).

Os primeiros passos da glicosilação de proteínas em plantas e mamíferos são idênticos, mas uma vez que o N-glicano se desloque do retículo endoplasmático para o aparelho de Golgi, as diferenças subtis nas estruturas de oligossacarídeos começam a aparecer (Obembe *et al.*, 2011; Fischer *et al.*, 2013; Shillberg *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2016). As diferenças nos padrões de glicosilação entre plantas e animais, devem-se à composição do N-glicano. As plantas adicionam resíduos de α (1,3) fucose e β (1,2) xilose ao N-glicano das suas glicoproteínas, enquanto os mamíferos adicionam resíduos de α (1,6) fucose, glucose e resíduos de ácido siálico ao N-glicano (Obembe *et al.*, 2011; Shillberg *et al.*, 2013).

Os glicanos das plantas são mais um problema em teoria do que na prática, porque há pouca evidência de que a glicosilação das plantas afeta negativamente a atividade de proteínas humanas recombinantes, havendo, no entanto, esforços para humanizar glicoproteínas derivadas de plantas, no caso da presença de glicanos de plantas afetar a meia-vida, a estabilidade e a imunogenicidade do produto em mamíferos (Shillberg *et al.*, 2013). Além disso, foi mesmo possível reconstruir toda a via de glicosilação humana, através da introdução dos processos de sialilação humana e O-glicosilação em *Nicotiana benthamiana* (Castilho *et al.*, 2014).

A maneira mais simples de evitar os resíduos de glicano de plantas é adicionar o motivo tetrapéptido H/KDEL ao terminal C de proteínas farmacêuticas, fazendo com que a proteína seja mantida no retículo endoplasmático, evitando assim a glicosilação específica do aparelho de Golgi. Esta estratégia tem sido utilizada para produzir muitas glicoproteínas recombinantes de alto teor de manose em plantas inteiras e em culturas celulares em suspensão (Shillberg *et al.*, 2013; Twyman *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2016).

Apesar destas diferenças nas estruturas do N-glicano, os anticorpos produzidos em plantas possuem capacidade de ligação ao antígeno semelhante à dos seus homólogos produzidos em células de mamífero (Gomord & Faye, 2004). É agora possível produzir quase todas as proteínas recombinantes em células de plantas com uma estrutura de glicano compatível com os seres humanos (Shillberg *et al.*, 2013).

1.4. Espécies de plantas utilizadas em Molecular Farming

Apesar da comercialização de proteínas recombinantes produzidas em plantas ainda ser um pouco limitada, existem inúmeras espécies diferentes de plantas a serem exploradas como potenciais sistemas de produção. Estes sistemas de produção em plantas podem ser classificados como “culturas de sementes”, como o milho, o arroz, o açafrão, as leguminosas entre outras, e as plantas de “biomassa foliar” como é o caso da alfafa, lentilha da água, tabaco, *Arabidopsis* entre outros. Os dois últimos são geralmente usados como plantas modelo para estudos biológicos em plantas (Gomord & Faye, 2004).

A escolha do hospedeiro adequado para a implementação da tecnologia de *molecular farming* é crucial para o sucesso em geral. Na verdade, esta escolha constitui a primeira linha de estratégia para garantir a eficiência da produção de proteínas recombinantes (Boehm, 2007).

1.4.1. *Nicotiana tabacum* como sistema de expressão

A planta de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) ($2n = 48$), pertencente à família das solanáceas, é uma alotetraplóide natural formada através da hibridização entre dois progenitores diplóides ($2n=24$), *N. sylvestris* e *N. tomentosiformis* há aproximadamente 6 milhões de anos (Granaphati *et al.*, 2004; Goodin *et al.*, 2008). A planta de tabaco demora cerca de três meses a concluir o seu ciclo de vida, e tem sido amplamente estudada, sendo frequentemente usada como hospedeiro para engenharia genética de células em plantas (Granaphati *et al.*, 2004). A facilidade de manipulação *in vitro* e a disponibilidade de muitos stocks genéticos bem caracterizados tornaram esta espécie um sistema modelo de planta de eleição em investigação básica sobre a estrutura e função do genoma (Kenton *et al.*, 1993), sendo que a maioria das descobertas no campo da biologia celular e molecular se deve a experiências com plantas de tabaco (Granaphati *et al.*, 2004).

1.5. Prostaglandina D sintase do tipo lipocalina (L-PGDS)

A prostaglandina D sintase (PGDS) catalisa a isomerização de prostaglandina H₂ (PGH₂), um precursor comum de vários prostanóides, para produzir prostaglandina D₂ (PGD₂) na presença de compostos sulfidrilos, sendo a PGD₂ a prostanóide mais abundante no cérebro (Figura 1.3) (Urade & Hayaishi, 2000; Nakatsuji *et al.*, 2015; White *et al.*, 1997; Qu *et al.*, 2006).

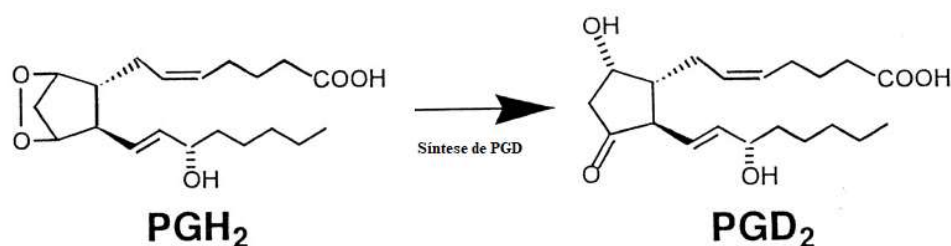


Figura 1.3: Isomerização de PGH₂ a PGD₂ catalisada pela enzima L-PGDS (adaptado de Narumiya *et al.*, 1999).

Existem dois tipos distintos de prostaglandina D sintase: uma é a PGDS do tipo lipocalina (L-PGDS), que era anteriormente conhecida como enzima do tipo cerebral ou enzima dependente de glutathiona (GSH), e a outra é a PGDS hematopoiética (H-PGDS), enzima do tipo baço ou enzima que requer GSH (Urade & Hayaishi, 2000).

As L-PGDS e H-PGDS são bastante diferentes entre si em termos de sequência de aminoácidos, estrutura terciária, origem evolutiva, distribuição celular, etc., embora ambas as enzimas catalisem a mesma reação (Nakatsuji *et al.*, 2015).

A L-PGDS encontra-se localizada no sistema nervoso central, nos órgãos genitais masculinos de vários mamíferos e no coração humano e é secretada para o fluido cérebrospinal (Urade & Hayaishi, 2000). Esta enzima humana foi identificada como β -trace por Clausen em 1961, sendo a principal proteína do líquido cefalorraquidiano em humanos (Urade & Hayaishi, 2000; Nakatsuji *et al.*, 2015; White *et al.*, 1997).

A L-PGDS em mamíferos é uma lipocalina altamente glicosilada com uma massa molecular de 26 kDa e com 2 locais de N-glicosilação (Nakatsuji *et al.*, 2015). Considera-se que está envolvida numa variedade de funções fisiológicas e patológicas (Urade & Hayaishi, 2000).

A L-PGDS demonstrou ser útil como um potencial marcador de diagnóstico em várias doenças neurológicas, na disfunção da formação de espermatozoides, em doenças renais e cardiovasculares e na ativação de mastócitos na asma (Urade & Hayaishi, 2000; Nakatsuji *et al.*, 2015; Matsuoka *et al.*, 2000).

Pensa-se que a L-PGDS tem um papel importante na manutenção do sono, bem como na prevenção do *misfolding* e agregação das placas β -amilóides, funcionando como um *chaperone* na doença de Alzheimer (Kanekiyo *et al.*, 2007; Qu *et al.*, 2006). Mais recentemente foi proposto o uso da L-PGDS como um sistema de administração de fármacos (DDSs), por ser uma molécula não tóxica e não imunogénica (Nakatsuji *et al.*, 2015).

1.6. Processos de Upstream e Downstream na produção de proteínas recombinantes

É prática comum dividir processos biotecnológicos em processos de *upstream* e *downstream* (Doran, 2006), sendo que o papel do processo *upstream* é maximizar o rendimento do produto (aumento dos níveis de expressão) e o papel do processo *downstream* é maximizar a sua qualidade e pureza. Nos sistemas convencionais de fermentação, estas fases funcionam em conjunto (Buyel *et al.*, 2015; Fischer *et al.*, 2004).

As etapas do processo *downstream* dividem-se geralmente em duas categorias principais, recuperação e purificação, embora esta divisão seja um tanto arbitrária e varie entre os diferentes sistemas de produção de proteína (Kusnadi *et al.*, 1997).

Nos casos em que a proteína se acumula dentro das células, são necessárias etapas adicionais para a libertação da mesma, através de rutura mecânica na presença de um tampão de extração apropriado e o extrato purificado por filtração ou centrifugação para remover detritos, fibras e outras partículas, o que aumenta os custos globais do processo de *downstream* (Shillberg *et al.*, 2013; Hellwig *et al.*, 2004). Por conseguinte, a secreção de proteínas recombinantes para o meio de cultura é vantajosa, uma vez que não é necessária a disrupção das células durante a recuperação das proteínas, não havendo a libertação de compostos fenólicos. No entanto, as proteínas recombinantes podem ser instáveis em meio de cultura. Para a sua purificação utilizam-se *tags* de afinidade, sendo esta uma estratégia útil, desde que o *tag* possa ser removido após a purificação, de forma a restaurar a estrutura nativa da proteína. Para recuperar as proteínas em solução podem também utilizar-se processos como a cromatografia e filtração (Fischer *et al.*, 2004; Shillberg *et al.*, 2013; Buyel *et al.*, 2015).

Existe um outro contratempo associado aos processos de *downstream* que é a baixa acumulação de proteínas recombinantes, devido à presença de proteases nas células. Uma das principais funções das proteases nas plantas é degradação de proteínas anormais ou processadas incorretamente. A proteína que é sintetizada na planta, quando não devidamente dobrada ou sintetizada, pode ser degradada por proteases (Desai *et al.*, 2010).

As estratégias utilizadas para promover a acumulação de proteínas e por conseguinte evitar a ação das proteases incluem a expressão específica em organelos, co-expressão com inibidores de protease ou com os seus co-fatores e subunidades (Desai *et al.*, 2010), ou modificação do sistema hospedeiro através do *knockout* de proteases específicas (Mandal *et al.*, 2014).

1.7. Epigenética

A epigenética evoluiu rapidamente na última década para formar um novo e excitante ramo da biologia, tendo o mesmo testemunhado uma explosão recente do nosso conhecimento sobre a importância dos mecanismos epigenéticos que colocam este campo na vanguarda da pesquisa biomédica (Downton & Dickinson, 2005; Vaissière *et al.*, 2008).

O termo epigenética foi introduzido pela primeira vez em 1942 por Conrad Waddington e foi definido como as interações causais entre genes e os seus produtos que permitem a expressão fenotípica. Este termo já foi redefinido e, embora existam muitas variantes da definição deste termo, segundo a definição actual consensual, a epigenética é o estudo das alterações mitóticas e/ou meioticamente hereditárias da expressão genética, que não implicam alteração na sequência de ADN (Tollefsbol, 2011; Gendrel & Colot, 2005).

Os eventos epigenéticos são cruciais no controlo de processos celulares normais e eventos anormais associados ao desenvolvimento do cancro (Vaissière *et al.*, 2008). A função de um gene pode ser modificada de forma estável por componentes epigenéticos que podem silenciar ou ativar porções específicas de ADN, o que indica que a sequência do ADN por si só não contém toda a informação necessária para determinar o fenótipo do organismo (Habu *et al.*, 2001; Downton & Dickinson, 2005). Ao longo dos anos, foram propostas inúmeras funções e mecanismos de regulação epigenética em plantas (Habu *et al.*, 2001).

Os principais mecanismos epigenéticos incluem metilação do ADN, modificações covalentes de histonas pós-tradução e silenciamento de genes mediados por ARN. Diferentes tipos de modificações

epigenéticas estão intimamente ligados e muitas vezes agem de forma auto-reforçada na regulação de diferentes processos celulares. Os mecanismos epigenéticos são essenciais para o desenvolvimento, diferenciação celular, proteção contra genomas virais e parecem ser críticos para a integração de sinais endógenos e ambientais durante a vida de uma célula ou organismo. Por analogia, a desregulação de mecanismos epigenéticos tem sido associada a uma variedade de doenças humanas, principalmente ao cancro. A metilação do ADN e a acetilação de histonas são modificações epigenéticas importantes, que são mais intensamente estudadas no contexto da transcrição genética e eventos anormais que levam ao processo oncogénico. Uma vez que os padrões dessas marcas epigenéticas sejam estabelecidos, são propagados de forma autónoma em várias gerações celulares. A rutura de uma dessas duas marcas epigenéticas inevitavelmente afeta a outra. Por exemplo, a hipermetilação de ilhas CpG nos promotores de genes desencadeia a desacetilação das histonas locais, enquanto que níveis mais baixos de acetilação de histonas (hipoacetilação) parecem sensibilizar a metilação do ADN. Portanto, existe uma comunicação íntima entre a acetilação de histonas e a metilação do ADN (Vaissière *et al.*, 2008; Bird, 2007). O parceiro mais recente e versátil da cromatina que emergiu nos últimos anos é o ARN, que possui muitas formas diferentes, que vão desde ARNs não codificantes longos, envolvidos na inativação do cromossoma X e no *imprinting* genómico em mamíferos, até pequenos ARNs de interferência (siARNs) (Gendrel & Colot, 2005).

1.7.1. Metilação do ADN

Como um marcador epigenético conservado, a metilação do ADN está envolvida em muitos processos biológicos importantes, incluindo a formação de heterocromatina, a defesa contra a proliferação de transposões, o *imprinting* genómico, a regulação da expressão genética endógena e o silenciamento de transgenes (Li *et al.*, 2008; Finnegan *et al.*, 1996; Agius *et al.*, 2006).

A metilação do ADN é a adição covalente de um grupo metilo à posição carbono cinco (C5) em bases de citosina para formar 5-metilcitosina (5-mC) (He *et al.*, 2011; Vaissière *et al.*, 2008). A metilação do ADN ocorre tanto em procariotas como em eucariotas. A metilação do ADN é conservada na maioria dos grupos principais de eucariotas, incluindo plantas e muitos fungos e animais, embora tenha sido perdido em alguns organismos, como o fungo *Saccharomyces cerevisiae* e o nemátode *Caenorhabditis elegans* (Figura 1.4) (He *et al.*, 2011; Suzuki & Bird, 2008).

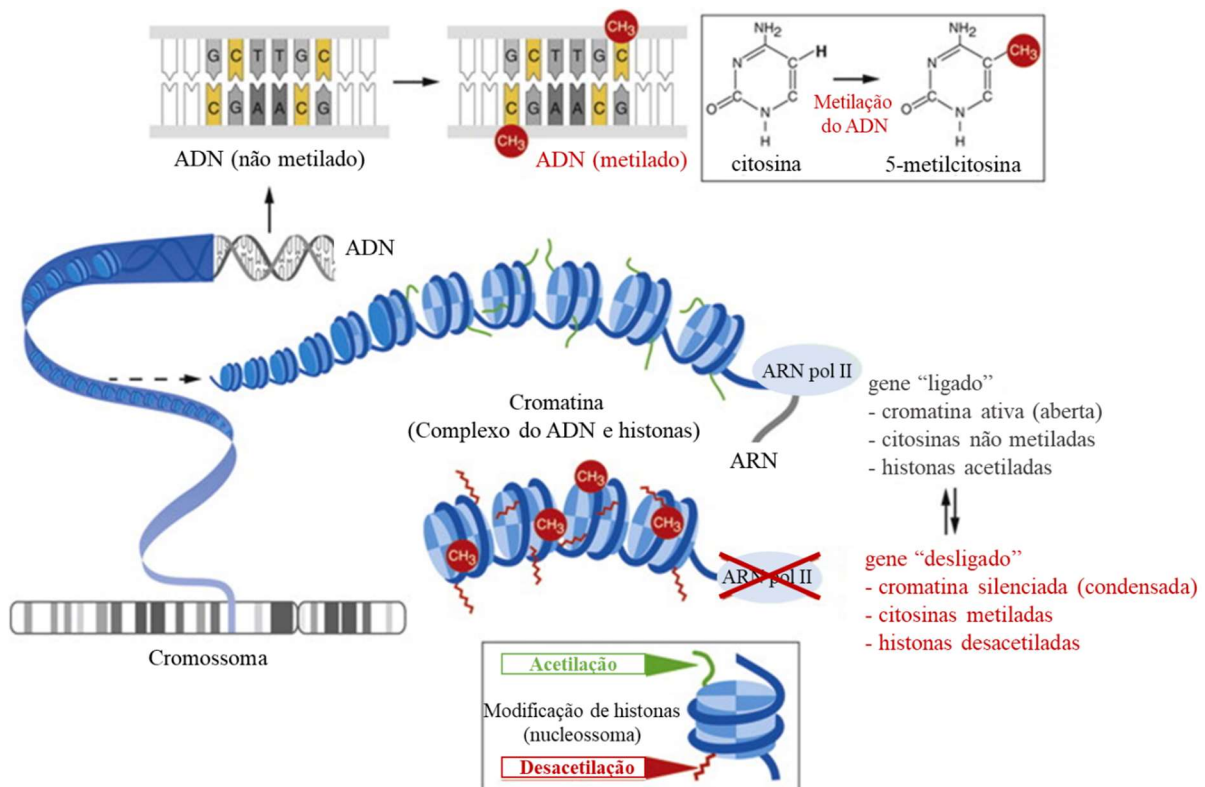


Figura 1.4: Modificações da cromatina mediada pela metilação do ADN e acetilação das histonas. (adaptado de Mukherjee *et al.*, 2015).

A função da metilação do ADN da citosina é manter o estado reprimido da cromatina e, portanto, estabilizar a atividade dos promotores dos genes (Suzuki & Bird, 2008). A metilação dos resíduos de citosina atua como um sistema de defesa contra a atividade transcricional e a mobilidade de elementos repetidos, bem como contra a recombinação entre tais repetições (Gendrel & Colot, 2005; Finnegan *et al.*, 1996).

A questão de como os genomas ditam a escolha das sequências a serem metiladas tem recebido muita atenção ao longo dos últimos 15 anos, seguindo a observação de que os transgenes em plantas e fungos são frequentemente afetados pela metilação do ADN e silenciamento transcricional estável (Gendrel & Colot, 2005).

Os níveis mais elevados de metilação do ADN entre todos os eucariotas foram observados nas plantas, sendo que até 50% das citosinas estavam metiladas em algumas espécies. No milho, por exemplo, níveis tão altos parecem dever-se a um grande número de transposições (Suzuki & Bird, 2008). Nas plantas, a metilação do ADN em resíduos de citosina para 5-metilcitosina (5-mC) é extensa no genoma nuclear. Aproximadamente 80% das citosinas em dinucleótidos CpG são modificadas, e tanto

as plantas como os animais podem conter regiões CG não metiladas relacionadas com genes transcricionalmente ativos (Castilho *et al.*, 1999).

Para investigar o papel da metilação genética, Zilberman e colegas fizeram o mapeamento da metilação do ADN em todo o genoma de *Arabidopsis thaliana* usando *microarrays* revestidos de alta densidade. Como esperado, praticamente todos os transposões são metilados em todo o seu comprimento. Pelo menos 20% dos genes também são metilados (Zilberman *et al.*, 2007). Já Finnegan e colegas fizeram estudos da metilação do ADN no desenvolvimento da planta, tendo sido demonstrado em *A. thaliana* que níveis reduzidos de metilação do ADN exibem uma série de anormalidades, incluindo perda de dominância apical, estatura reduzida, tamanho e forma de folhas alteradas, redução do comprimento da raiz, transformação homeótica de órgãos florais e fertilidade reduzida (Finnegan *et al.*, 1998).

Existem duas maneiras pelas quais a metilação do ADN pode suprimir a transcrição. Uma delas é prevenindo diretamente a ligação de factores de transcrição aos promotores. Vários ativadores de transcrição bem caracterizados são incapazes de interagir com os seus locais de reconhecimento se uma citosina metilada se encontrar presente. Outra maneira pela qual a metilação pode reprimir a transcrição é através de proteínas que se ligam ao ADN metilado. A proteína que se liga a CpGs metilados (MeCP) é uma das que se liga especificamente a sequências de ADN que contêm múltiplos CpG metilados simetricamente (Tate & Bird, 1993).

1.7.1.1. Metilação nas plantas vs metilação nos animais

Apesar das semelhanças nos mecanismos de metilação do ADN, existem importantes diferenças entre a metilação do ADN em animais e plantas (Suzuki & Bird, 2008).

Nas plantas, a metilação do ADN ocorre em bases de citosina em todos os contextos da sequência: os contextos simétricos CG e CpNpG (em que N = A, T ou C) e o contexto assimétrico de CpNpN. Em *Arabidopsis thaliana*, são observados níveis de metilação do ADN do genoma de aproximadamente 24%, 6,7% e 1,7% para os contextos CG, CpNpG e CpNpN, respectivamente. Ao contrário dos mamíferos, a metilação do ADN em plantas ocorre predominantemente em transposões e outros elementos repetitivos do ADN (Law & Jacobsen, 2010; He *et al.*, 2011; Hendrich & Tweedie, 2003).

Nos mamíferos, as citosinas metiladas estão localizadas quase exclusivamente dentro dos dinucleótidos CpG. Além disso, enquanto a metilação do ADN nos mamíferos afeta tanto os genes

quanto as regiões intergênicas, os genes geralmente não estão metilados nas plantas. Essa diferença pode ser explicada pela escassez de elementos transponíveis e outras repetições em intrões nas plantas em comparação com os mamíferos (Gendrel & Colot, 2005; Suzuki & Bird, 2008; He *et al.*, 2011).

Estudos iniciais focados em ilhas CpG (CGIs), definiram as mesmas como regiões curtas (aproximadamente 1 kb), com uma grande densidade de ocorrência de CpG (normalmente a presença destes no genoma seria esparsa). Muitos CGIs estão associados a promotores de genes e a metilação em CGIs está associada à repressão da transcrição (Edgar *et al.*, 2014).

1.7.1.2. ADN metiltransferases

As ADN metiltransferases (DNMTs) catalisam a transferência de um grupo metilo da S-adenosilmetionina (SAM) para a posição 5 do anel de pirimidina de resíduos de citosina em ADN recém-replicado (metilação de manutenção). Mudanças nos padrões de metilação ocorrem por metilação *de novo* ou por desmetilação passiva por falha na manutenção da metilação (Finnegan *et al.*, 1998; Tollefsbol, 2011).

Nas plantas, foram caracterizadas três metiltransferases do ADN: MET1, CMT3 e DRM2. MET1 é responsável pela manutenção da metilação simétrica CpG. CMT3 é uma metiltransferase de ADN específica das plantas que é necessária para a manutenção da metilação do ADN em locais CpNpG. DRM2 é responsável pela metilação do ADN *de novo* em todos os contextos de sequências, sendo o seu papel na metilação CpNpN mais secundário, uma vez que a metilação CpNpN não pode ser mantida e, portanto, deve depender totalmente da metilação *de novo*. A atividade de DRM2 é altamente regulada pela via de metilação do ADN dependente do ARN (RdDM) (He *et al.*, 2011; Law & Jacobsen, 2010; Zemach *et al.*, 2010; Zilberman *et al.*, 2007).

Os mamíferos possuem três metiltransferases de ADN ativas, sendo as mesmas homólogas das plantas: DNMT1, DNMT3A e DNMT3B. DNMT1 mantém a metilação do ADN no ADN hemimetilado após a replicação do ADN durante as divisões celulares, enquanto DNMT3A e DNMT3B são responsáveis pelo estabelecimento da metilação do ADN *de novo*. Um terceiro membro da família DNMT3, *DNMT3-like* (DNMT3L), que não tem atividade catalítica, funciona como um regulador de DNMT3A e DNMT3B. O DNMT2 em mamíferos é uma metiltransferase de tARN (ARN de transferência) em vez de uma metiltransferase de ADN (He *et al.*, 2011).

1.7.1.3. Desmetilação do ADN

Embora, na maioria dos casos, a metilação do ADN seja uma marca epigenética estável, níveis reduzidos de metilação são observados durante o desenvolvimento em plantas e mamíferos (Law & Jacobsen, 2010).

Esta perda de metilação pode ocorrer de forma passiva, ou seja, ocorre automaticamente no ADN recém-sintetizado durante a replicação na ausência de mecanismos de manutenção da metilação funcional (ADN metiltransferases), ou ativamente, pela remoção de citosinas metiladas (Law & Jacobsen, 2010; Agius *et al.*, 2006). A desmetilação activa é conseguida em plantas pela actividade da glicosilase do ADN de 5-metilcitosina, que remove a metilcitosina do ADN deixando a desoxirribose intacta. Este processo ocorre provavelmente em combinação com a via de reparação de excisão de base (BER), e acrescenta um nucleótido de citosina não metilado (Agius *et al.*, 2006). O gene Demeter (DME) e o repressor de silenciamento 1 (ROS1) são membros de uma família de glicosilases do ADN (Law & Jacobsen, 2010).

1.7.1.4. Agentes hipometilantes do ADN

Estudos farmacológicos simples, que utilizam o tratamento com azacitidina ou decitabina, demonstraram causar a ativação de genes silenciosos e a ativação de genes de ARN ribossomais (rARN) (Castilho *et al.*, 1999; Downton & Dickinson, 2005; Issa & Kantarjian, 2009).

A 5-azacitidina (5-azaC) foi sintetizada pela primeira vez em 1964 por Piskala e Sorm, e demonstrou ter uma ampla gama de atividades antimetabólicas quando testada em culturas de células de cancro, bem como ser um agente quimioterapêutico eficiente para a leucemia mielogénica aguda (Christman, 2002).

O tratamento de células vegetais e animais com 5-azaC (um análogo da citosina) resulta na desmetilação do ADN diretamente pela incorporação do análogo no lugar da citosina durante a replicação do ADN, e indiretamente pela inibição da ação das enzimas metiltransferases (desencadeando a degradação das mesmas). A 5-azaC ao ser incorporada no ADN replicante não pode ser metilada, devido à falta de uma valência livre na quinta posição do anel de pirimidina (Figura 1.5) (Tyunin *et al.*, 2012; Razin & Cedar, 1991).

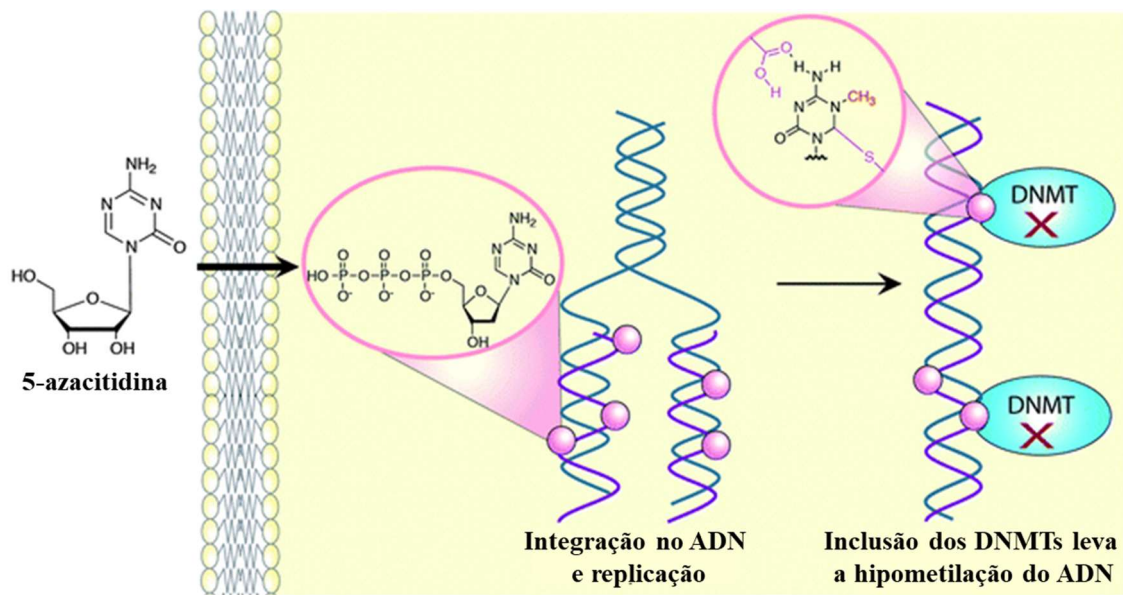


Figura 1.5: Tratamento de 5-azacitidina evidenciando os resultados da desmetilação do ADN com incorporação do análogo no lugar da citosina durante a replicação do ADN e inibição da ação das enzimas metiltransferases; (adaptado de Cherblanc *et al.*, 2013).

A desmetilação do ADN com 5-azaC foi correlacionada com a indução de transcrição em vários genes de plantas e animais (Burn *et al.*, 1993; Chiappinelli *et al.*, 2015). Uma divisão na presença do fármaco é suficiente para fazer com que grande parte do ADN se torne hemimetilado, enquanto que a desmetilação das duas cadeias pode ser observada após a próxima divisão (Razin & Cedar, 1991; Sano *et al.*, 1990).

1.7.1.5. Métodos de mapeamento de padrões globais de metilação do ADN

Actualmente, dispomos de uma grande quantidade de informações acerca de alterações epigenéticas específicas de genes importantes que ocorrem numa miríade de processos biológicos. Existem várias técnicas para determinar a metilação do ADN específica de genes (Tollefsbol, 2011). Estes métodos incluem sequenciação por bissulfito, PCR específica de metilação (MSP) e MSP quantitativo. Além disso, houve grandes avanços nas análises das alterações do genoma em alta resolução. As plataformas de *microarray* e o sequenciamento de alto rendimento possibilitaram novas técnicas para analisar características genómicas de epigenética que se baseiam em usos de enzimas de restrição sensíveis à metilação, combinados com *Southern blotting*, conversão por bissulfito de sódio e

captura de afinidade com anticorpos ou proteínas que selecionam sequências de ADN metiladas (Tollefsbol, 2011; Downton & Dickinson, 2005; Singal & Ginger, 1999).

Um dos desenvolvimentos mais recentes e significativos foi a "sequenciação por bissulfito", que permite a identificação específica do local de citosinas metiladas numa sequência amplificada (Downton & Dickinson, 2005). Este método é atualmente o método de eleição para a análise detalhada de 5-mC em qualquer sequência genómica, uma vez que fornece uma abordagem qualitativa, quantitativa e eficiente para identificar a 5-metilcitosina numa única resolução de par de bases (Figura 1.6) (Li & Tollefsbol, 2011).

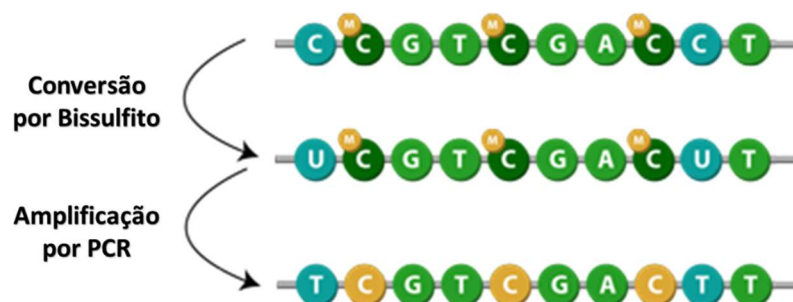


Figura 1.6: Ilustração da reação da conversão por bissulfito, bem como a amplificação por PCR das bases de citosinas metiladas e não metiladas; (adaptado de: https://www.epigentek.com/catalog/ADN-bisulfite-conversion-c-75_21_47.html).

1.7.2. Modificação das histonas

As alterações da cromatina são outro processo epigenético central que tem impacto não apenas na expressão genética, mas também em muitos outros processos biológicos. As modificações pós-tradução de histonas, como a acetilação e a metilação, ocorrem de maneira específica do local, que condiciona a ligação e atividade de outras proteínas que influenciam a regulação de genes (Tollefsbol, 2011; Li *et al.*, 2008). Para lidar com este processo, a acetilação de histonas evoluiu para abrir a estrutura da cromatina e facilitar a acessibilidade da maquinaria transcricional ao modelo de ADN na cromatina. A acetilação das histonas é uma modificação reversível de resíduos específicos nas "caudas" das histonas e é controlada por histona acetilases (HATs) e histona desacetilases (HDACs) que tipicamente atuam como co-ativadores transcricionais e co-repressores, respectivamente (Vaissière *et al.*, 2008).

1.7.3. ARN não codificante (ncARN)

Entre os avanços mais significativos da epigenética foram as descobertas de muitos outros processos, além da metilação do ADN e as modificações das histonas, que afetam o comportamento epigenético das células. Por exemplo, o ARN não codificante geralmente compartilha proteínas e ARNs com a via do ARN interferente (ARNi). Como tal, pode também influenciar aspetos mais tradicionais da epigenética, como a metilação do ADN e a marcação de cromatina (Tollefsbol, 2011).

Nas plantas, a primeira indicação direta de que o ARN desempenha um papel na modificação da cromatina veio da observação da metilação do ADN dependente do ARN (RdDM) na planta do tabaco. Isto foi seguido pela demonstração em *Arabidopsis* de que o RdDM e o silenciamento transcricional estável de genes podem ser induzidos por ARNs de cadeia dupla (dsARNs) que são degradados em pequenos ARNs de interferência (siARNs), sugerindo o envolvimento da maquinaria do ARN interferente (ARNi) no estabelecimento de cromatina silenciosa hereditária (Gendrel & Colot, 2005; Tyunin *et al.*, 2012; Tariq & Paszkowski, 2004).

A maquinaria do ARN interferente (ARNi) é ativado pela presença de ARNs de cadeia dupla (dsARNs) longos (exógeno ao hospedeiro) que são reconhecidos e especificamente clivados por uma enzima ARNse III chamada de Dicer ou *Dicer-like* (DCL), para dar origem a pequenos ARNs de interferência (siARNs) de 21-26 nucleotídeos. Esses pequenos siARNs são então reconhecidos, desenrolados e incorporados como uma cadeia simples de ARN num complexo de proteína, conhecido como RISC (complexo de silenciamento induzido por ARN), onde servem para direcionar, através da complementaridade de sequência, a degradação ou a repressão translacional do ARN mensageiro (mARNs) alvo por proteínas da família Argonauta (Tollefsbol, 2011; Gendrel & Colot, 2005; Plasterk & Ketting, 2000). O mesmo processo acontece para o ARN endógeno que é primeiro transcrito como um ARN longo e depois processado para um pré-miARN (micro ARN) com mais ou menos 70 nucleótidos. Este pré-miARN forma estruturas *hairpin* imperfeitas, que são processadas pela Dicer para produzir um miARN de cadeia simples maduro com aproximadamente 22 nucleótidos, sofrendo o mesmo processo daí em diante que a dsARNs (Figura 1.7) (Doench *et al.*, 2003).

ARN interferente (ARNi)

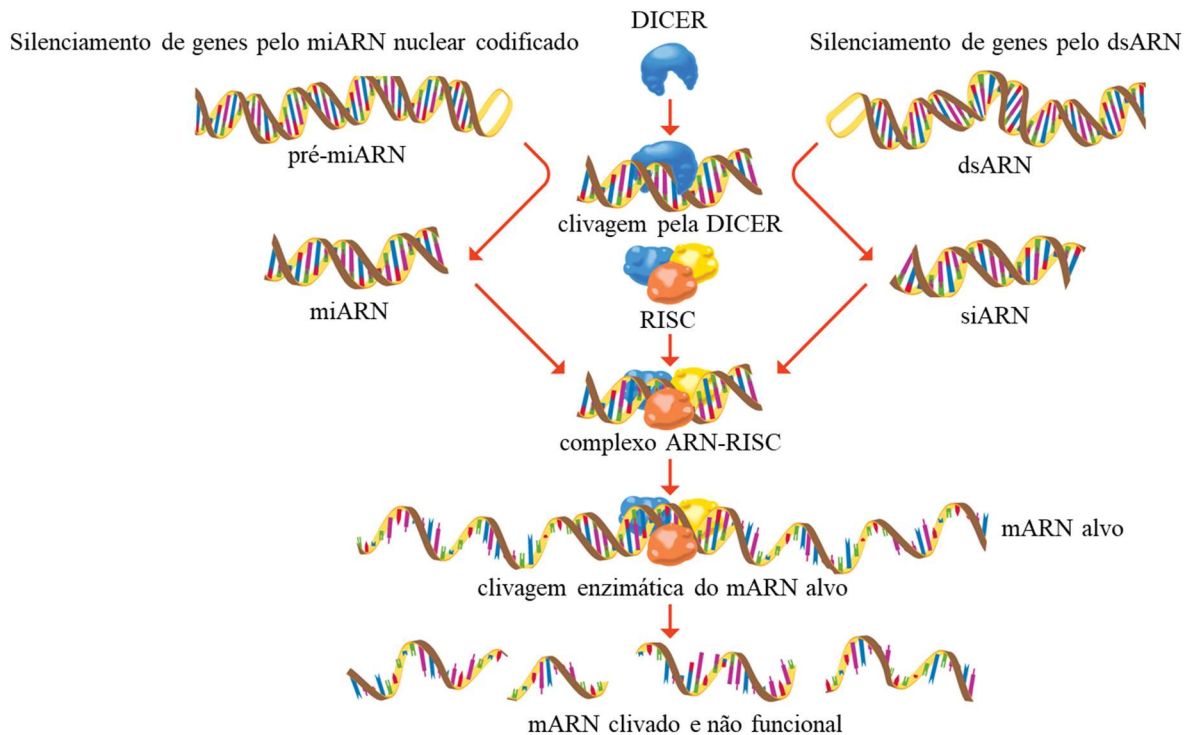


Figura 1.7: Maquinaria do ARN interferente (ARNi) pelo silenciamento de genes endógenos (miARN) e pelo silenciamento de genes exógenos (dsARN) que levam a um produto final de ARN mensageiro não funcional; (adaptado de: <https://www.britannica.com/science/RNA-interference>).

1.8. Objectivos

As culturas de células vegetais em suspensão surgiram como plataforma alternativa viável aos sistemas convencionais, particularmente aos baseados em culturas de células de mamíferos bem estabelecidas, para a produção em larga escala de proteínas recombinantes para aplicação terapêutica. Apesar do sucesso das culturas de plantas em suspensão, existem algumas limitações que precisam de ser ultrapassadas, como é o caso do baixo rendimento do produto recombinante. Várias abordagens têm sido usadas para aumentar a produção, incluindo a otimização do meio ou o uso de vetores de expressão otimizados. Neste projecto, tentou-se aumentar a produção do produto recombinante aumentando os níveis de transcrição do transgene que codifica a proteína de interesse, através de modulação epigenética usando agentes de hipometilação. A proteína de interesse é a Prostaglandina D sintase do tipo lipocalina (L-PGDS), uma proteína recombinante humana, que se julga ter um papel importante na manutenção do sono, bem como na prevenção do *misfolding* e agregação das placas β -amilóides na doença de Alzheimer, tendo também demonstrado ser útil como um potencial marcador de diagnóstico em várias doenças

neuroológicas. Esta proteína foi expressa em laboratório em culturas celulares em suspensão de *Nicotiana tabacum* BY2. A modulação da expressão do transgene foi feita através de mudanças no estado de metilação do ADN usando um fármaco que induz hipometilação, a 5-azacitidina, que é bastante utilizada como tratamento em certos tipos de cancro, inibindo a metilação do ADN, e consequentemente a ativação de genes que se encontram silenciados. Paralelamente, foram estudados os mecanismos pelos quais este composto exerce os seus efeitos, através da compreensão das vias bioquímicas nas quais ele atua.

O projecto foi dividido nas seguintes tarefas: caracterização da linha celular BY2 que expressa a L-PGDS recombinante, o estabelecimento da concentração ótima de 5-azacitidina, a imunodeteção da 5-metilcitosina em núcleos de BY2 na presença ou ausência do composto, o estudo da metilação do ADN total através do método do *Dot-Blot* e por fim, o estudo do estado de metilação do ADN no promotor do transgene na presença do composto, através da conversão por bissulfito.

2. Materiais e Métodos

2.1. Material Vegetal

Neste projeto foram usadas culturas de *Nicotiana tabacum* Bright Yellow 2 (BY2) previamente transformadas em laboratório, usando *Agrobacterium tumefaciens* (estirpe GV3101) com o plasmídeo pTRA-BTAH (Figura 2.1) (Pires *et al.*, 2014). Estas linhas transgênicas de BY2 expressam L-PGDS recombinante na forma secretada (BY2 BTAH). Estas culturas são mantidas em seleção através do uso do antibiótico canamicina.

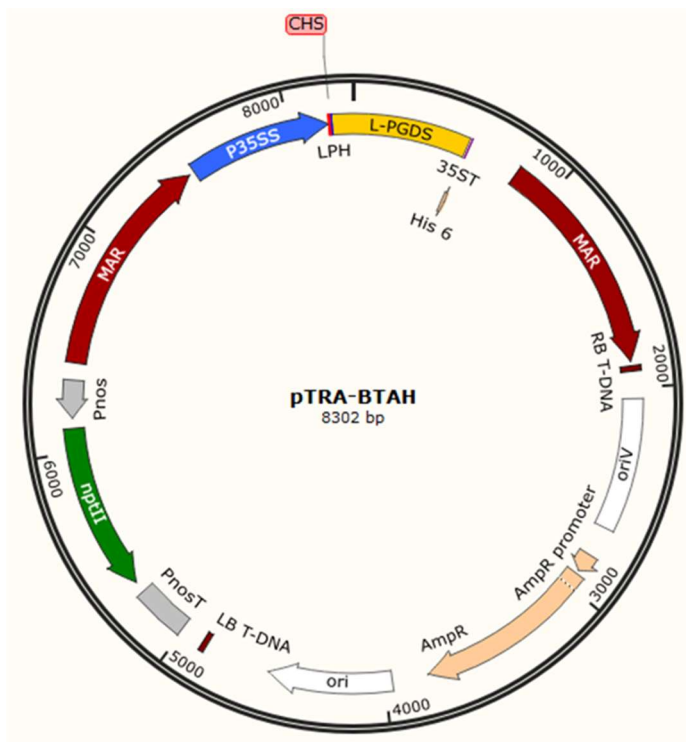


Figura 2.1: Plasmídeo pTRA-BTAH (L-PGDS).

O T-ADN, (Figura 2.2) flanqueado pelas left (LB) e right border (RB), contém o cADN que codifica para a L-PGDS (número de acesso BC005939) e que está sob o controlo do promotor constitutivo 35SS (P35SS), uma versão melhorada do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor. A montante do cADN encontra-se uma região não traduzida e estabilizadora do ARN mensageiro (CHS), bem como um péptido sinal de murino (LPH), que foi otimizado para plantas, para marcar as proteínas

a serem exportadas para o meio extracelular. A jusante do cADN da L-PGDS está um *tag* de fusão em C-terminal de seis resíduos de histidina (His6) que serve para facilitar a purificação da proteína por cromatografia, e a sequência terminadora (35ST). Existem igualmente regiões MAR (Matrix Attachment Regions), que evitam os fenómenos de silenciamento e estabilizam a expressão do gene. No T-ADN está ainda presente a cassette que confere ao plasmídeo resistência à canamicina com o gene *nptII*.



Figura 2.2: T-ADN de L-PGDS na forma secretada.

Das várias linhagens de BY2 BTAH existentes no laboratório, foi utilizada neste estudo a linha número 4 (doravante designada por BY2 BTAH 4), uma vez que a mesma possui convenientemente um crescimento celular mais rápido.

2.2. Manutenção da linha celular BY2 BTAH 4

Toda a manipulação de culturas de células vegetais descrita em seguida foi realizada numa câmara de fluxo laminar (*Bio48, Faster*), preservando todas as condições de esterilidade.

As culturas celulares BY2 (linha BY2 BTAH 4) utilizadas para todos os ensaios seguintes foram repicadas de 10 em 10 dias e mantidas dois *Erlenmeyers* (100ml e de 250ml) com inóculo de 5%. A cada 10 dias, a adição do inóculo foi feita para meio fresco (ver anexos 6.1.1). As culturas foram mantidas num agitador orbital (*Innova 4330 refrigerated incubator shaker, Marshall Scientific*) com rotação de 120rpm a 28°C, no escuro.

2.3. Determinação da curva de crescimento de BY2 BTAH 4

Para a elaboração da curva de crescimento foi necessário preparar um inóculo de 5% de cultura de células para um volume final de 800ml. A adição do inóculo foi feita para meio de BY2 fresco, sendo a solução final repartida por 28 *Erlenmeyers* de 100ml. Posteriormente, 24 dos 28 *Erlenmeyers* foram

colocados num agitador orbital (*Laboshake, Gerhardt*) a uma rotação de 120rpm, numa câmara a 28°C, no escuro. Os restantes 4 *Erlenmeyers* foram utilizados para determinar o peso seco do dia 0, bem como para quantificar tanto a presença de proteína total como da proteína recombinante. A curva de crescimento durou 2 semanas, tendo sido retirados pontos em vários dias da curva. Para este ensaio foram feitos quatro replicados biológicos para cada ponto.

2.3.1. Determinação do peso seco do extrato celular

Em primeiro lugar, foi pesada uma folha de papel de filtro (90mm) para cada replicado de cada dia (ex: A, B, C e D), e registado o respetivo valor. Após esse passo, os replicados foram submetidos a filtração em vácuo, tendo o extrato celular resultante do processo sido colocado dentro de uma caixa de *Petri* aberta, numa estufa (*WTC Binder*) a 60°C durante 48h. O meio filtrado foi guardado a -20°C para posterior análise das quantidades de proteína total e de L-PGDS. Este procedimento foi realizado para cada replicado de cada dia. Ao final de cada 48h de secagem o papel de filtro contendo a amostra do extrato celular foi pesado, e o valor obtido foi registado. Foi retirado o peso do papel ao valor da pesagem final, calculando-se a média dos replicados de cada dia, bem como o desvio padrão, utilizando o software Microsoft Excel 2016.

2.3.2. Quantificação da proteína total solúvel pelo método de Bradford

Este método foi descrito pela primeira vez por Bradford, 1976. Note-se que para este protocolo utilizaram-se as indicações do fabricante do reagente de Bradford da marca *Biorad*.

Na quantificação da proteína total é necessário, em primeiro lugar, estabelecer uma curva padrão com concentrações conhecidas. Neste caso, foi utilizada Albumina Soro de Bovino (*BSA: NZYtech, Portugal*), sendo que as concentrações utilizadas foram as seguintes: 0 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml e 60 µg/ml. Para este método foi utilizada uma placa de 96 poços, e em cada poço, foram colocados 160µl da solução padrão ou de solução da amostra, e a cada uma das soluções adicionou-se 40µl de reagente de Bradford concentrado (*Biorad, EUA*). Foram feitos triplicados técnicos para cada replicado por forma a obter uma maior precisão dos resultados, bem como um branco, que neste caso será o meio de cultura. Deixou-se a incubar pelo menos durante 5 minutos à temperatura ambiente e menos do que uma hora. Posteriormente, mediu-se a absorvância no espectrofotómetro (*Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek*), a 595 nm. Os cálculos foram efetuados em Excel. Foi necessário ainda fazer uma outra curva padrão com outras concentrações (0 µg/ml, 50 µg/ml, 200 µg/ml,

350 µg/ml e 500 µg/ml), uma vez que as absorvâncias a partir do dia 7 excediam os 1000 nm. Para esse efeito, as quantidades de solução padrão e de solução da amostra variam, bem como o reagente de Bradford, sendo que neste caso foram utilizados 10µl das soluções e 200µl de reagente de Bradford diluído em água destilada (1:5).

2.3.3. Perfil da proteína total e deteção da proteína recombinante

Para a deteção da proteína total e da proteína recombinante foi necessário fazer um SDS-PAGE (Electroforese em gel de poliacrilamida de dodecil-sulfato de sódio) e um *western-blot*, respetivamente. As amostras utilizadas para a deteção das proteínas foram escolhidas com base na amostra que continha o menor desvio padrão.

2.3.3.1. Preparação de amostras para SDS-PAGE

As amostras de meio de cultura foram previamente centrifugadas numa centrífuga de bancada (*Centrifuge 5415 D, Eppendorf*) durante 5 minutos a 13.000 rpm. Seguidamente, foi adicionado etanol a 100% (1:5) para precipitação das proteínas a -20°C *overnight*.

No dia seguinte, centrifugaram-se as amostras na centrífuga de bancada durante 10 minutos a 10.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante, deixando o *pellet* secar completamente. Foram pipetados 80µl de tampão de amostra 1x (ver anexos 6.1.2; a amostra é concentrada 5x) para os microtubos com o *pellet* e submetidas as amostras ao vórtex, permitindo a sua dissolução. De seguida, estas foram fervidas a 100°C durante 10 minutos num banho seco digital (*Accublock™ Digital Dry Bath, Labnet*), fazendo-se um *spindown* no final.

Após a conclusão deste passo as amostras foram carregadas no gel de acrilamida SDS-PAGE.

2.3.3.2. Preparação dos géis SDS-PAGE 12,5% acrilamida

Para este ensaio da curva padrão de BY2 BTAH 4 foram preparados 2 géis de acrilamida. Foram preparadas duas soluções, uma de resolução e uma de concentração (ver tabela 2.1), sem adicionar os agentes polimerizantes (TEMED: Tetrametiletilenodiamina da Sigma, EUA e APS: Persulfato de Amónia, ver anexos 6.1.2) à solução de concentração. A solução de resolução foi vertida para dentro do

molde, e deixada polimerizar durante 1 hora. Verteu-se por cima do gel de resolução a solução de concentração já com os agentes polimerizantes, acoplando um pente de 1mm e permitindo nova polimerização. Posteriormente, depositou-se o molde com o gel numa tina de eletroforese vertical (*Mini-Protean Tetra System, BioRad*), enchendo-a com tampão de corrida 1x (ver anexos 6.1.2). Por último, com recurso a uma seringa de 50µl (*Hamilton, Suíça*), retiraram-se 20µl de cada amostra para dentro do respetivo poço, juntamente com 5µl de marcador (*NZYcolour protein marker II: Nzytech, Portugal*), ligando-se os elétrodos à fonte de energia (*Electrophoresis Power Supply – EPS 601, Thermo Fisher Scientific*), e deixando o gel a correr durante duas horas a 60mA e 180V.

Tabela 2.1: Preparação dos géis de concentração e resolução. Nota: os volumes fornecidos em ml são necessários para fazer 5ml da solução de concentração e 10ml da solução de resolução (2 mini-géis).

Solução Stock	Gel de concentração (ml)	Gel de resolução (12,5%) (ml)	Tampão Reservatório (ml)
Água	2,82	3,98	900
Stock de tampão de concentração	1,25	-	-
Stock de tampão de resolução	-	1,25	-
Stock de tampão de corrida	-	-	100
10% SDS	0,05	0,1	-
Acrilamida-bisacrilamida (30:0,8)	0,625	4,2	-
TEMED	0,005	0,005	-
1,5% Persulfato de Amónia	0,25	0,5	-

2.3.3.3. Transferência horizontal semi-seca de proteínas

Após terminar a corrida do gel de acrilamida, um dos géis foi corado com *bluesafe* (*NZYtech, Portugal*) em agitação (*Duomax 1030, Heidolph*), *overnight*. No dia seguinte, o gel foi lavado com água desionizada, durante 30 minutos, de forma a retirar o excesso de corante. A imagem do gel foi registada utilizando o *Gel Doc™ EZ imager, BioRad*.

O segundo gel foi utilizado para transferência semi-seca, utilizando um Trans-blot SD (Figura 2.3) (*Semi-Dry Transfer Cell, BioRad*). Foram colocadas três camadas de papel de filtro embebido em

tampão de transferência (ver anexos 6.1.2), sendo de seguida colocada uma membrana de nitrocelulose com 0,2 μ m de poro (*Amersham™ Protran™, Alemanha*). Colocou-se o gel por cima da membrana tendo o cuidado de verificar se não existiam bolhas. Por último, colocaram-se mais três camadas de papel de filtro e retirou-se o excesso de tampão de transferência, deixando transferir durante 25 minutos a 400mA e 18v.



Figura 2.3: Trans-blot SD Semi-Dry Transfer Cell da BioRad utilizado para a transferência horizontal semi-seca.

2.3.3.4. Quantificação por western-blot da proteína recombinante L-PGDS

Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi colocada num recipiente com uma solução de bloqueio (5% de leite em pó e 3% de BSA em PBS-T (Tampão fosfato salino – Tween 20)) para impedir ligações não específicas da membrana com o anticorpo. A membrana foi incubada em solução de bloqueio durante 1 hora à temperatura ambiente no agitador oscilante. Em seguida, a membrana foi lavada com PBS-T, três vezes, 5 minutos cada. A membrana foi então incubada com o anticorpo primário (*Anti-Prostaglandin D Synthase (Lipocalin): Abcam, Reino Unido – referência ab182141; diluição 1:500 em PBS-T*), durante meia hora no agitador oscilante à temperatura ambiente, e de seguida incubada *overnight* a 4°C sem agitação. No dia seguinte, a membrana foi colocada a incubar no agitador oscilante durante 30 minutos e de seguida procedeu-se às lavagens, três vezes durante 5 minutos cada com PBS-T. Após as lavagens, incubou-se a membrana com o anticorpo secundário (*Goat Anti-Rabbit IgG - Alkaline Phosphatase: Sigma, EUA – referência A3687; 1:4000 em PBS-T*), durante pelo menos duas horas no agitador oscilante à temperatura ambiente, e posteriormente efetuaram-se três

lavagens durante 5 minutos cada com PBS-T. De seguida, preparou-se a solução NBT/BCIP (Nitrozul de tetrazólio/5-bromo-4-cloro-3'-indolfosfato, ver anexos 6.1.2), colocando-se a membrana sobre um vidro limpo, e espalhando a solução por cima da membrana; aguardou-se cerca de 5 minutos (até surgir o sinal; este passo foi feito às escuras uma vez que a solução é fotossensível), passando-se posteriormente por água desionizada para parar a reação.

2.4. Adição de 5-azacitidina a culturas celulares de BY2

Para testar o efeito do composto 5-azacitidina (Sigma, A2385) sobre a metilação na linha celular BY2 BTAH 4 foram utilizadas diferentes concentrações do composto e fez-se variar o dia da adição do composto, bem como o número de adições ao longo da curva de crescimento (as concentrações utilizadas foram escolhidas tendo em conta os resultados obtidos em Klass *et al.*, 1989). O composto foi dissolvido em meio de cultura BY2 e filtrado com recurso a um filtro estéril com um poro de 0,22 μ m na câmara de fluxo, tendo sido armazenado em microtubos de 1,5ml. A solução foi sempre feita no próprio dia da adição sendo o restante armazenado a -20°C (com exceção dos dias de adição sucessiva e na adição a dois dias diferentes nos quais era utilizada a solução já feita congelada, sendo apenas descongelada uma única vez). Na tabela 2.2 encontra-se representado o dia da adição do composto para cada concentração utilizada, bem como o número total de dias da curva de crescimento.

Tabela 2.2: Concentrações de 5-azacitidina utilizadas em cada ensaio com o respetivo dia da sua adição e número de dias de cada curva de crescimento.

<i>Concentrações de 5-azacitidina</i>	<i>Dia da adição do composto</i>	<i>Número total de dias da curva</i>
1 μ M	adição sucessiva (2° até ao 7° dia)	9 dias
2,5 μ M	2° dia	7 dias
5 μ M	2° e 4° dia	7 dias
15 μ M	2° dia	7 dias
50 μ M	2° dia	7 dias
100 μ M	2° dia	7 dias
150 μ M	2° dia	7 dias

2.4.1. Determinação das curvas de crescimento de BY2 BTAH 4 com adição de 5-azacitidina a diferentes concentrações

Para este passo utilizou-se o mesmo método descrito acima no ponto 2.2, sendo que o número de replicados neste estudo foi apenas três. Os pontos foram retirados a dias diferentes, consoante o número de dias da curva e o dia da adição do composto, conforme indicado na tabela 2.3. Para cada curva de crescimento foi feito um controlo (sem adição de 5-azacitidina) e um ensaio (adição de 5-azacitidina).

Tabela 2.3: Concentrações de 5-azacitidina utilizadas com os respetivos dias a que foram recolhidos os extratos celulares para o estudo da curva de crescimento.

	Dia 0	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9
1µM	x	x		x			x		x
2,5µM	x	x	x	x	x		x		
5µM	x	x	x	x	x		x		
15µM	x	x			x		x		
50µM	x	x			x		x		
100µM	x	x			x		x		
150µM	x	x			x		x		

Para a quantificação da proteína recombinante por *western blotting*, a membrana foi incubada com um anticorpo secundário diferente (*Goat Anti-Rabbit IgG - Peroxidase: Sigma, EUA* – referência A0545; 1:200 em PBS-T) durante pelo menos duas horas. Após a incubação seguiram-se três lavagens de 5 minutos cada com PBS-T. Seguidamente, foi feita uma solução de ECL™ (*ECL Western Blotting Detection Reagent, Amersham, Alemanha*) numa proporção 1:1 para um volume final de 800µl para um microtubo de 1,5ml prontamente envolvido em folha de alumínio, uma vez que esta solução é fotossensível. Por fim, colocou-se a membrana dentro de um pedaço de mica, espalhando a solução por cima da membrana de modo a que ficasse uniformemente distribuída, tendo esta sido revelada com recurso ao *ChemiDoc™ XRS+System, BioRad* (Figura 2.4). Utilizou-se o programa *Quantity One®* da Bio-Rad para a revelação e expôs-se a membrana durante 60 segundos, começando a exposição aos 2 segundos até ao máximo de 30 exposições. Por fim, calculou-se a densidade relativa das bandas obtidas

no *western-blot* através do *Image J*, para determinar as diferenças de sinal entre controlo e ensaio. Os cálculos foram feitos posteriormente utilizando o Excel.



Figura 2.4: ChemiDoc™ XRS+System da BioRad utilizado para visualizar as bandas do *western-blot*.

2.5. Observação de células de linha BY2 BTAH 4 por microscopia de fluorescência

Para analisar os efeitos da 5-azacitidina nos níveis de metilação do ADN nos núcleos das células da linha BTAH 4 foi realizado um estudo por microscopia de fluorescência. Para este protocolo utilizaram-se células de um controlo e de um ensaio retiradas ao dia 5, o último com adição sucessiva do composto a 1 μ M.

2.5.1. Obtenção de protoplastos e isolamento de núcleos de BY2

O protocolo da obtenção de protoplastos e isolamento de núcleos foi adaptado de McKeown *et al.*, 2008 tendo sido feitas algumas alterações.

Após filtração das culturas em vácuo, o extrato celular retido no filtro foi lavado com tampão de limpeza (ver anexos 6.1.3), e novamente filtrado. A totalidade do extrato resultante foi colocado num

tubo e incubado com 5ml de solução enzimática (ver anexos 6.1.3), em agitação, durante 45 minutos a 125 rpm, a uma temperatura de 28°C. Após 30 minutos, retiraram-se 10µl da reação para uma lâmina, para observação ao microscópio (*Leica DMRB, Leica Microsystems, Alemanha*) no espectro da luz visível, para certificação da destruição da parede celular e confirmação de presença de protoplastos. O tempo médio para obtenção de protoplastos foi de 45 minutos. Seguidamente, o extrato foi centrifugado numa centrífuga de rotor basculante (*Allegra X-12R, Beckman Coulter*) a 134xg durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 10ml de tampão de flutuação (ver anexos 6.1.3). De seguida, fez-se um gradiente de densidade com Percoll® (*VWR, EUA*): foram adicionados 5ml de Percoll 45% à solução anterior, de seguida 5ml de Percoll 35% e por fim 5ml de Percoll 0% (ver anexos 6.1.3). Centrifugou-se a 134xg durante 5 minutos. No decorrer deste passo os protoplastos deveriam ficar entre a fase 35% e 0% de Percoll. Retiraram-se os protoplastos com uma pipeta de *Pasteur*, colocando-os num novo tubo de 50ml. Posteriormente, ressuspenderam-se em 10ml de tampão de protoplastos (ver anexos 6.1.3) e de seguida foi feita nova centrifugação a 134xg durante 5 minutos. Retirou-se o sobrenadante e voltou-se a ressuspender a amostra em 10ml de tampão de protoplastos, voltando a centrifugar a 134xg durante 5 minutos e no final descartou-se o sobrenadante. De seguida, o *pellet* foi ressuspensionado em 2ml de NIB (tampão de isolamento de núcleos, ver anexos 6.1.3) e as amostras foram colocadas em gelo durante 5 minutos. Após este passo, macerou-se a solução com um homogeneizador *Potter-Elvehjem*, observando ao microscópio se a maioria dos protoplastos teriam libertado os núcleos, repetindo a operação se necessário. De seguida, centrifugou-se a 210xg durante 5 minutos, descartando-se o sobrenadante e ressuspendeu-se em 1ml de NIB. A amostra foi filtrada sucessivamente com quatro filtros com malhas de tamanho diferente, sequencialmente do maior para o menor (150µm, 100µm, 50µm e 30µm). Após a passagem pelos filtros, a amostra foi repartida por várias lâminas, colocando-se 20µl em cada uma e identificando-as individualmente. Foi necessário também marcar as margens da amostra com uma caneta de ponta de diamante. As lâminas foram tratadas previamente com poli-lisina (ver anexos 6.1.3) para promover a aderência dos núcleos à superfície das lâminas. Os núcleos foram fixados em 50µl de paraformaldeído 4% (ver anexos 6.1.3) durante 30 minutos e cobertos com uma lamela de plástico. De seguida, lavaram-se as lâminas num *coplin jar* com PBS 1x (ver anexos 6.1.3). Posteriormente, desidrataram-se as lâminas em 70% de etanol durante 3 minutos, seguido de 100% etanol durante 3 minutos e por fim deixaram-se as lâminas secar ao ar.

2.5.2. Imunodeteção da 5-metilcitosina em núcleos de BY2

O protocolo da imunodeteção da 5-metilcitosina foi adaptado de um protocolo elaborado pelo laboratório do Plant Cell Biology tendo sido feitas algumas alterações.

Utilizando as lâminas anteriores, foi aplicada uma solução de bloqueio (1% de BSA em PBS-T), 200µl por lâmina, durante 20 minutos a temperatura ambiente, e colocou-se sobre as lâminas uma lamela de plástico. De seguida, retirou-se a solução de bloqueio e aplicou-se o anticorpo primário (*Mouse monoclonal [33D3] to 5-Methyl Cytidine: Abcam, Reino Unido* – referência ab10805) numa diluição 1:100 em PBS 1x, colocando 50µl em cada lâmina coberta por uma lamela de plástico, durante 1 hora a 37°C numa câmara húmida (*Thermo Electron Corporation Omnislide Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific*) (Figura 2.5). Posteriormente, lavaram-se as lâminas 2x em PBS-T durante 5 minutos num *coplin jar*. Foi aplicado o anticorpo secundário (*Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H+L): Invitrogen, EUA* – referência A-11001) numa diluição 1:50 em PBS 1x, colocando 50µl em cada lâmina com lamela de plástico e deixou-se a incubar durante 1 hora a 37°C numa câmara húmida. Lavaram-se novamente as lâminas 2x em PBS-T durante 5 minutos cada, foi aplicada uma solução de DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol dicloridrato: Sigma, EUA; concentração 1µg/ml) sobre as lâminas, 10µl em cada e deixadas a incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Após uma lavagem em PBS-T, as lâminas foram montadas com *Vectashield®* (*vector laboratories, EUA*), e uma lamela de vidro (24x60 mm). As lâminas podem ser guardadas a 4°C até observação. As preparações foram observadas com um microscópio vertical de fluorescência (*Leica DM6000 B, Leica Microsystems, Alemanha*) utilizando o software *MetaMorph®* (*Molecular Devices, EUA*). As imagens foram adquiridas utilizando uma camera *Andor™ iXon^{EM+}* ao longo do eixo dos Z. Foi utilizado o filtro do DAPI para visualização do ADN e o filtro FITC (fluoresceína) para imunodeteção dos locais de 5-metilcitosina. O processamento de imagem foi feito posteriormente por *Photoshop (Adobe® Photoshop® CS6)*.



Figura 2.5: Thermo Electron Corporation Omnislide Thermal Cycler da Thermo Fisher Scientific, usada para incubar as lâminas com o anticorpo.

2.6. Extração e determinação do estado de metilação do ADN total de BY2 BTAH 4

Para este procedimento, o extrato celular foi recolhido por filtração, ao quarto, sétimo e nono dia, tanto para o ensaio como para o controlo, e guardado em tubos de 15ml a -20°C . A extração do ADN genómico foi feita utilizando o kit *NZY Plant/Fungi gDNA Isolation* da Nzytech, Portugal, seguindo-se as instruções do fabricante. O ADN genómico obtido foi quantificado utilizando um espectrofotómetro (*NanodropTM 2000c, Thermo Specific*). Foi também visualizado em gel de agarose 0.8% (ver anexos 6.1.5), ao qual foram adicionados $0,375\mu\text{l}$ de *green safe* (*Nzytech, Portugal*), para verificação da sua integridade. Após a solidificação do gel, colocou-se o molde numa tina de eletroforese horizontal (*Mini-Sub Cell GT, BioRad*) (Figura 2.6) com TBE 0,5% (Tampão Tris/Borato/EDTA, ver anexos 6.1.5), sendo adicionados $8\mu\text{l}$ de água estéril, $1\mu\text{l}$ de *Orange G* (ver anexos 6.1.5), $1\mu\text{l}$ de ADN a um conjunto de poços e $5\mu\text{l}$ de marcador a outro (*NZYcolour protein marker III: Nzytech, Portugal*). Ligaram-se os elétrodos à fonte de energia (*PowerPacTM Basic Power Supply, BioRad*), deixando o gel a correr durante 30 minutos a 100V e 400mA, processo após o qual o gel foi revelado num GeldockTM XR+System, BioRad.



Figura 2.6: Tina de eletroforese horizontal Mini-Sub Cell GT da BioRad para corrida géis de agarose.

2.6.1. Determinação do grau de metilação do genoma total através do método do Dot blot

O protocolo para o método do *Dot blot* foi adaptado de Nettersheim *et al.*, 2013.

O ADN genómico extraído no passo anterior foi utilizado para o *Dot blot*, sendo necessário diluir as amostras com água estéril para uma concentração de 180ng e 50ng em 3µl, para comparação entre uma concentração considerada optima por trabalhos semelhantes e uma concentração reduzida. De seguida, recortou-se uma membrana de nylon (*Amersham Hybond-N⁺: GE Healthcare, Reino Unido*) (5,5cm x 4cm), na qual foi feita uma grelha de 0,7cm x 1cm, com indicação de concentração e nome de cada amostra. O ADN genómico foi colocado na membrana, utilizando uma micropipeta e deixando secar durante 15 minutos. A membrana foi colocada numa caixa de *Petri* de vidro e bloqueada com 5% de leite em pó e 3% de BSA em PBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente, num agitador oscilante. Após o bloqueio, a membrana foi lavada 3x durante 5 minutos com PBS-T a temperatura ambiente. De seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário (*Mouse monoclonal [33D3] to 5-Methyl Cytidine: Abcam, Reino Unido*; diluição 1:2000 em PBS-T) *overnight* numa câmara a 4°C num agitador oscilante. No dia seguinte, a membrana foi lavada 3x durante 5 minutos com PBS-T à temperatura ambiente, e seguidamente incubada com o anticorpo secundário (*goat anti-mouse IgG-HRP: Santa Cruz, EUA – referência sc-2005*; diluição 1:5000 em PBS-T) durante pelo menos duas horas à temperatura ambiente. A membrana foi novamente lavada 3x durante 5 minutos com PBS-T à temperatura ambiente. De seguida, foi feita uma solução de ECL tal como indicado anteriormente (ponto 2.3.1.) e revelada no *ChemiDocTM XRS+System, BioRad*. A revelação foi feita utilizando o Software Quantity One® (*BioRad*) com exposição de 150 segundos, começando a exposição aos 5 segundos e atribuindo como número total de exposições 75. A membrana foi novamente lavada 3 vezes durante 5 minutos cada com PBS-T a temperatura ambiente. Por fim, corou-se a membrana com azul de metileno (ver anexos 6.1.6), para confirmação de quantidades homogéneas de amostra, durante 45 minutos num agitador oscilante. De seguida, a membrana foi lavada com água destilada durante aproximadamente 1 hora no agitador oscilante, com renovação de água a cada 10 minutos até a membrana ficar com uma coloração azul clara e o local das amostras com uma zona azul mais escura.

2.7. Determinação do estado de metilação do promotor 35SS

Para o estudo do estado da metilação do promotor 35SS de BY2 foi utilizada a conversão por bissulfito. Para isso, utilizou-se o kit *EZ DNA Methylation-Direct™* (Zymo Research, EUA) seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. Neste processo, foi utilizado ADN genómico previamente extraído do extrato celular, tal como foi feito para o estudo da metilação do ADN total. Na conversão do bissulfito as citosinas não metiladas do ADN genómico serão convertidas a uracilos, passando a cadeia dupla de ADN a ser cadeia simples. Depois da conversão é necessário usar *primers* específicos para a nova sequência de ADN, uma vez que a mesma sofreu alterações nas bases de citosina não metiladas. No desenho destes *primers*, assume-se que as ilhas CpGs se encontram metiladas, tendo sido utilizado o software *MethPrimer* (Li LC and Dahiya R. *MethPrimer: designing primers for methylation PCRs*).

Os *primers* criados pelo programa *MethPrimer* foram os seguintes:

Tabela 2.4: Informação sobre os primers utilizados para o tratamento com o bissulfito.

<i>Primers</i>	<i>Sequência do primer</i>	<i>Número de bp</i>	<i>% de CG</i>
<i>Forward</i>	AAGATGGTTTTTATAAATGTTATTATTG	28	18
<i>Reverse</i>	ATAACCCTCTAATCTTCTAAAACCTATATCT	30	27

Na figura seguinte estão indicados os locais onde os *primers* se devem ligar ao promotor 35SS do plasmídeo pTRA-BTAH. O *primer forward* vai ligar-se duplamente ao promotor 35SS, uma vez que o mesmo é duplo, ou seja, metade da sequência do promotor é praticamente idêntica. Já no caso do *primer reverse* não se observa o mesmo, uma vez que existe uma sequência de nucleótidos diferentes. O facto de haver uma dupla ligação do *primer forward*, não irá interferir uma vez que o *primer forward* (x) se encontra fora da zona de amplificação (Figura 2.7).

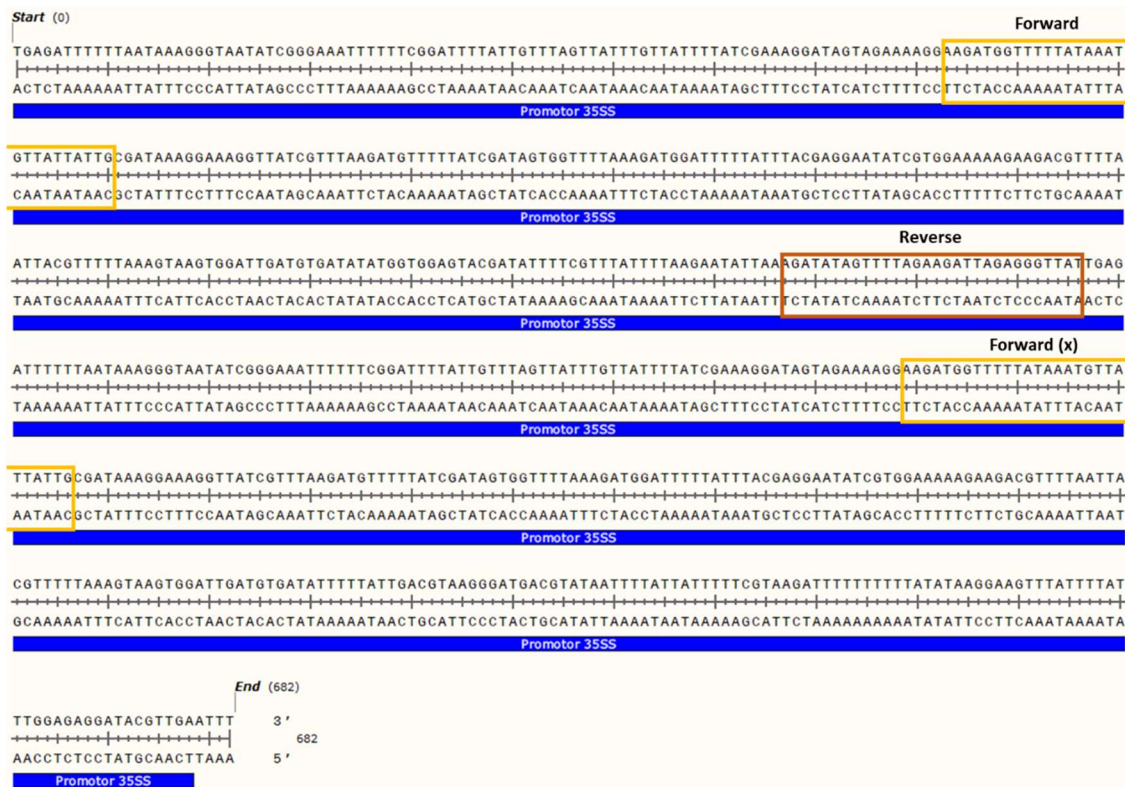


Figura 2.7: Sequência do promotor 35SS do plasmídeo pTRA-BTAH convertido a evidenciar a localização de ligação do par de *primers*.

2.7.1. Amplificação por PCR

Após a obtenção dos *primers* procedeu-se à amplificação da sequência de interesse no promotor 35SS. Para tal, foi necessário fazer um total de 2 reações para este estudo, uma com o controlo com os *primers forward* e *reverse*, outra com o ensaio 5-azacitidina com os *primers forward* e *reverse*. Os dias do ensaio e controlo utilizados para este estudo correspondem ao dia 9 da curva de crescimento.

Na tabela 2.5 está indicada a composição da *master mix* para cada uma destas 2 reações:

Tabela 2.5: Componentes necessários para uma reação de PCR para amplificação do promotor 35SS.

<i>PCR Master Mix</i>	Concentração Final
<i>10 x maxima Hot Start Taq Buffer</i>	2,5 mM
<i>dNTPs</i>	0,2 mM
<i>Primer Forward</i>	0,5 μM
<i>Primer Reverse</i>	0,5 μM
<i>MgCl₂ (Cloreto de Magnésio)</i>	2 mM
<i>DNA Template</i>	180 ng/μl
<i>Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase</i>	1,25 U
<i>Água estéril</i>	Perfazer para 50μl

Nesta reação de PCR foi utilizada a enzima Taq polimerase maxima hot start (*Thermofisher Scientific, EUA*) uma vez que esta evita amplificações não específicas do ADN, encontrando-se inactiva a baixas temperaturas. A reação de PCR foi realizada num *Mastercycler®*, (*Eppendorf*), utilizando os seguintes parâmetros (Tabela 2.6):

Tabela 2.6: Programa utilizado para amplificação por PCR

Passos do PCR	Temperatura (°C)	Tempo	Número de Ciclos
Desnaturação Inicial/Ativação enzimática	95	4 minutos	1
Desnaturação	95	1 minuto	40
Annealing	51	1 minuto	
Extensão	72	30 segundos	
Extensão Final	72	10 minutos	1
“Hold”	4	indefinido	1

Foi necessário correr 25µl de cada amostra num gel de agarose 0,8%, utilizando-se para o efeito o mesmo processo que havia sido utilizado para a visualização da extração do ADN genómico. Depois de confirmada a presença das bandas no gel, foi necessário excisar as mesmas com a ajuda de um bisturi, colocando a banda extraída num microtubo de 1,5ml. Este processo foi feito num *GeldockTM XR+System*, *BioRad*, com recurso a luz ultravioleta. Posteriormente, utilizou-se o kit NZY Gelpure (*Nzytech, Portugal*) para purificar o ADN do gel de agarose bem como o restante produto de PCR, seguindo as instruções do fornecedor, guardando-se o ADN a -20°C. Uma vez efetuada a leitura do ADN purificado no Nanodrop, verificou-se que a quantidade ADN era baixa, sendo necessário fazer uma nova amplificação por PCR, correndo posteriormente apenas 2µl para verificar a presença das bandas no gel. Depois de confirmada a presença das mesmas, efetuou-se a purificação do restante produto de PCR com o kit NZY Gelpure, guardando-se o ADN a -20°C, tendo por último sido quantificado o ADN de cada amostra no Nanodrop.

2.7.2. Sequenciação das amostras de PCR

Depois de obtido o ADN purificado, as amostras obtidas foram enviadas para sequenciação (*StabVida*, Portugal). O resultado da sequenciação foi analisado, procedendo-se ao alinhamento das amostras com o auxílio do software Unipro UGene (<http://ugene.net/>), que permitiu averiguar se existem ou não diferenças nos níveis de metilação no promotor 35SS do controlo e do ensaio.

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização da linha celular BY2 BTAH 4

Como primeira tarefa, foi necessário caracterizar a linha de tabaco BY2 BTAH 4 de forma a avaliar o seu crescimento celular ao longo da curva de crescimento, bem como a quantidade de proteína total solúvel que é secretada para o meio de cultura durante esse período temporal. Seguiram-se, consequentemente, estudos complementares para averiguar em concreto qual a variação da quantidade da proteína de interesse (L-PGDS) ao longo da curva de crescimento destas células.

3.1.1. Determinação da curva de crescimento e quantificação da proteína total solúvel

Como descrito anteriormente, no ponto 2.2 dos Materiais e Métodos, avaliou-se o crescimento celular desta linha ao longo de 2 semanas através de pesagens do extrato celular (mg/ml de cultura), quantificando-se ainda os valores de proteína total solúvel secretada para o meio de cultura ($\mu\text{g/ml}$), através do método de Bradford.

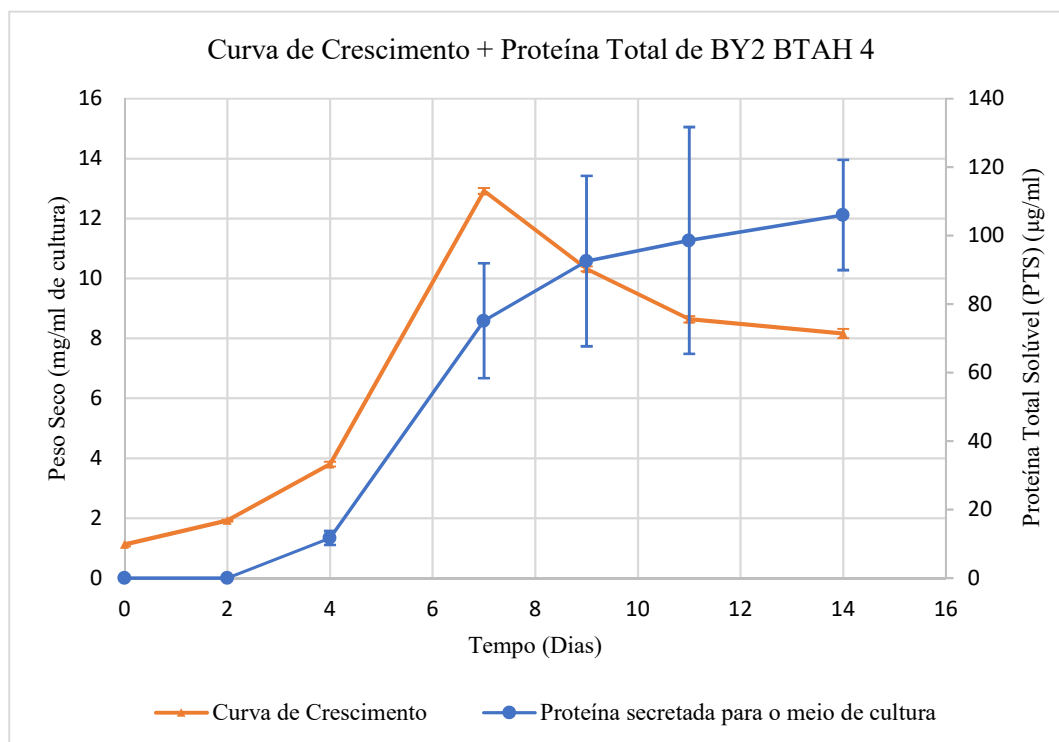


Figura 3.1: Gráfico correspondente à curva de crescimento das células BY2 BTAH 4, bem como à produção de proteína total ao longo de 14 dias, com medições de 2 em 2 dias. As barras a laranja e a azul correspondem à média dos desvios padrões dos três replicados biológicos de cada dia.

Analisando a figura 3.1, a curva a laranja corresponde à curva de crescimento desta linhagem de células, com uma aparente adaptação ao meio de cultura por parte das células, observável pelos dados do dia 0 até ao dia 4, devida à necessidade das mesmas de sintetizar compostos essenciais para o seu crescimento. A este período inicial dá-se o nome de fase de latência. Do dia 4 ao dia 7, as células entram na fase exponencial, ou seja, a sua taxa de crescimento aumenta, estando as mesmas a sofrer sucessivas divisões, duplicando o seu número durante esse intervalo de tempo. Durante esse período existem nutrientes em excesso para que as mesmas se possam dividir. Do dia 7 ao dia 8, apesar de não ser visível, uma vez que não foram efetuadas medições nesse intervalo de tempo, existe uma fase estacionária. Essa fase corresponde a um esgotamento de nutrientes essenciais para a manutenção das células, o que faz com que as mesmas deixem de se dividir. A partir do dia 8 até ao dia 14, observa-se um decréscimo progressivo de peso seco ao longo dos dias, traduzido numa redução da concentração de células viáveis. O aumento de metabolitos tóxicos para as células, bem como a escassez de nutrientes no meio de cultura e o aumento da densidade celular, serão possíveis contribuições para essa mesma diminuição neste período. Outra explicação para esta observação será possivelmente a ocorrência de lise celular de células mortas, as quais, secretando as proteínas que de outra forma não seriam transportadas para o meio, reduzem o seu peso (e consequentemente a variável peso seco), contribuindo, desta forma, para o aumento da proteína total no meio. Pode ainda inclusivamente verificar-se a presença de algumas células viáveis. Procedendo-se à análise da curva a azul, que corresponde à quantidade de proteína total solúvel presente no meio de cultura, observa-se que esta acompanha paralelamente a curva de crescimento até ao dia 7, sendo que a partir desse dia a acumulação da proteína total no meio de cultura vai aumentando mais lentamente, uma vez que deixou de haver divisão celular. Esta continua a aumentar ao longo do tempo, dos dias 7 a 14. Os desvios padrão da proteína são bastante elevados a partir do dia 4, uma vez que quando feita a medição da quantidade de proteína solúvel no meio pelo método de Bradford, a existência de proteínas precipitadas no meio fez com que os triplicados de cada dia divergissem bastante. As amostras deveriam ter sido centrifugadas antes de cada medição, sendo que o valor apresentado no gráfico não corresponde apenas à proteína solúvel, uma vez que a proteína que se encontra precipitada não está dissolvida no meio (insolúvel).

3.1.2. Perfil da proteína total por SDS-PAGE e detecção da proteína recombinante por western-blot

Depois de caracterizada a curva de crescimento e a quantidade de proteína solúvel presente no meio de cultura desta linhagem de células, prosseguiu-se com a detecção da proteína total por *SDS-PAGE*, bem como da proteína recombinante de interesse por *western-blot*.

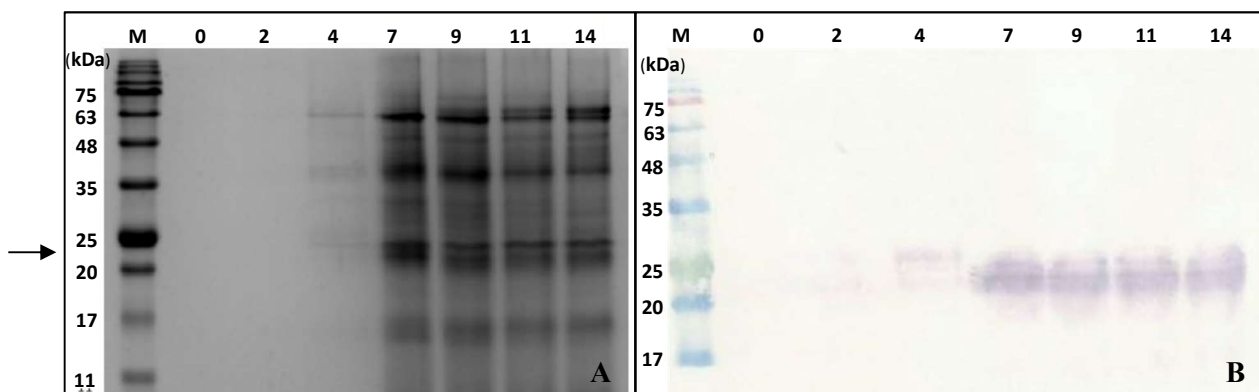


Figura 3.2: *SDS-PAGE* (A) e *western-blot* (B) para detecção da proteína total e de L-PGDS, respetivamente. M corresponde ao marcador molecular (*NZYcolour protein marker II*) e os números de 0 a 14 correspondem aos dias de recolha de meio de cultura, tendo cada amostra sido concentrada 5x.

Por análise do resultado obtido por *SDS-PAGE* (Figura 3.2 A), observamos que existe um aumento da quantidade de proteína total no meio de cultura a partir do dia 4 até ao dia 14, registando-se uma maior acumulação de proteína total no meio a partir do dia 7, com as bandas a surgirem mais intensas, sendo visível a banda correspondente à L-PGDS (26 kDa - como podemos ver representado pela seta a preto na figura 3.2 A). Podemos assim comparar este *SDS-PAGE* com a curva da quantidade de proteína solúvel apresentada na figura 3.1, e afirmar que a quantidade de proteína total vai aumentando ao longo do tempo.

Analisando por último o *western-blot* (Figura 3.2 B) correspondente à proteína recombinante, observa-se que existe uma maior acumulação da proteína no dia 7, sendo que a partir desse dia houve uma ligeira degradação da mesma, denunciada por um sinal não tão forte, que se mantém igual no dia 9, 11 e 14. Nos dias 0 e 2 não observamos presença da proteína. Contudo, no dia 4 é observável que a banda se localiza ligeiramente acima das outras, o que leva a crer que poderão ter ocorrido diferentes modificações pós-tradução na proteína.

3.2. Determinação da concentração ótima de 5-azacitidina

Como primeira abordagem, foi essencial pesquisar acerca das concentrações de 5-azacitidina que deveríamos utilizar em culturas em suspensão de BY2, uma vez que as concentrações variam consoante o tipo de material biológico em questão (a título de exemplo, para folhas e sementes são usadas concentrações mais elevadas deste composto). Depois de feita a pesquisa, testaram-se as concentrações 1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 15 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 150 μ M para determinar a partir de que concentração o composto é tóxico para as células, bem como o ponto no qual observamos diferenças na quantidade de proteína. Houve uma variação tanto nos dias de adição de composto como na periodicidade desta adição.

3.2.1. Adição de 5-azacitidina 5 μ M em culturas de BY2 BTAH 4

O composto foi inicialmente testado a uma concentração de 5 μ M, considerada nem muito elevada nem muito reduzida, tendo esta concentração já sido testada por Klaas *et al.* (1989), em culturas celulares em suspensão de tabaco, registando-se alteração nos níveis de metilação do ADN. Testou-se ainda a adição do composto a diferentes dias, sendo o estudo prolongado apenas até ao dia 7, uma vez que a partir desse dia as células entram em fase estacionária.

3.2.1.1. Determinação da curva de crescimento e quantificação da proteína total solúvel para a concentração de 5 μ M

Para a determinação da curva de crescimento e quantificação da proteína total solúvel na presença do composto, foi utilizado o mesmo procedimento que para a caracterização da linha celular BY2 BTAH 4.

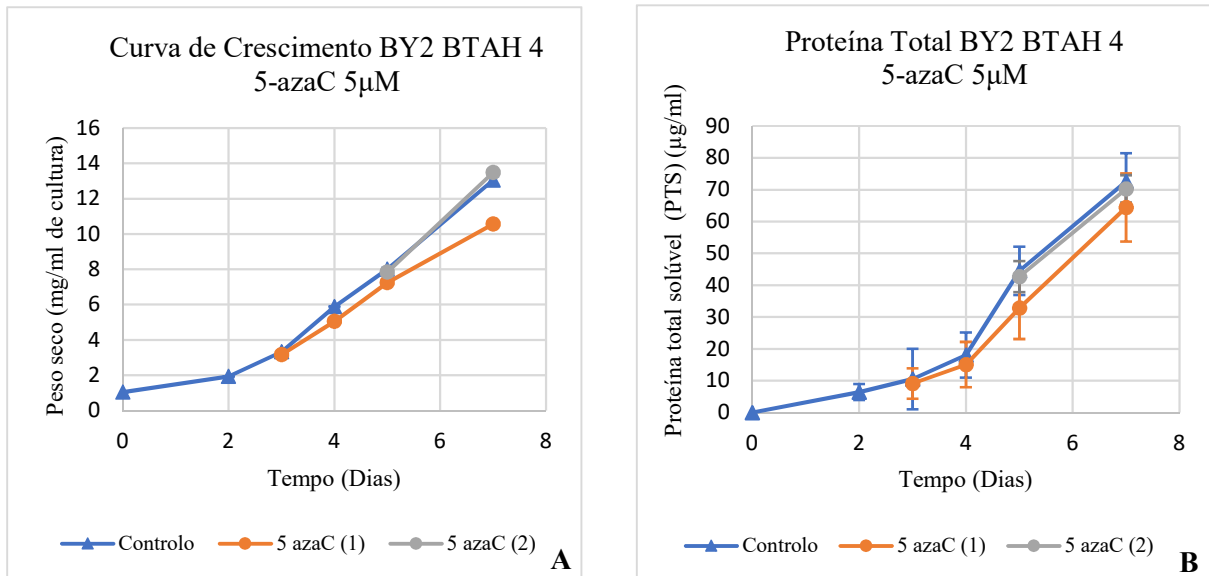


Figura 3.3: Gráficos correspondentes à curva de crescimento (A) e à quantidade de proteína total solúvel secretada (B) pelas células BY2 BTAH 4, ao longo de 7 dias. A curva a azul corresponde ao **controlo**, sem adição do composto. A curva a laranja corresponde ao ensaio com a **5-azaC (1)** (5µM), no qual o composto foi adicionado ao 2º dia. A curva a cinzento corresponde ao ensaio com a **5-azaC (2)** (5µM), no qual o composto foi adicionado ao 4º dia.

Como podemos observar pela figura 3.3 (A), quando existe a adição da 5-azacitidina a uma concentração de 5µM ao dia 2 (5-azaC (1)), a partir do dia 3 começa a haver uma diferença no crescimento celular entre o controlo e o ensaio, tornando-se esta diferença mais óbvia ao dia 7. Esta diferença deve-se ao facto da 5-azacitidina induzir de certo modo toxicidade nas células, levando à paragem do ciclo celular e, conseqüentemente, à inibição da divisão celular (Poborilova, *et al.*, 2015; Yang, *et al.*, 2010). No entanto, nem todas as células são afetadas, sendo observável um aumento ao longo do tempo, também devido ao facto de algumas células conseguirem ultrapassar esta paragem do ciclo celular. Testou-se também a adição do composto ao dia 4, como representado na figura 3.3 A, constatando-se que não existem diferenças entre o controlo e o ensaio aos dias 5 e 7. Seguidamente, quantificou-se a proteína total secretada para o meio de cultura (figura 3.3 B), conseguindo-se observar uma menor quantidade de proteína aos dias 5 e 7 no ensaio, sendo o mesmo coerente com a diminuição do crescimento celular quando houve a adição do composto ao dia 2. Quanto à adição do composto ao dia 4 não observamos quaisquer diferenças em comparação com a curva de crescimento.

3.2.1.2. Perfil da proteína total por SDS-PAGE e detecção da proteína recombinante por western-blot para a concentração de 5 μ M

Depois de caracterizada a curva de crescimento e a quantidade de proteína solúvel secretada para o meio de cultura na presença do composto 5-azacitidina a uma concentração de 5 μ M, foi feita a detecção da proteína total por SDS-PAGE bem como da proteína recombinante de interesse por western-blot. Neste caso, a detecção da L-PGDS foi feita com um anticorpo secundário diferente da caracterização da linha de tabaco BY2 BTAH 4, uma vez que era necessário quantificar a quantidade de L-PGDS presente em cada banda sem adição do composto e com adição, através da densidade relativa das mesmas.

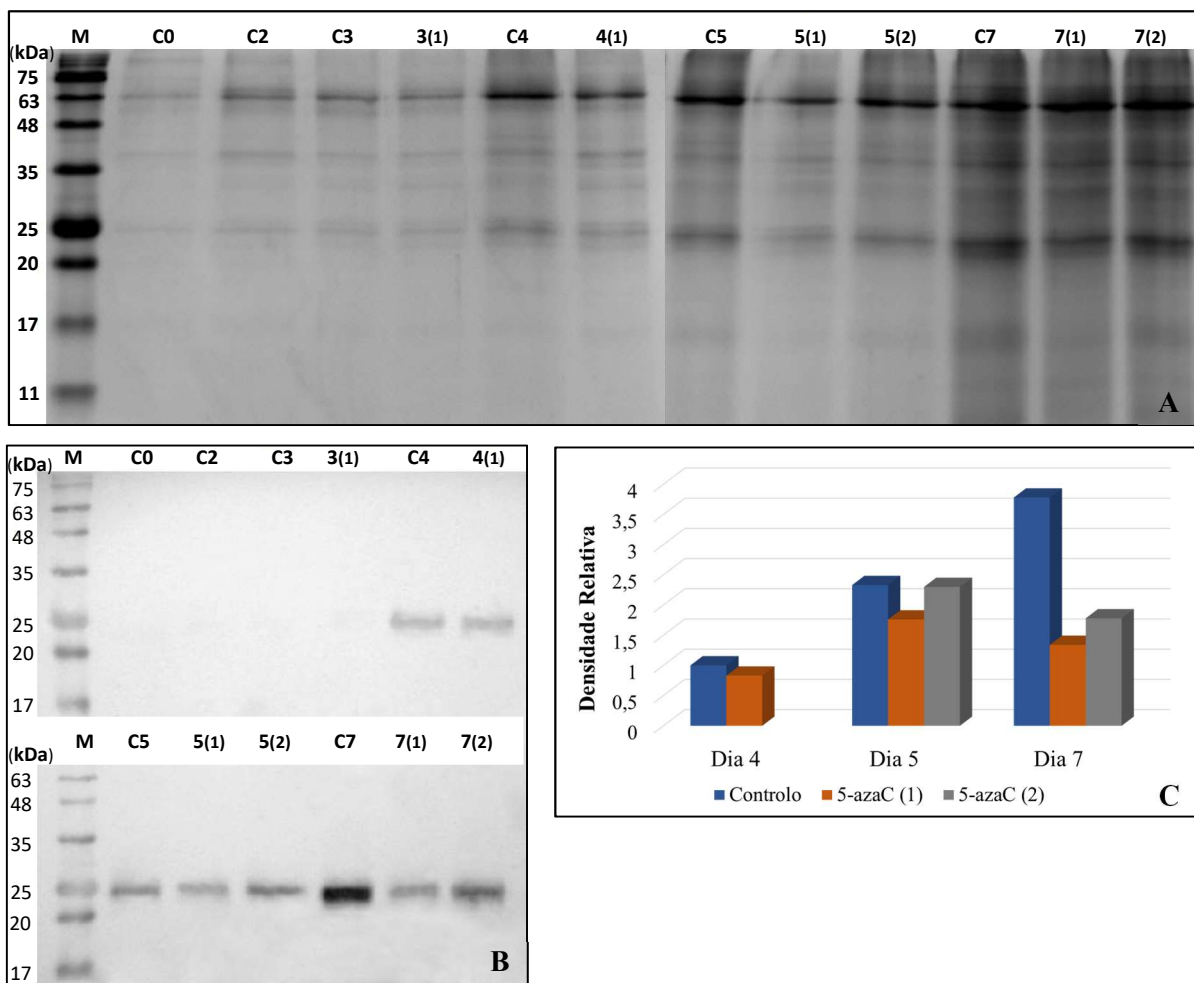


Figura 3.4: SDS-PAGE (A) e western-blot (B) para detecção da proteína total e de L-PGDS, respectivamente. M corresponde ao marcador molecular (*NZYcolour protein marker II*) e os números de 0 a 7 aos dias de recolha de meio de cultura, sendo que os C correspondem aos controlos, os (1) a adição do composto ao dia 2 e os (2) a adição do composto ao dia 4, tendo cada amostra sido concentrada 5x. Foi ainda feita a medição da densidade relativa de cada banda do western-blot (C).

Analisando o resultado obtido por SDS-PAGE (Figura 3.4 A), podemos afirmar que existe um aumento da quantidade de proteína total no meio de cultura, ao longo dos dias, no controlo. Comparando a adição do composto ao dia 2 com o controlo, conseguimos observar que a partir do dia 4 (Ø e 1) existe um ligeiro decréscimo da proteína total, sendo visível este decréscimo na intensidade geral de todas as bandas, mas bastante mais visível no dia 5 e 7. Comparando a adição do composto ao dia 4 com o controlo, observamos também que existe um ligeiro decréscimo nas bandas correspondentes a 17 e 11 kDa, bem como na banda correspondente à L-PGDS, enquanto que as restantes permanecem iguais. Esta diferença, apesar de ser pequena, não foi observada no gráfico correspondente à quantidade de proteína total (figura 3.3 B), uma vez que os desvios padrão são bastante grandes, e no caso do SDS-PAGE as amostras que foram corridas haviam sido centrifugadas anteriormente, sendo que aqui realmente estamos a considerar apenas a proteína total solúvel no meio.

Observando o *western-blot* (figura 3.4 B) correspondente à proteína de interesse, infere-se que existe diferença na quantidade desta proteína no dia 5 entre o controlo e adição do composto no dia 2, mas não entre o controlo e a adição do composto no dia 4. Quanto ao dia 7, existem claramente diferentes quantidades da proteína de interesse no meio de cultura entre controlo e ensaio, sendo que a adição do composto ao dia 2 foi onde se observou a menor quantidade.

Para determinar mais precisamente as diferenças na quantidade de L-PGDS entre controlo e ensaio, a intensidade dos pixéis e a área de cada banda foram quantificadas através do *Image J*. Através das medições de cada banda, é possível comparar o controlo de cada dia com o respetivo ensaio, observando-se, através da análise da figura 3.4 C, que existe apenas uma ligeira diferença entre o controlo e o ensaio ao dia 4, tornando-se mais acentuada aos dias 5 e 7, de 0,57 e de 2,44 respetivamente. Na adição do composto ao dia 4, não são observadas diferenças relevantes entre controlo e ensaio ao dia 5. Contudo, ao dia 7 já se observa uma diferença de 2,00 na densidade relativa em comparação ao controlo, traduzido numa menor quantidade de proteína.

Analisando os resultados obtidos relativos ao composto a uma concentração de 5µM, conseguimos observar que quando existe um decréscimo no crescimento celular, o mesmo reflete-se na quantidade de proteína total e, consequentemente, de L-PGDS. Devido a uma aparente citotoxicidade induzida pela adição do composto ao dia 2, efetuaram-se adições a outras concentrações a este mesmo dia, procurando atuar no maior número possível de células em replicação, e desta maneira estendendo a desmetilação a um maior número de células. Na adição ao dia 4 não observamos diferenças, possivelmente devido ao facto do composto estar a atuar sobre células maioritariamente em divisão. Para saber se é efetivamente nulo qualquer efeito do composto adicionado ao dia 4, seria necessário fazer mais curvas de crescimento e o respetivo estudo de quantificação de proteína total e de L-PGDS, testando-se se este é um padrão comum a ser observado.

3.2.2. Adição de 5-azacitidina 2,5 μ M

Decidiu-se testar em seguida o efeito do composto a uma concentração mais baixa, 2,5 μ M, tendo sido observado anteriormente que o composto a 5 μ M, quando adicionado ao dia 2 resultava numa diminuição do crescimento celular e, conseqüentemente, da proteína.

3.2.2.1. Determinação da curva de crescimento e quantificação da proteína total solúvel para a concentração de 2,5 μ M

Neste procedimento foi utilizado o mesmo método que para a curva de crescimento na presença do composto com concentração a 5 μ M.

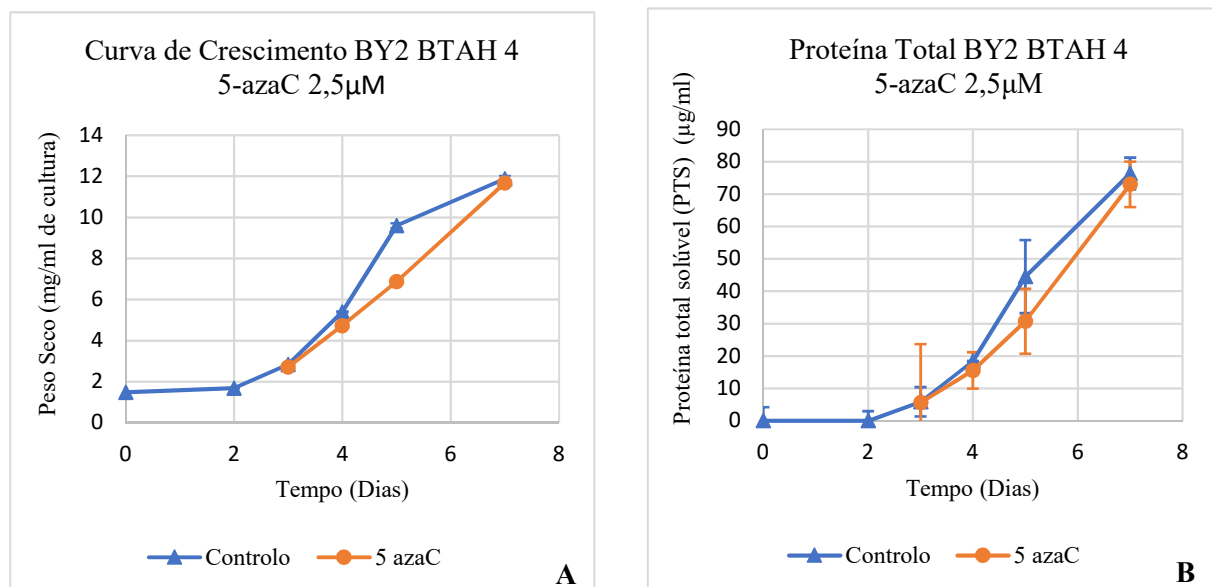


Figura 3.5: Gráficos correspondentes à curva de crescimento (A) e à quantidade de proteína total solúvel secretada (B) pelas células BY2 BTAH 4, ao longo de 7 dias. A curva a azul corresponde ao **controle**, sem adição do composto. A curva a laranja corresponde ao ensaio com a **5-azaC** (2,5 μ M), no qual o composto foi adicionado ao 2^o dia.

Observando a figura 3.5 A, quando adicionamos o composto ao dia 2, vemos uma diminuição no crescimento celular ao dia 5 em comparação com o controle, devido a um efeito citotóxico do composto, sendo que o mesmo começa a surtir efeitos ao dia 4. No controle, ao dia 5, é expectável que esteja a ocorrer a divisão de um grande número de células, o que faz com que essa diferença seja ainda

maior. No dia 7 a curva de crescimento do controlo e do ensaio quase coincidem, uma vez que as células do controlo desaceleraram o seu crescimento do dia 5 para o dia 7, e no ensaio observamos um crescimento exponencial entre esses dois dias, possivelmente devido ao facto de grande parte do composto ter sido já incorporado nas células. Olhando agora para a quantidade de proteína total em meio de cultura, (figura 3.5 B), conseguimos observar uma menor quantidade de proteína ao dia 5 do ensaio, sendo a mesma compatível com a diminuição do crescimento celular. Nos restantes dias não são observadas diferenças a nível de quantidade de proteína total do controlo para o ensaio.

3.2.2.2. Perfil da proteína total por SDS-PAGE e deteção da proteína recombinante por western-blot para a concentração de 2,5 μ M

Depois de caracterizada a curva de crescimento e a quantidade de proteína solúvel secretada para o meio de cultura na presença do composto 5-azacitidina a uma concentração de 2,5 μ M, procedeu-se à deteção da proteína total por SDS-PAGE bem como da proteína recombinante de interesse por western-blot para detectar possíveis diferenças.

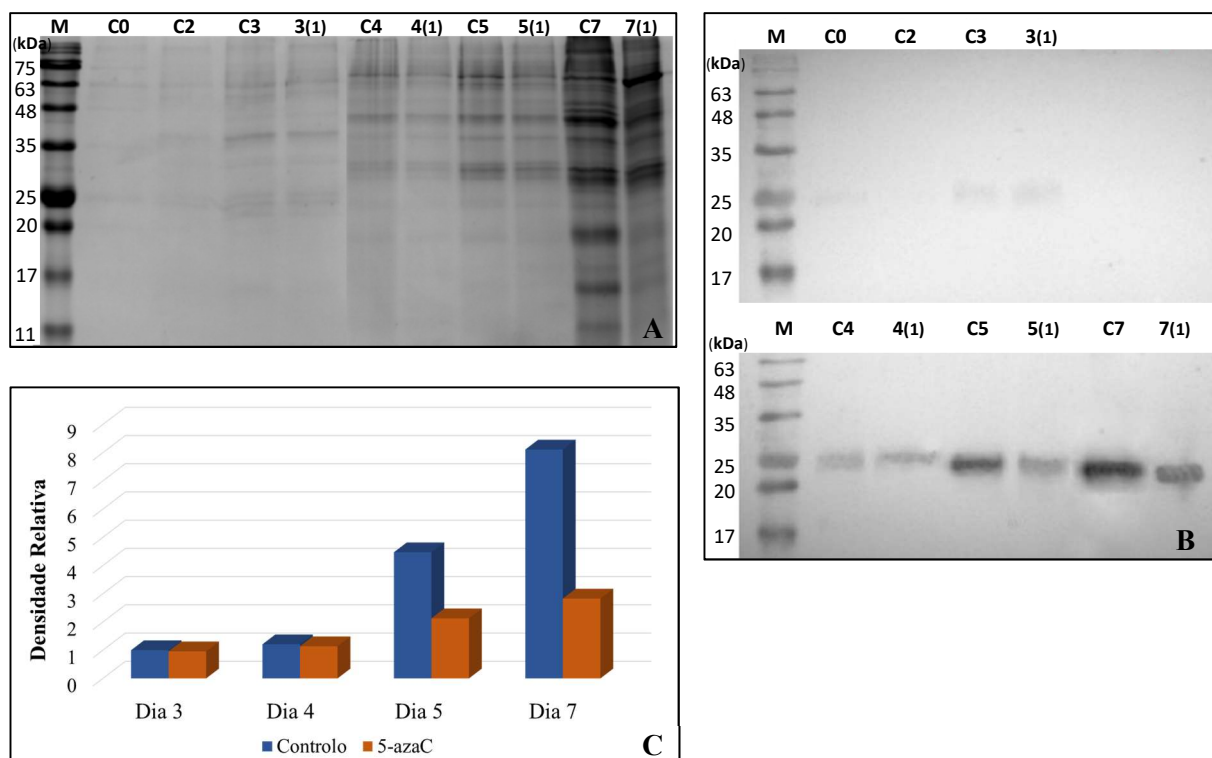


Figura 3.6: SDS-PAGE (A) e western-blot (B) para deteção da proteína total e de L-PGDS, respetivamente. M corresponde ao marcador molecular (*NZYcolour protein marker II*) e os números de 0 a 7 aos dias de recolha de meio de cultura, sendo que os C correspondem aos controlos, os (1) a adição do composto ao dia 2, tendo cada amostra sido concentrada 5x. Foi ainda efetuada a medição da densidade relativa de cada banda do western-blot (C).

Analisando o resultado obtido por SDS-PAGE (Figura 3.6 A), observamos que existe uma ligeira diminuição entre o controlo e o ensaio ao dia 4 e 5, sendo que ao dia 7 observa-se com maior clareza uma diminuição acentuada na acumulação das proteínas, bastante evidente quando comparamos as bandas correspondentes a 11, 17 e 20 kDa, que se encontram menos intensas no ensaio. Este resultado não é completamente coerente com a figura 3.5 B, uma vez que ao dia 7 no gráfico, observamos praticamente igual quantidade de proteína total tanto no controlo como no ensaio. Uma vez mais, esta diferença deve-se ao facto de no gráfico não estarmos apenas a observar a proteína total solúvel, uma vez que as amostras ao dia 7 contêm proteína precipitada no meio de cultura e a mesma foi lida no espectrofotómetro. No que toca ao caso dos resultados do SDS-PAGE, apenas estamos a considerar a proteína total solúvel em meio de cultura, uma vez que os desvios padrão da figura 3.5 B são bastante elevados.

Analisando os resultados relativos à proteína de interesse (Figura 3.6 B), parecem não existir diferenças na quantidade de L-PGDS aos dias 3 e 4 entre o controlo e o ensaio. No entanto, aos dias 5 e 7, observa-se sempre no ensaio menor quantidade da proteína em comparação com o controlo, registando-se um aumento progressivo de um dia para o outro. Como nos restantes ensaios, quando existe um menor número de células o mesmo traduz-se numa menor acumulação de proteínas no meio de cultura.

Através da figura 3.6 C, conseguimos concluir o que se observa no *western-blot* da proteína: no dia 3 e 4 não se observam diferenças entre o controlo e o ensaio, enquanto que no dia 5 existe uma diferença de 2,34 do controlo para o ensaio, e ao dia 7 de 5,28 do controlo para o ensaio.

Podemos afirmar que a 5-azacitidina a 2,5 μ M não surte o efeito desejado, uma vez que afeta o ciclo celular e conseqüentemente faz com que haja uma menor produção de proteínas. O mesmo foi observado quando aplicamos o mesmo composto a uma concentração de 5 μ M.

3.2.3. Adição de 5-azacitidina 15 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 150 μ M

Devido ao facto de não obtermos aumento de proteína e de, a concentrações baixas, observarmos alguma citotoxicidade por parte do composto, decidiu-se aplicar concentrações mais elevadas e observar o seu efeito em apenas dois dias da curva.

3.2.3.1. Determinação da curva de crescimento e quantificação da proteína total solúvel para as concentrações de 15 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 150 μ M

Para a determinação da curva de crescimento e quantificação da proteína total solúvel na presença do composto, foi utilizado o mesmo procedimento que para a curva de crescimento na presença do composto com concentração a 5 μ M e 2,5 μ M.

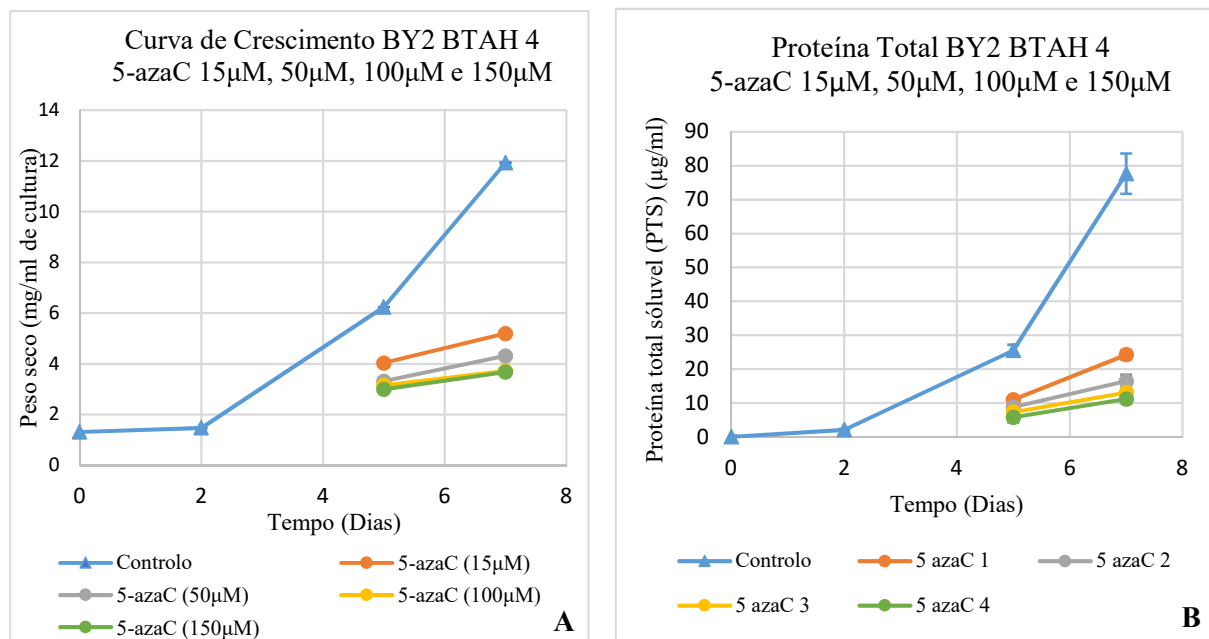


Figura 3.7: Gráfico correspondente à curva de crescimento (A) e à quantidade de proteína total solúvel secretada (B) pelas células BY2 BTAH 4, ao longo de 7 dias. A curva a azul corresponde ao **controlo**, sem adição do composto. Os ensaios com a **5-azaC** encontram-se representados pelas curvas a laranja, cinzento, amarelo e verde, sendo que estas correspondem a diferentes concentrações de 5-azaC, nomeadamente 15 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 150 μ M, respetivamente, nos quais o composto foi adicionado ao 2 $^{\circ}$ dia.

Analisando a figura 3.7 A, conseguimos observar uma marcada diferença entre o controlo e os restantes ensaios, sendo evidente que o composto a estas concentrações é muito mais tóxico que a concentrações mais baixas, mas o mesmo não chega a ser demasiado tóxico ao ponto de impedir totalmente o crescimento das células. Observa-se um ligeiro crescimento celular do dia 5 para o dia 7, em qualquer das concentrações usadas, sendo que a curva correspondente à maior concentração do composto é a que possui um menor aumento, como seria expectável. Possivelmente nestes casos em que se utiliza uma concentração tão elevada de composto existe alteração na viabilidade celular, nomeadamente morte celular e um maior número de células com paragem do ciclo celular.

Na figura 3.7 B, correspondente à quantidade de proteína total, observa-se um padrão idêntico ao da curva de crescimento, sendo o controlo a curva que regista maior produção de proteínas,

registando-se nas restantes curvas um decréscimo acentuado aquando da aplicação do composto nas culturas celulares.

3.2.3.2. Perfil da proteína total por SDS-PAGE e deteção da proteína recombinante por western-blot para as concentrações de 15 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 150 μ M

Após a caracterização da curva de crescimento e da quantificação de proteína solúvel secretada para o meio de cultura na presença do composto 5-azacitidina a diferentes concentrações, foi feita a deteção da proteína total por SDS-PAGE bem como da proteína recombinante por western-blot.

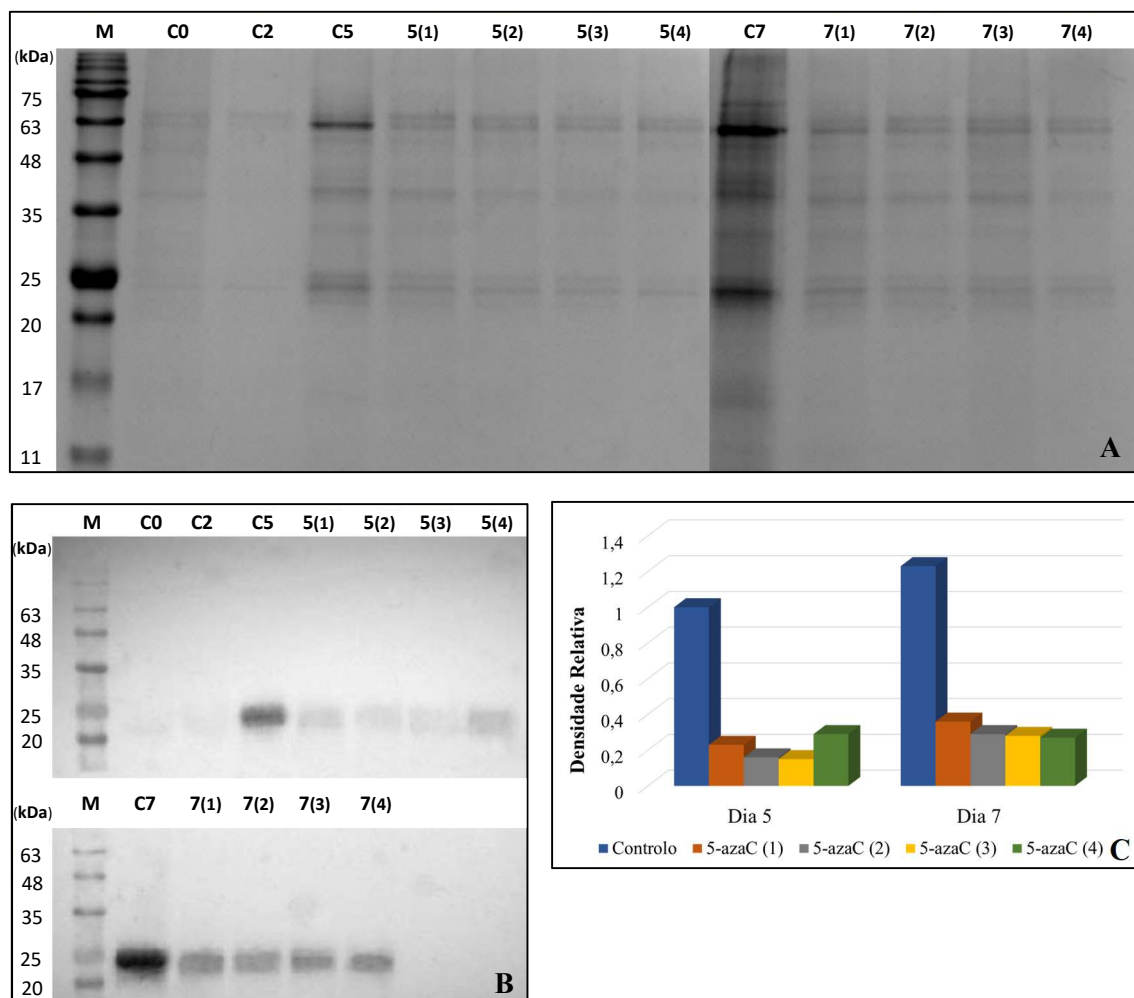


Figura 3.8: SDS-PAGE (A) e western-blot (B) para deteção da proteína total e de L-PGDS, respetivamente. M corresponde ao marcador molecular (*NZYcolour protein marker II*) e os números de 0 a 7 aos dias de recolha de meio de cultura, sendo que os C correspondem aos controlos, os (1) o composto a uma concentração de 15 μ M, (2) a uma concentração de 50 μ M, (3) a uma concentração de 100 μ M e (4) a uma concentração de 150 μ M, tendo cada amostra sido concentrada 5x. Foi ainda efetuada a medição da densidade relativa de cada banda do western-blot (C).

Analisando o resultado obtido por SDS-PAGE (Figura 3.8 A), observamos que existe um aumento de proteína ao longo do tempo no controlo e o mesmo acontece em cada um dos ensaios. Estes resultados obtidos por SDS-PAGE são coerentes com a figura 3.7 B. No *western-blot* relativo à L-PGDS (figura 3.8 B) conseguimos observar que do controlo do dia 5 para o dia 7 existe aumento da quantidade de proteína, observando-se o mesmo em relação aos ensaios. Ao dia 5 a amostra correspondente à concentração 150 μ M (5(4)) aparenta ter mais quantidade de L-PGDS em relação aos outros ensaios, o que leva a crer que possa ter havido um erro de pipetagem desta amostra, uma vez que o mesmo padrão não se observa no SDS-PAGE na banda correspondente a esta proteína (26 kDa). Quanto ao dia 7, os ensaios parecem ter sensivelmente a mesma quantidade de L-PGDS, o que leva a crer que ambas as amostras acumularam a mesma quantidade desta proteína no meio de cultura, possivelmente devido ao facto de em parte o composto se ter degradado, com adição ao dia 2. Por forma a confirmar se os ensaios ao dia 7 realmente possuem a mesma quantidade de L-PGDS, procedeu-se à medição da densidade relativa de cada banda do *western-blot* e, como podemos verificar pela figura 3.8 C, o ensaio correspondente à concentração de 50 μ M (5-azaC (1)) produziu mais L-PGDS quando comparado aos outros ensaios, ocorrendo o mesmo ao dia 5. Comparando o controlo com este ensaio observamos uma diferença de 0,77 ao dia 5 e de 0,87 ao dia 7. Em relação às outras concentrações não se observam praticamente diferenças, apenas o que foi constatado anteriormente acerca da banda 5(4).

Os resultados obtidos com concentrações mais elevadas foram os esperados, uma vez que quanto maior a concentração, mais elevada é a toxicidade do composto. No entanto, as concentrações de 50 μ M, 100 μ M e 150 μ M produziram resultados muito idênticos.

3.2.4. Adição diária de 5-azacitidina 1 μ M

Por último, testou-se a concentração de 1 μ M, sendo feita desta vez adição diária do composto ao longo da curva de crescimento. Uma vez que concentrações mais elevadas que 5 μ M resultaram numa maior toxicidade do composto e consequentemente numa menor quantidade de proteína, e a concentrações de 2,5 μ M e 5 μ M pôde observar-se ainda uma alteração no crescimento celular, decidiu-se então baixar ainda mais a concentração, com várias adições do composto devido à dose ser reduzida e do mesmo se degradar decorridas aproximadamente 8-12h (Hollenbach *et al.*, 2010).

3.2.4.1. Determinação da curva de crescimento e quantificação da proteína total solúvel para a concentração de 1 μ M

Neste procedimento foi utilizado o mesmo método que para a curva de crescimento na presença do composto com concentração a 5 μ M, 2,5 μ M, 15 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 150 μ M.

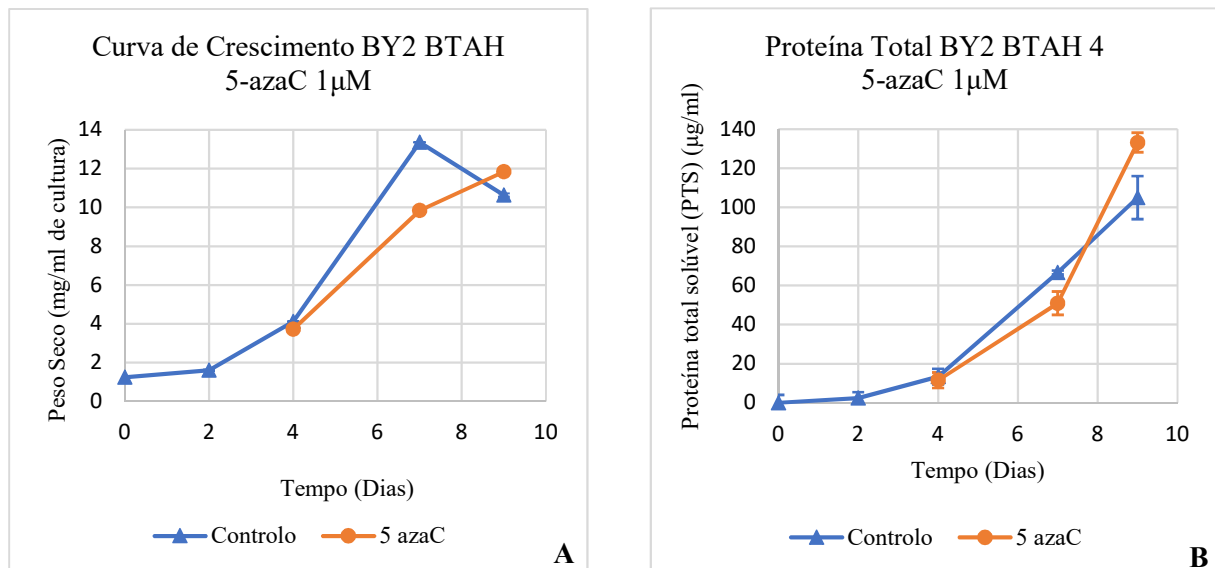


Figura 3.9: Gráficos correspondentes à curva de crescimento (A) e à quantidade de proteína total solúvel secretada (B) pelas células BY2 BTAH 4 ao longo de 7 dias. A curva a azul corresponde ao **controlo**, sem adição do composto. A curva a laranja corresponde ao ensaio com a **5-azaC**, no qual o composto foi adicionado ao 2º dia e nos dias seguintes consecutivos.

Analisando a figura 3.9 A, observa-se que ao dia 4 ambas as curvas se situam no início da fase exponencial com praticamente a mesma quantidade de células por ml de cultura, mas ao dia 7 já observamos uma diferença de crescimento entre as duas curvas, sendo o crescimento celular na presença do composto mais lento que o do controlo. Ao dia 9 a curva relativa ao ensaio continua em crescimento com sucessivas divisões enquanto que no controlo é observável uma redução do valor de peso seco. Pela primeira vez observamos um aumento do crescimento na curva relativa ao ensaio em relação ao controlo. Tal deve-se ao facto de o crescimento celular ser mais lento no ensaio como consequência da presença diária do composto a baixas concentrações, o que faz com que possivelmente haja paragem do ciclo celular em algumas células. Estas mais tarde terão conseguido continuar a sua divisão, o que faz com que consigam proliferar, mas de forma mais lenta. Do dia 7 para o dia 9 na curva do ensaio conseguimos observar que o crescimento já não é exponencial como do dia 4 para o dia 7, o que indica que aos dias 10 ou 11 as células devem ter entrado numa fase estacionária. A partir do momento em que se aproximam da fase estacionária o composto deixa de ter o efeito desejado, uma vez que já não ocorre a replicação do ADN, daí a curva ter sido estudada apenas até ao dia 9.

Analisando agora a figura 3.9 B correspondente à proteína total, observa-se o mesmo que na curva de crescimento, quando houve um maior crescimento no ensaio que no controlo. Ao dia 9 observamos uma maior quantidade de proteína total no ensaio que no controlo, e esta diferença ainda é considerável devido ao facto de uma continuar a proliferar e a outra a esse dia evidenciar redução de peso seco, o que se traduz num menor número de células a produzir proteínas. Este resultado corresponde também ao esperado devido à desmetilação do ADN, o que faz com que certos genes que se encontravam silenciados ou que eram menos transcritos passem a estar disponíveis para transcrição, aumentando a expressão das respectivas proteínas.

3.2.4.2. Perfil da proteína total por SDS-PAGE e deteção da proteína recombinante por western-blot para a concentração de 1 μ M

Depois de caracterizada a curva de crescimento e a quantidade de proteína solúvel secretada para o meio de cultura na presença diária do composto 5-azacitidina, foi feita a deteção da proteína total por SDS-PAGE bem como da proteína recombinante por western-blot.

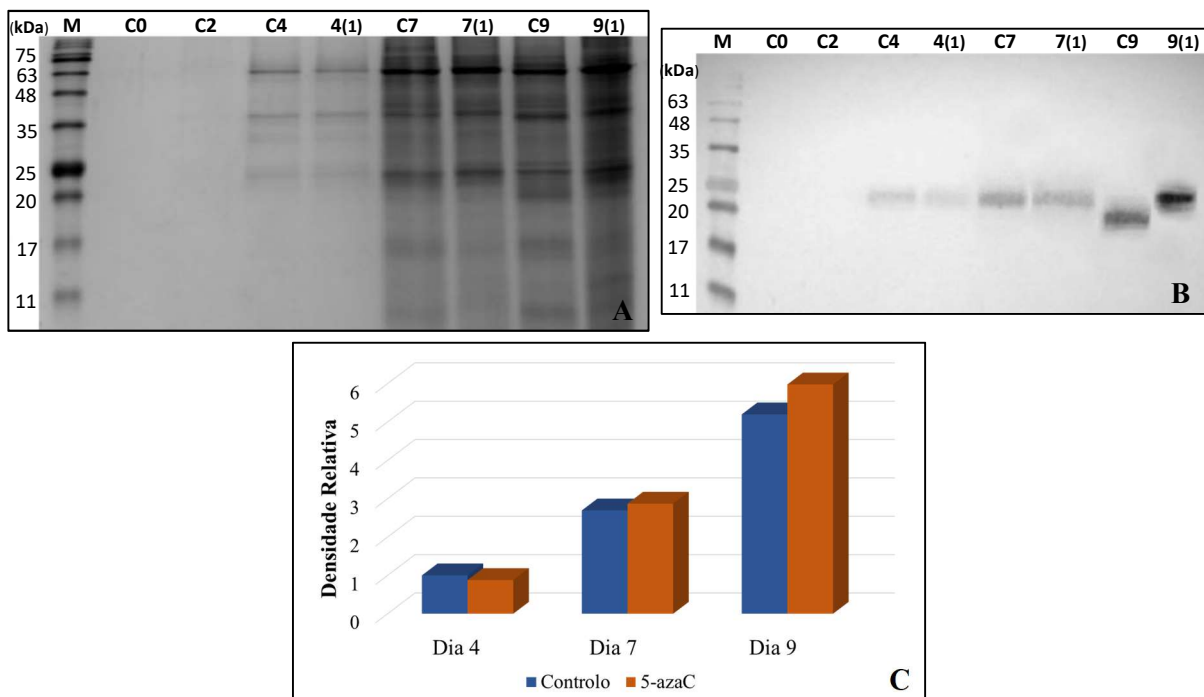


Figura 3.10: SDS-PAGE (A) e western-blot (B) para deteção da proteína total e de L-PGDS, respetivamente. M corresponde ao marcador molecular (*NZYcolour protein marker II*) e os números de 0 a 9 aos dias de recolha de meio de cultura, sendo que os C correspondem aos controlos, os (1) a adição do composto ao dia 2 e dias consecutivos, tendo cada amostra sido concentrada 5x. Foi ainda efetuada a medição da densidade relativa de cada banda do western-blot (C).

Na figura 3.10 A, relativa à detecção de proteína total por SDS-PAGE, podemos observar que existe uma acumulação de proteínas ao longo do tempo tanto no controlo como no ensaio. Ao dia 4 não são observadas diferenças entre controlo e ensaio, mas ao dia 7 conseguimos observar que no ensaio, as bandas correspondentes a 11 e 17 kDa estão menos intensas em comparação com o controlo do respetivo dia, o que é consistente com o que observamos na figura 3.9 B. Já ao dia 9 também observamos diferenças nessas bandas, mas no geral as restantes encontram-se mais intensas do que no controlo, como por exemplo as bandas correspondentes a 63, 35 e 25 kDa, daí vemos um aumento da quantidade de proteína total na figura 3.9 B ao dia 9 no ensaio.

Na figura 3.10 B relativa à proteína de interesse, L-PGDS, podemos observar que a mesma vai-se acumulando ao longo do tempo tanto no controlo como no ensaio. Parece haver uma ligeira diferença, mas não muito marcada, aos dias 4 e 7 entre controlo e ensaio, em que o controlo possui uma maior acumulação de L-PGDS no meio de cultura. Ao dia 9 no ensaio, uma vez que foi registado um aumento de proteína total, observámos consequentemente uma maior quantidade de L-PGDS. No entanto, é possível verificar uma diferença de peso molecular entre o controlo e o ensaio, sendo que no controlo observamos um peso molecular mais baixo, o qual poderá dever-se a diversas razões, entre elas a ocorrência de alguma degradação da proteína ou à presença de diferentes glicofomas da mesma (este facto foi observado nos três replicados biológicos). Para confirmar a existência de diferenças na acumulação da proteína foi efetuada a medição da densidade relativa de cada banda, observando-se na figura 3.10 C que a quantidade de L-PGDS tanto no ensaio como no controlo nos dias 4 e 7 é praticamente igual, enquanto que ao dia 9 observamos uma diferença de 0,78 do ensaio para o controlo.

Os resultados obtidos com a adição diária do composto a uma concentração baixa revelaram-se positivos, uma vez que foi observado um aumento do peso seco no ensaio em comparação com o controlo e o mesmo consequentemente produziu mais proteínas. Para determinar se ocorreu desmetilação do ADN, para que houvesse aumento de proteína, todos os estudos daqui em diante foram feitos na presença do composto a uma concentração de $1\mu\text{M}$, com adição diária.

3.3. Imunodeteção da 5-metilcitosina em núcleos de BY2 BTAH 4 na presença de 5-azaC

Para avaliar a ação da 5-azacitidina na metilação do ADN em células BY2 BTAH 4, procedeu-se à imunodeteção de citosinas metiladas (5-metilcitosina) no ADN genómico, quando as mesmas foram expostas ao composto a uma concentração de $1\mu\text{M}$ durante 3 dias consecutivos, tendo o extrato celular sido recolhido ao quinto dia. Para fazer a imunodeteção das citosinas metiladas, os núcleos das células foram isolados e foi utilizado um anticorpo anti 5-metilcitosina, tendo ainda os núcleos sido corados com DAPI. Para proceder à visualização dos núcleos e à respetiva imunodeteção das 5-metilcitosinas recorreu-se a um microscópio de fluorescência.

A decisão de utilizar o composto a uma concentração de $1\mu\text{M}$ foi tomada com base nas diferenças positivas quando comparadas com o controlo, obtidas na tarefa correspondente à determinação da concentração ótima de 5-azacitidina, relativas à quantidade de proteína. Procurou-se saber se essa diferença se deve a diferentes estados de metilação do ADN.

Para esta tarefa foram preparadas 5 lâminas para o controlo e 5 lâminas para o ensaio, tentando obter-se um número elevado de núcleos para se proceder à comparação do nível de metilação do ADN. Após a visualização das lâminas, obtiveram-se várias imagens de núcleos isolados, tanto do controlo como do ensaio.

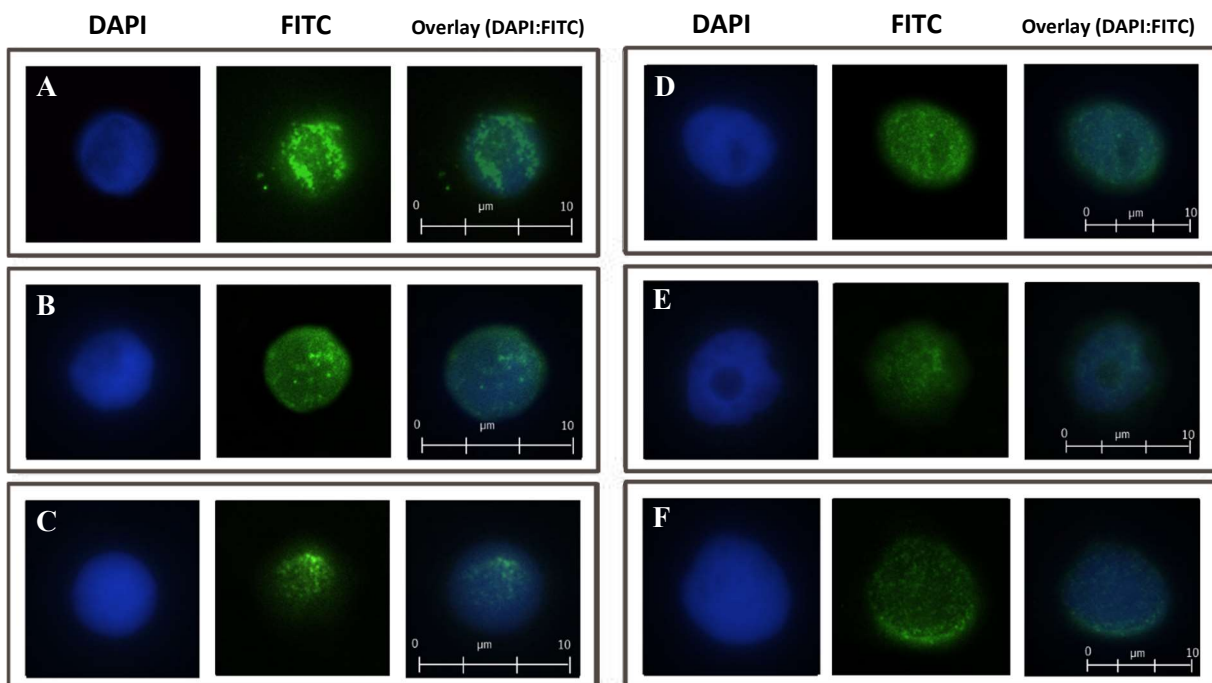


Figura 3.11: Imunodeteção dos resíduos 5-metilcitosina em núcleos de BY2 BTAH 4 sem tratamento - controlo (A, B, C) com tratamento - ensaio (D, E, F). Na primeira imagem da esquerda para a direita podemos observar o ADN corado com DAPI (azul), na segunda imagem podemos observar os resíduos de 5-metilcitosina em várias zonas da cromatina, sendo que o anticorpo secundário utilizado para esta deteção foi o Alexa Fluor® 488 detetado pelo filtro FITC (Isotiocianato de fluoresceína – verde). A última imagem corresponde à sobreposição entre a primeira e a última de forma a contextualizar a localização das citosinas metiladas.

Analisando a figura 3.11 A, B e C, correspondente a núcleos do controlo, observamos que existem alguns pontos mais intensos com maior concentração de citosinas metiladas, talvez devido a serem regiões de heterocromatina. Estas regiões da cromatina possuem baixo nível de transcrição e são porções do ADN que se encontram naturalmente metiladas, daí observarmos uma maior concentração de citosinas metiladas. No resto do núcleo observamos menores porções de citosinas metiladas, que correspondem a regiões de eucromatina.

Analisando agora as figuras 3.11 D e E, que correspondem a núcleos tratados com 5-azacitidina $1\mu\text{M}$, quando o núcleo se encontra corado com DAPI conseguimos observar com clareza a presença do nucléolo. O mesmo possui uma coloração mais escura, uma vez que grande parte da sua constituição é ARN, e o corante DAPI apenas se intercala na dupla cadeia de ADN. Observando o sinal relativo às citosinas metiladas, vemos que as mesmas se encontram dispersas por todo o núcleo de modo muito homogéneo. Não se observam regiões com maior concentração de citosinas metiladas, como nos casos da figura 3.11 B e C, o que pode ser um indicativo de que o composto está a desmetilar o ADN nestas células, uma vez que não há a presença tão marcada de regiões de heterocromatina. A nível global não aparenta ter ocorrido uma desmetilação muito significativa.

Por último, na figura 3.11 F, não se observa a presença de nucléolo, tal como nas figuras anteriores, mas a dispersão do sinal é idêntica, sendo que parece haver a nível global um sinal mais fraco de citosinas metiladas quando comparadas com as figuras do controlo aparentemente mais intensas.

Parece haver diferenças entre controlo e ensaio, uma vez que este padrão foi observado em todos os núcleos que foram analisados, mas tal não é muito conclusivo. Seria necessário quantificar o sinal de cada núcleo para ter uma maior certeza sobre estas diferenças, devido ao facto de os núcleos não possuírem o mesmo tamanho, e das células terem sido recolhidas ao quinto dia (a cultura encontra-se no início da fase exponencial).

3.4. Determinação do estado de metilação do ADN total de BY2 BTAH 4

Para avaliar o estado de metilação do ADN genómico total de BY2 BTAH 4, efetuou-se a recolha do extrato celular, ao quarto, sétimo e nono dia, tanto para o ensaio como para o controlo. Para este estudo utilizou-se mais uma vez o composto a uma concentração de $1\mu\text{M}$ adicionado consecutivamente todos os dias. Após a recolha do extrato celular procedeu-se à extração de ADN genómico de cada amostra com o auxílio do kit da *Nzytech*, correndo-se de seguida $1\mu\text{l}$ de cada amostra em gel de agarose 0,8% para verificar a sua integridade.

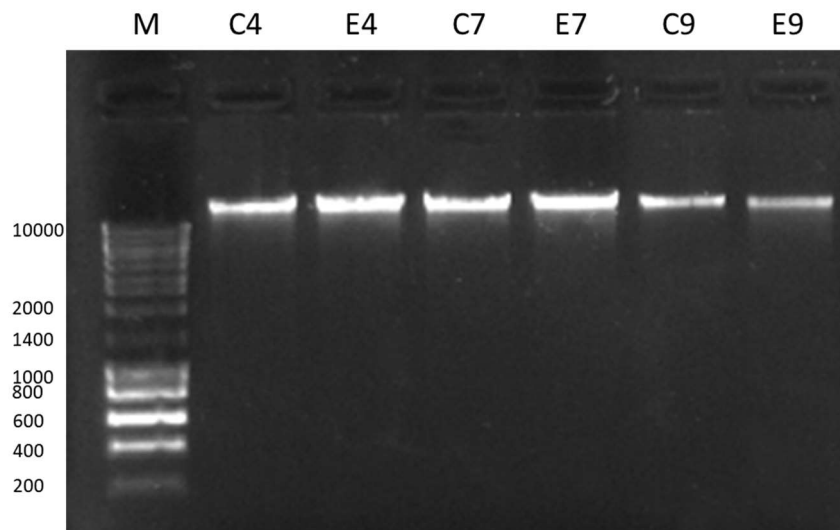


Figura 3.12: Visualização das amostras correspondentes à extração de ADN genómico de BY2 BTAH 4 com adição diária do composto 5-azacitidina $1\mu\text{M}$ em gel de agarose 0,8%. O M corresponde ao marcador molecular (*NZYcolour protein marker III*), os C aos controlos de cada dia e o E aos ensaios. Cada número corresponde ao dia de recolha do extrato celular.

Como podemos observar pela figura 3.12, conseguiu-se obter boa quantidade e qualidade de ADN genómico purificado para cada um dos dias de recolha do extrato celular. Antes das amostras terem sido corridas no gel quantificou-se o ADN genómico de cada uma num espectrofotómetro, obtendo-se o valor de $118,3\text{ng}/\mu\text{l}$ para o controlo do dia 4, $164,8\text{ng}/\mu\text{l}$ para o ensaio do dia 4, $104,2\text{ng}/\mu\text{l}$ para o controlo do dia 7, $153,2\text{ng}/\mu\text{l}$ para o ensaio do dia 7, $76,1\text{ng}/\mu\text{l}$ para o controlo do dia 9 e por fim $60,0\text{ng}/\mu\text{l}$ para o ensaio de dia 9.

3.4.1. Determinação do grau de metilação do genoma total através do método do *Dot blot*

Após a obtenção do ADN genómico de cada amostra (como demonstrado anteriormente) procedeu-se ao estudo do grau de metilação do genoma total através do método do *Dot blot*. O método do *Dot blot* é similar às outras técnicas de *blotting* mas de maneira mais simplificada, uma vez que não é necessário separar a amostra por eletroforese, bastando aplicar a amostra diretamente numa membrana e incubar a mesma com um anticorpo. O resultado final resulta no aparecimento ou não de um *signal colorimétrico* circular.

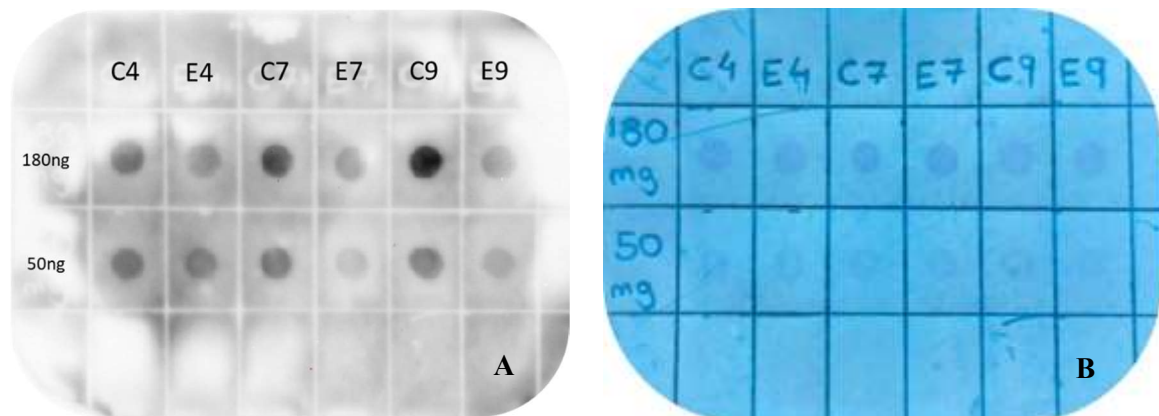


Figura 3.13: *Dot blot* evidenciando o estado de metilação geral do ADN genómico nos controlos do dia 4, 7 e 9 e os ensaios dos respectivos dias (A), e coloração da membrana do *Dot blot* com azul metileno 0,04% em acetato de sódio 5M para confirmação de quantidades homogêneas de amostra (B). Foram utilizadas duas concentrações diferentes de ADN, 180ng e 50ng em 3 μ l.

Analisando a figura 3.13 A, referente à linha relativa aos 180ng de ADN incubada com anticorpo anti 5-metilcitosina da *abcam*, conseguimos observar sempre uma diferença no nível de metilação do ADN genómico entre o controlo e o ensaio de cada dia, sendo esta diferença bastante visível aos dias 7 e 9. Quanto mais intenso for o sinal, maior a quantidade de citosinas metiladas que se encontram presentes nesse ADN. Analisando apenas os controlos de cada dia, conseguimos verificar que existe um aumento da metilação do ADN ao longo do crescimento celular da cultura. Este aumento da metilação do ADN ao longo do tempo pode dever-se ao facto de os nutrientes no meio de cultura já terem sido em grande parte consumidos pelas células, o que faz com que as mesmas se tenham de adaptar a um ambiente nutritivamente mais pobre. A falta de nutrientes para a sua sobrevivência e proliferação, bem como o aumento de metabolitos no meio de cultura que podem tornar o mesmo tóxico, faz com que as células se deparem com a necessidade de se adaptarem a esse novo ambiente, sendo que estas formas de adaptação incluem modificações no estado de metilação do ADN (Secco *et al.*, 2017). Como confirmação, vemos uma maior diferença no nível de metilação do dia 7 para o dia 9, uma vez que a partir do dia 8 as células começam a morrer, devido aos fatores mencionados acima, enquanto que do dia 4 para o dia 7 essa diferença não é tão notória como seria de esperar.

Analisando os ensaios de cada dia conseguimos observar que o nível de metilação do ADN se mantém ao longo dos dias, devido ao facto do composto ser adicionado todos os dias, o que faz com que o mesmo esteja sempre a atuar cada vez que existe replicação do ADN nas células (talvez não fosse possível observar este padrão se a adição fosse feita somente num só dia). Cada vez que uma destas células replica o seu ADN, a 5-azacitidina irá incorporar-se no lugar de uma citosina na nova cadeia de ADN (estas citosinas encontram-se metiladas na cadeia original). Tal irá fazer com que as ADN metiltransferases, responsáveis pela metilação do ADN, não consigam actuar nestes locais, resultando numa perda de memória a nível epigenético. Esta desmetilação do ADN faz com que mais genes que codificam para proteínas estejam disponíveis, para que ocorra uma maior síntese proteica. No caso do controlo do dia 9, como existe uma maior quantidade de ADN metilado, haverá conseqüentemente menos proteínas a serem produzidas.

Comparando as concentrações de 180ng e 50ng de ADN em 3µl, conseguimos observar que os resultados não são tão visíveis neste último, uma vez que a quantidade de ADN era reduzida, constatando-se apenas diferenças na intensidade do sinal no ensaio do dia 7 e 9 em relação aos outros. Os 50ng não são suficientes para ver diferença entre controlos e os ensaios, por isso utilizaram-se duas concentrações diferentes de ADN para saber se seriam obtidos resultados diferentes, sendo que para a deteção de 5-metilcitosina são utilizadas normalmente concentrações acima de 100ng, daí ter sido dado mais importância à linha dos 180ng.

Por último, analisando a figura 3.13 B, a mesma membrana de nylon foi corada com azul metileno 0,04% após a deteção, para confirmar que as quantidades das amostras eram homogéneas. Na linha dos 50ng os *templates* não são tão visíveis como na dos 180ng, mas consegue-se observar que o tamanho do *template* é igual em todas as amostras, bem como a sua intensidade. Na linha dos 180ng, os *templates* possuem todos o mesmo tamanho bem como a mesma intensidade, confirmando assim que o *loading* foi igual em todas as amostras.

3.5. Determinação do estado de metilação do promotor 35SS

Uma vez que se observaram diferenças no estado de metilação do ADN no ponto 3.4 quando da aplicação da 5-azacitidina nas culturas celulares, decidiu-se averiguar se a desmetilação que houve a nível geral em todo o ADN genómico teria porventura desmetilado o promotor responsável pela expressão do gene que codifica a proteína de interesse. Para isso, foi necessário utilizar o ADN que tinha sido extraído anteriormente no passo 3.4, especificamente do dia 9, controlo e ensaio, uma vez que se observou uma diferença maior entre os níveis de metilação do ADN. Por conseguinte, procedeu-se à

conversão por bissulfito nestas amostras com o auxílio do kit *EZ DNA Methylation-Direct™*. Em primeiro lugar, as amostras são desnaturadas a 98°C e de seguida são incubadas na presença de bissulfito de sódio (NaHSO₃) a 64°C. Durante este passo, as citosinas não metiladas presentes no ADN genómico irão sofrer sulfonação e de seguida desaminação. Mais tarde, à temperatura ambiente irão sofrer dessulfonação, o que faz com que no final desta etapa as citosinas não metiladas passem a uracilos. Já as citosinas metiladas não irão sofrer quaisquer alterações, uma vez que a presença de um grupo metilo na posição carbono cinco faz com que o bissulfito de sódio não consiga atuar. Após a conclusão desta conversão de citosinas não metiladas em uracilos, a dupla cadeia deixa de ser completa e passa a cadeias simples. Foi ainda necessário criar um par de *primers* específico para esta nova sequência de ADN, sendo que convém que os mesmos não contenham ilhas CpGs na sua sequência, e o tamanho da sequência a ser amplificada não ultrapasse os 300bp, uma vez que o PCR resulta melhor com sequências mais pequenas pelo facto do ADN ter sido altamente degradado pelo tratamento do bissulfito (o tamanho do promotor é de 678bp). Posteriormente, procedeu-se à amplificação por PCR da sequência parcial do promotor 35SS. Durante este PCR, as citosinas não metiladas que passaram a uracilos vão emparelhar com as adeninas no primeiro ciclo do PCR, e nos ciclos seguintes as adeninas vão emparelhar com as timinas. No final, obteve-se a banda com o tamanho esperado de 234bp, tanto no controlo como no ensaio.

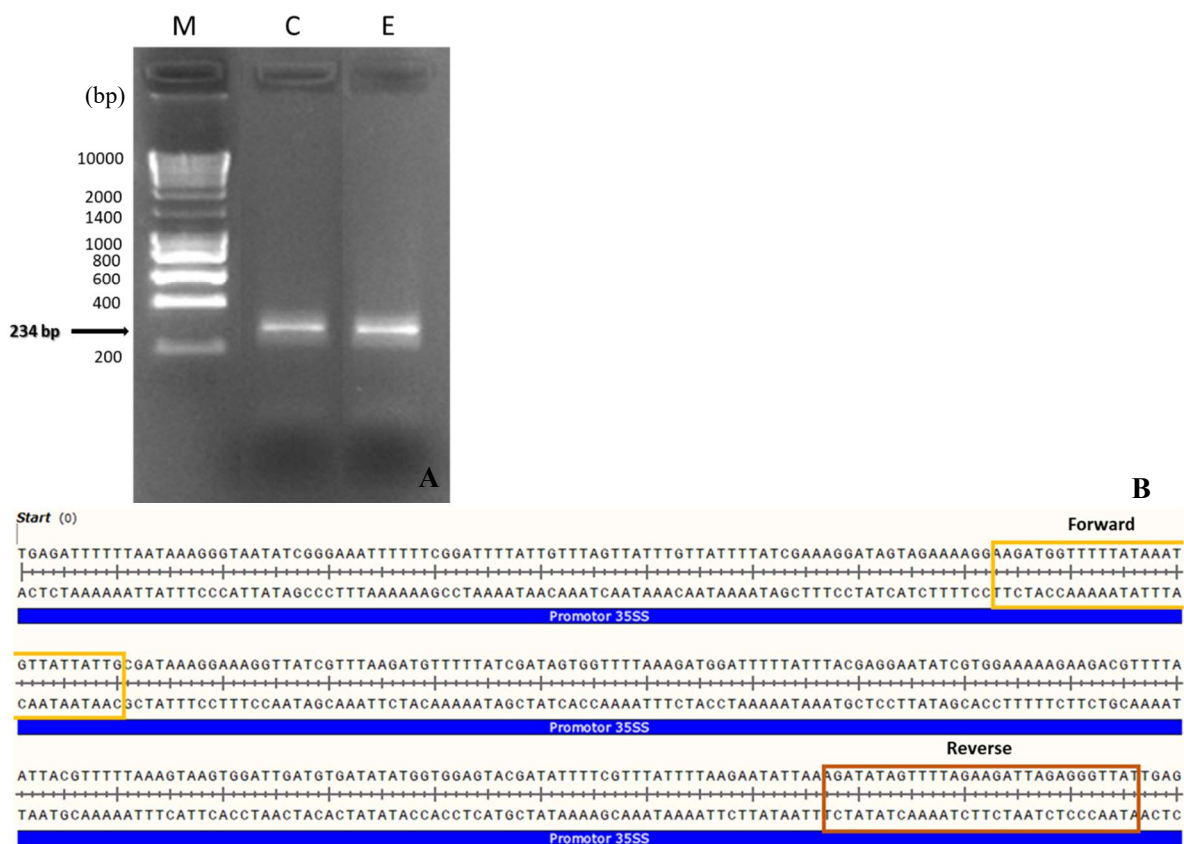


Figura 3.14: Amplificação por PCR da sequência parcial do promotor 35SS de BY2 BTAH 4, com os *primers* específicos para o tratamento com o bissulfito. O M corresponde ao marcador molecular (*NZYcolour protein marker III*), o C ao controlo e o E ao ensaio com 5-azacitidina (A). Sequência do promotor 35SS do plasmídeo pTRA-BTAH convertido, a evidenciar a localização de ligação do par de *primers* (B).

Na figura 3.14 A, tanto no controle como no ensaio, observamos a presença de uma única banda acima dos 200bp, o que corresponde ao tamanho da banda pretendida de 234bp, sendo que este fragmento se encontra representado na figura 3.14 B. Neste gel de agarose 0,8% correram-se 25µl de cada amostra, uma vez que é um fragmento de ADN de difícil amplificação devido à natureza da sua composição (não se sabia se iríamos obter pouca amplificação do mesmo, pelo que, para ter a certeza que apenas continha o fragmento de interesse, foi necessário proceder a uma nova amplificação por PCR devido à fraca qualidade da primeira). Nesta nova amplificação correram-se 2µl da cada amostra (para confirmar a presença da banda pretendida), prosseguindo-se com a purificação do restante produto de PCR. O produto purificado foi enviado para sequenciar. Depois de obtidos os resultados da sequenciação, tanto para o controle como para o ensaio, foi necessário proceder ao alinhamento dos mesmos, tendo também sido feito o alinhamento com a sequência original do promotor 35SS (sequência retirada de base de dados na internet). Apesar de ser uma sequência com elevado teor de timinas e adeninas, obteve-se uma boa qualidade de sequenciação.

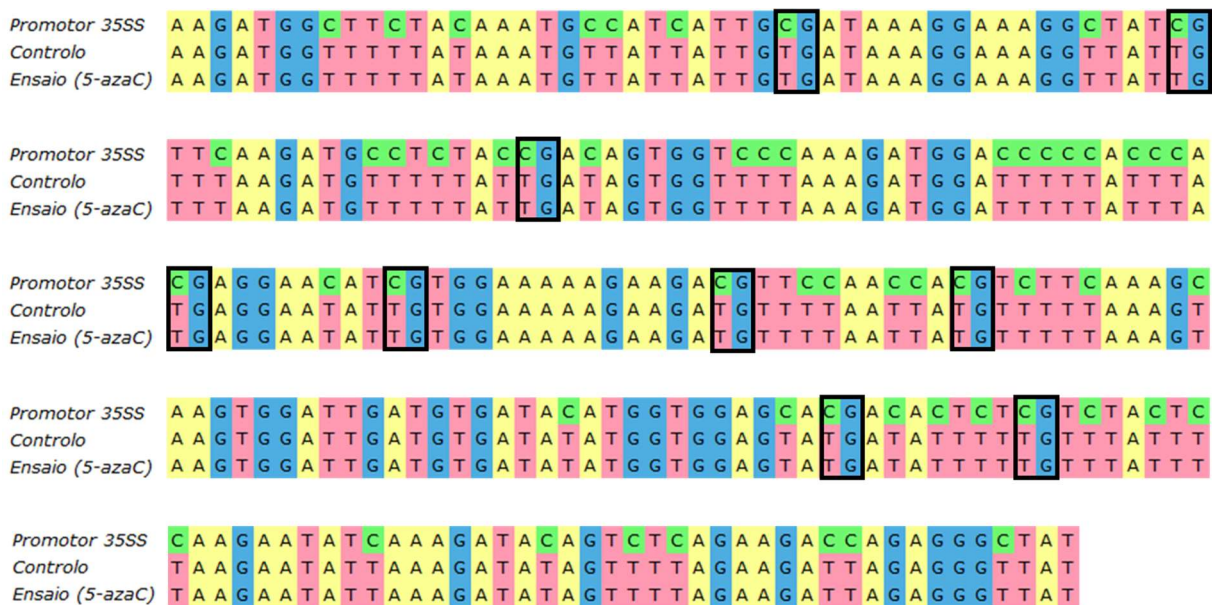


Figura 3.15: Alinhamento da sequência parcial do promotor 35SS, do controlo e ensaio com 5-azacitidina com conversão por bissulfito. As caixas a preto indicam os locais das ilhas CpGs (9 ilhas no total).

Analisando os resultados finais deste trabalho, como podemos observar pela figura 3.15, correspondente ao alinhamento das sequências do promotor original 35SS com o controlo e o ensaio, observamos que o tratamento do bissulfito funcionou, uma vez que as citosinas não metiladas foram substituídas por timinas. No entanto, não verificamos diferenças entre o controlo e o ensaio nas ilhas CpGs (caixas a preto), em contraste com o resultado esperado que seria algumas ilhas CpGs no controlo

estarem metiladas e no ensaio estarem desmetiladas devido à ação do composto. É possível observar que, tanto no controlo como no ensaio, as citosinas não metiladas foram substituídas por timinas, o que significa que as mesmas não se encontravam metiladas, sendo este promotor 35SS naturalmente hipermetilado (Weinhold *et al.*, 2013; Okumura *et al.*, 2016). Existem várias hipóteses para justificar o facto de ter ocorrido a desmetilação deste promotor ao longo do tempo, como por exemplo o local onde o T-ADN foi inserido no ADN genómico, o que faz com que possa ter havido a influência de elementos reguladores (*enhancers*) dos genes *housekeeping*, (Gaszner & Felsenfeld, 2006) despoletando a desmetilação sucessiva do promotor. Outra hipótese prende-se com a inserção deste T-ADN numa zona de eucromatina, o que faz com que o transgene esteja mais disponível para que ocorra a sua transcrição (Rajeevkumar *et al.*, 2015) e, sendo uma zona descompactada, leva à perda de metilação. Neste caso não sabemos quantas cópias do transgene é que foram inseridas no genoma, mas sabe-se que um elevado número de cópias do transgene no mesmo *locus* pode levar ao seu silenciamento (Day *et al.*, 2000). A conjugação destas hipóteses ou a ocorrência de apenas uma delas pode ter levado à sucessiva desmetilação deste promotor. Uma vez que este promotor se encontra desmetilado no próprio controlo, não seria possível aumentar a expressão da L-PGDS, alterando os níveis de metilação do mesmo com o auxílio do composto 5-azacitidina. No entanto, apenas foram analisadas 9 ilhas num total de 26 do promotor 35SS, sendo provável que as restantes também estejam desmetiladas. Para corroborar tal afirmação, seria necessário averiguar se existe o mesmo padrão de desmetilação nas restantes.

4. Conclusões e Perspetivas Futuras

O projeto da tese de mestrado teve como objetivo tentar aumentar o rendimento da proteína prostaglandina D sintase do tipo lipocalina (L-PGDS) expressa em células de *Nicotiana tabacum* BY2. Para aumentar a produção desta proteína em culturas de células em suspensão, recorreu-se à modulação epigenética através do uso do composto 5-azacitidina, para induzir hipometilação do ADN nas células, levando desta forma a um aumento dos níveis de transcrição do transgene. Pensa-se que esta proteína humana possui um papel importante na manutenção do sono, bem como na prevenção do *misfolding* e agregação das placas β -amilóides na doença de Alzheimer, tendo também demonstrado ser útil como um potencial marcador de diagnóstico em várias doenças neurológicas, o que leva a que a mesma seja relevante para a indústria farmacêutica.

Deste modo, estudou-se o efeito da 5-azacitidina sobre a metilação do ADN em células de tabaco. Constatou-se que o composto a concentrações mais elevadas do que $15\mu\text{M}$ leva a um decréscimo bastante acentuado do crescimento celular, resultando em paragens mais prolongadas no ciclo celular e provavelmente levando algumas células a entrar em apoptose. A concentrações mais baixas do composto (entre $2,5\mu\text{M}$ e $5\mu\text{M}$), verificamos que este, seja a que concentração for, induz sempre uma certa citotoxicidade, mas neste caso não é tão severa como a concentrações mais elevadas, conseguindo as células voltar a replicar-se. Apesar de não terem sido feitos estudos a nível de metilação do ADN a estas concentrações, através da observação dos SDS-PAGE de cada concentração, podemos supor que a taxa de incorporação da 5-azacitidina no ADN durante a replicação foi baixa (talvez devido ao facto de o composto ter sido adicionado às culturas uma única vez), uma vez que não vemos uma maior quantidade de proteína total do ensaio para o controlo em qualquer um dos dias analisados. No entanto, é possível que certas proteínas possam estar a ser mais expressas no ensaio do que no controlo, uma vez que houve incorporação do composto no ADN genómico, podendo levar a uma desmetilação de certos genes. Quanto à proteína de interesse, não observámos qualquer efeito a nível de metilação do ADN, uma vez que seria de esperar que, ao haver desmetilação causada pelo composto, se verificaria um aumento da quantidade de proteína. No entanto, quando utilizado o composto a uma concentração ainda mais baixa do que as anteriormente testadas, nomeadamente a $1\mu\text{M}$, e adicionado consecutivamente todos os dias, conseguimos verificar que a citotoxicidade do composto é mais baixa e que a sua taxa de incorporação no ADN aquando da replicação é muito maior, devido à adição sucessiva. A 5-azacitidina neste caso interfere com o crescimento celular, fazendo com que este seja mais lento, e que no final o ensaio consiga continuar a produzir mais proteína que o controlo devido a uma maior desmetilação do ADN, havendo um maior nível de transcrição dos genes que codificam para as proteínas. Como consequência disso,

observou-se uma maior quantidade de proteína total. Em relação à proteína de interesse, ao dia 9, no ensaio, registou-se um aumento de proteína total, observando-se conseqüentemente uma maior quantidade de L-PGDS. No entanto, constatou-se uma diferença de peso molecular entre o controlo e o ensaio, que poderá dever-se à possibilidade da 5-azacitidina prevenir de alguma forma a degradação da mesma, uma vez que possui uma estrutura química semelhante aos compostos usados como inibidores de proteases (Rich *et al.*, 1985). Foram ainda feitos outros estudos relativos à 5-azacitidina, nos quais foi testada uma concentração mais baixa que $1\mu\text{M}$ e adição do composto ao dia 6 (resultados não apresentados), não se tendo verificado quaisquer diferenças entre o ensaio e o controlo.

Relativamente aos estudos da desmetilação do ADN na presença do composto a $1\mu\text{M}$, conseguimos constatar na imunodeteção das citosinas metiladas em núcleos de BY2 que, mesmo em apenas três adições consecutivas do composto (uma vez que as células foram recolhidas ao dia 5), deixámos de observar zonas com maior concentração de sinal para citosinas metiladas, possivelmente correspondentes a zonas de heterocromatina nos núcleos que se encontram na presença do composto. Este resultado era expectável, uma vez que zonas de heterocromatina correspondem a zonas do ADN bastante metiladas e com baixo nível de transcrição, sendo que este padrão foi observado em todos os núcleos que se encontravam na presença do composto. De seguida, foram feitos estudos relativos ao nível de metilação do ADN genómico pelo método do *Dot blot*, que demonstraram que o padrão de desmetilação foi mantido ao longo do tempo devido à adição sucessiva do composto, o que corresponde ao facto de termos conseguido uma maior produção de proteína total ao dia 9 no ensaio, enquanto que no controlo observamos um aumento do nível de metilação do ADN ao longo dos dias, logo existe uma redução na produção de proteínas. Por último, estudou-se o nível de metilação do ADN no promotor responsável pela expressão do gene que expressa a proteína de interesse através da conversão por bissulfito e respetiva sequenciação, constatando-se que o próprio controlo já se encontrava desmetilado naquela parte da sequência do promotor. Na análise desta sequência constatou-se que as nove ilhas estavam desmetiladas, o que sugere que as restantes também possam estar desmetiladas, sendo que desta maneira seria impossível aumentar os níveis de transcrição da L-PGDS, uma vez que o promotor por si só já se encontra desmetilado.

Podemos concluir com este trabalho que a adição da 5-azacitidina a $1\mu\text{M}$ com adição diária nas culturas celulares, induz uma maior produção de proteína total ao final de 9 dias devido ao facto do nível de desmetilação se ter mantido ao longo dos dias, como foi observado nos resultados obtidos pelo método *Dot blot*. Não foram observadas diferenças no estado de metilação do ADN no promotor do transgene entre o controlo e o ensaio, uma vez que ambas as sequências se encontravam desmetiladas. Uma vez que o promotor do transgene do próprio controlo se encontra desmetilado, não seria possível aumentar a expressão da L-PGDS através de alterações nos níveis de metilação do ADN na presença do composto 5-azacitidina. Por último, podemos concluir que a linha BY2 BTAH 4 é uma linha que por si só já expressa bastante bem a proteína recombinante.

Apesar de não ter sido possível aumentar os rendimentos da L-PGDS através da desmetilação do ADN do promotor do transgene com o auxílio da 5-azacitidina, uma vez que o próprio promotor já se encontrava desmetilado, foi interessante analisar o efeito do composto 5-azacitidina em células BY2 na metilação do ADN ao longo da curva de crescimento, bem como o seu efeito em certas regiões do ADN (como o caso do mesmo poder prevenir a degradação da proteína), uma vez que não existem muitos estudos em células BY2 com este composto.

Como perspetivas futuras seria pertinente verificar se as restantes ilhas do promotor 35SS que não foram analisadas também se encontram totalmente desmetiladas, para termos a certeza de que existe uma desmetilação significativa do promotor 35SS. Por último, seria também interessante estudar os níveis de metilação do ADN dos genes ribossomais, uma vez que são genes repetitivos que se encontram sob a influência de controlos epigenéticos, nomeadamente a metilação do ADN (Woo & Richards, 2008).

5. Bibliografia

- Abranches, R., Marcel, S., Arcalis, E., Altmann, F., Fevereiro, P., & Stoger, E. (2005). Plants as bioreactors: A comparative study suggests that *Medicago truncatula* is a promising production system. *Journal of Biotechnology*, *120*, 121–134.
- Agius, F., Kapoor, A., & Zhu, J.-K. (2006). Role of the *Arabidopsis* DNA glycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*, 11796–11801.
- Barta, Andrea; Sommergruber, Karin; Thompson, Diana; Hartmuth, Klaus; Matzke, Marjori A. & Matzke, A. J. M. (1986). The expression of a nopaline synthase - human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Molecular Biology*, *15*, 347–357.
- Bird, A. (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature*, *447*, 396–398.
- Boehm, R. (2007). Bioproduction of therapeutic proteins in the 21st century and the role of plants and plant cells as production platforms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1102*, 121–134.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248–254.
- Burn, J. E., Bagnall, D. J., Metzger, J. D., Dennis, E. S., & Peacock, W. J. (1993). DNA methylation, vernalization, and the initiation of flowering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*, 287–291.
- Buyel, J. F., Twyman, R. M., & Fischer, R. (2015). Extraction and downstream processing of plant-derived recombinant proteins. *Biotechnology Advances*, *33*, 902–913.
- Castilho, A., Windwarder, M., Gattinger, P., Mach, L., Strasser, R., Altmann, F., & Steinkellner, H. (2014). Proteolytic and N-Glycan Processing of Human 1-Antitrypsin Expressed in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiology*, *166*, 1839–1851.
- Castilho, a, Neves, N., Rufini-Castiglione, M., Viegas, W., & Heslop-Harrison, J. S. (1999). 5-Methylcytosine distribution and genome organization in triticale before and after treatment with 5-azacytidine. *Journal of Cell Science*, *112*, 4397–4404.
- Cherblanc, F. L., Davidson, R. W. M., Di Fruscia, P., Srimongkolpithak, N., & Fuchter, M. J. (2013). Perspectives on natural product epigenetic modulators in chemical biology and medicine. *Natural Product Reports*, *30*, 605.
- Chiappinelli, K. B., Strissel, P. L., Desrichard, A., Li, H., Henke, C., *et al.* (2015). Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses. *Cell*, *162*, 974–986.
- Christman, J. K. (2002). 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: Mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*, *21*, 5483–5495.
- Daniell, H., Streatfield, S. J., & Wycoff, K. (2001). Medical molecular farming: Production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Science*, *6*, 219.

- David, K. M. & Perrot-Rechenmann, C. (2001). Characterization of a Tobacco Bright Yellow 2 Cell Line Expressing the Tetracycline Repressor at a High Level for Strict Regulation of Transgene Expression. *Plant Physiology*, *125*, 1548–1553.
- Day, C. D., Lee, E., Kobayashi, J., Holappa, L. D., Albert, H., & Ow, D. W. (2000). Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. *Genes and Development*, *14*, 2869–2880.
- Desai, P. N., Shrivastava, N., & Padh, H. (2010). Production of heterologous proteins in plants: Strategies for optimal expression. *Biotechnology Advances*, *28*, 427–435.
- Dirisala, V. R., Nair, R. R., Srirama, K., Reddy, P. N., Rao, K. R. S. S., Satya Sampath Kumar, N., & Parvatam, G. (2017). Recombinant pharmaceutical protein production in plants: unraveling the therapeutic potential of molecular pharming. *Acta Physiologiae Plantarum*, *39*, 1861-1664.
- Doench, J. G., Petersen, C. P., & Sharp, P. A. (2003). siRNAs can function as miRNAs. *Genes and Development*, *17*, 438–442.
- Doran, P. M. (2006). Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. *Trends in Biotechnology*, *24*, 426–432.
- Edgar, R., Tan, P. P., Portales-Casamar, E., & Pavlidis, P. (2014). Meta-analysis of human methylomes reveals stably methylated sequences surrounding CpG islands associated with high gene expression. *Epigenetics & Chromatin*, *7*, 1-13.
- Finnegan E. J., Genger, R. K., Peacock W. J., & Dennis, E. S. (1998). DNA Methylation in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *49*, 223–247.
- Finnegan, E. J., Peacock, W. J., & Dennis, E. S. (1996). Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*, 8449–8454.
- Fischer, R., & Emans, N. (2000). Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Research*, *9*, 279–299.
- Fischer, R., Schillberg, S., Buyel, J. F., & Twyman, R. M. (2013). Commercial aspects of pharmaceutical protein production in plants. *Current Pharmaceutical Design*, *19*, 5471–7.
- Fischer, R., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., & Twyman, R. M. (2004). Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Plant Biology*, *7*, 152–158.
- Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Sanders, P. R., Flick, J., *et al.* (1983). Expression of bacterial genes in plant cells (plant protoplasts/transformation/foreign DNA/antibiotic resistance/selectable markers). *Genetics*, *80*, 4803–4807.
- Ganapathi, T. R., Suprasanna, P., Rao, P. S., & Bapat, V. A. (2004). Tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) - A model system for tissue culture interventions and genetic engineering. *Indian Journal of Biotechnology*, *3*, 171–184.
- Gaszner, M., & Felsenfeld, G. (2006). Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nature Reviews Genetics*, *7*, 703–713.
- Gendrel, A. V., & Colot, V. (2005). *Arabidopsis* epigenetics: When RNA meets chromatin. *Current Opinion in Plant Biology*, *8*, 142–147.
- Gomord, V., & Faye, L. (2004). Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, *7*, 171–181.
- Goodin, M. M., Zaitlin, D., Naidu, R. A., & Lommel, S. A. (2008). *Nicotiana benthamiana*: Its History and Future as a Model for Plant – Pathogen Interactions. *Society*, *21*, 1015–1026.

- Grant-Downton, R. T., & Dickinson, H. G. (2005). Epigenetics and its implications for plant biology. 1. The epigenetic network in plants. *Annals of Botany*, *96*, 1143–1164.
- Habu, Y., Kakutani, T., & Paszkowski, J. (2001). Epigenetic developmental mechanisms in plants: Molecules and targets of plant epigenetic regulation. *Current Opinion in Genetics and Development*, *11*, 215–220.
- He, X.-J., Chen, T., & Zhu, J.-K. (2011). Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Research*, *21*, 442–465.
- Hellwig, S., Drossard, J., Twyman, R. M., & Fischer, R. (2004). Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature Biotechnology*, *22*, 1415–1422.
- Hendrich, B., & Tweedie, S. (2003). The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals. *Trends in Genetics*, *19*, 269–277.
- Hiatt, A., Cafferkey, R., & Bowdish, K. (1989). Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, *342*, 76–78.
- Hollenbach, P. W., Nguyen, A. N., Brady, H., Williams, M., Ning, Y., *et al.* (2010). A comparison of azacitidine and decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines. *PLoS ONE*, *5*, 1–10.
- Hood, E. E., Witcher, D. R., Maddock, S., Meyer, T., Baszczynski, C., *et al.* (1997). Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. *Molecular Breeding*, *3*, 291–306.
- Horn, M. E., Woodard, S. L., & Howard, J. A. (2004). Plant molecular farming: Systems and products. *Plant Cell Reports*, *22*, 711–720.
- Issa, J.-P. J., & Kantarjian, H. M. (2009). Targeting DNA Methylation. *Clinical Cancer Research*, *15*, 3938–3946.
- Kanekiyo, T., Ban, T., Aritake, K., Huang, Z.-L., Qu, W.-M., *et al.* (2007). Lipocalin-type prostaglandin D synthase/beta-trace is a major amyloid beta-chaperone in human cerebrospinal fluid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*, 6412–6417.
- Kato, K; Matsumoto, T; Koiwai, S; Misuzaki, S; Nishida, K; Nogushi, M & Tamaki, E. (1972). Liquid suspension culture of tobacco cells. *Ferment Technology Today*, *1*, 689–695.
- Kenton, A., Parokony, A. S., Gleba, Y. Y., & Bennett, M. D. (1993). Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics. *MGG Molecular & General Genetics*, *240*, 159–169.
- Klaas, M., John, M. C., Crowell, D. N., & Amasino, R. M. (1989). Rapid Induction of Genomic Demethylation and T-DNA Gene-Expression in Plant-Cells by 5-Azacytosine Derivatives. *Plant Molecular Biology*, *12*, 413–423.
- Kohli, A., González-Melendi, P., Abranches, R., Capell, T., Stoger, E., & Christou, P. (2006). The Quest to Understand the Basis and Mechanisms that Control Expression of Introduced Transgenes in Crop Plants. *Plant Signaling & Behavior*, *1*, 185–195.
- Kohli, Ajay; Miro, Berta, & Twyman, R. M. (2010). Transgene Integration, Expression and Stability in Plants: Strategies for Improvements. In *Transgenic Crop Plants*, *1*, 201–237.
- Kusnadi, a R., Nikolov, Z. L., & Howard, J. a. (1997). Production of recombinant proteins in transgenic plants: Practical considerations. *Biotechnology and Bioengineering*, *56*, 473–484.
- Law, J. A., & Jacobsen, S. E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics*, *11*, 204–220.

- Li, X., Wang, X., He, K., Ma, Y., Su, N., *et al.* (2008). High-Resolution Mapping of Epigenetic Modifications of the Rice Genome Uncovers Interplay between DNA Methylation, Histone Methylation, and Gene Expression. *The Plant Cell Online*, 20, 259–276.
- Li, Yuanyuan & Tollefsbol, T. O. (2011). DNA methylation detection: Bisulfite genomic sequencing analysis. *Methods in Molecular Biology*, 8, 11–21.
- Ma, J. K. C., Drake, P. M. W., & Christou, P. (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics*, 4, 794–805.
- Mandal, M. K., Fischer, R., Schillberg, S., & Schiermeyer, A. (2014). Inhibition of protease activity by antisense RNA improves recombinant protein production in *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2 (BY-2) suspension cells. *Biotechnology Journal*, 9, 1065–1073.
- Matsuoka, T.; Hirata, Masakazu; Tanaka, Hiroyuki; Takahashi, Yoshimasa; Murata, Takahiko; Kabashima, Kenji; Sugimoto, Yukihiko; Kobayashi, Takuya; Ushikubi, Fumitaka; Aze, Yoshiya; Eguchi, Naomi; Urade, Yoshihiro; Yoshida, Nobuaki; Kimura, Kazushi; & Mizogu, S. (2000). Prostaglandin D2 as a Mediator of Allergic Asthma. *Science*, 287, 2013–2017.
- McKeown P., Pendle A.F., & S. P. J. (2008). Preparation of Arabidopsis Nuclei and Nucleoli. In *The Nucleus. Methods in Molecular Biology*, 15, 67–75.
- Mukherjee, K., Twyman, R. M., & Vilcinskis, A. (2015). Insects as models to study the epigenetic basis of disease. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 118, 69–78.
- Nagata, T., Nemoto, Y., & Hasezawas, S. (1992). Cell in the Cell Biology of Higher Plants. *International Review of Cytology*, 132, 1-30.
- Nakatsuji, M., Inoue, H., Kohno, M., Saito, M., Tsuge, S., *et al.* (2015). Human lipocalin-type prostaglandin D synthase-based drug delivery system for poorly water-soluble anti-cancer drug SN-38. *PLOS ONE*, 10, 1–15.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., & Conclusions, V. I. (1999). Prostanoid Receptors: Structures, Properties, and Functions. *American Physiological Society*, 79, 1193–1226.
- Nettersheim, D., Heukamp, L. C., Fronhoffs, F., Grewe, M. J., Haas, N., *et al.* (2013). Analysis of TET Expression/Activity and 5mC oxidation during normal and malignant germ cell development. *PLOS ONE*, 8, 1-12.
- Obembe, O. O., Popoola, J. O., Leelavathi, S., & Reddy, S. V. (2011). Advances in plant molecular farming. *Biotechnology Advances*, 29, 210–222.
- Okumura, A., Shimada, A., Yamasaki, S., Horino, T., Iwata, Y., *et al.* (2016). CaMV-35S promoter sequence-specific DNA methylation in lettuce. *Plant Cell Reports*, 35, 43–51.
- Pires, A. S., Santos, R. B., Nogueira, A. C., & Abranches, R. (2014). Production of human lipocalin-type prostaglandin D synthase in the model plant *Medicago truncatula*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 50, 276–281.
- Plasterk, Ronald HA; & Ketting, R. F. (2000). The silence of the genes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 12, 562–567.
- Poborilova, Zuzana; Ohlsson, Anna B.; Berglund, Torkel; Vildova, Anna; Provaznik, Ivo & Babula, Prtv (2015). DNA hypomethylation concomitant with the overproduction of ROS induced by naphthoquinone juglone on tobacco BY-2 suspension cells. *Environmental and Experimental Botany*, 113, 28–39.
- Qu, W.-M., Huang, Z.-L., Xu, X.-H., Aritake, K., Eguchi, N., *et al.* (2006). Lipocalin-type prostaglandin D synthase produces prostaglandin D2 involved in regulation of physiological sleep. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 17949–17954.

- Rajeevkumar, S., Anunanthini, P., & Sathishkumar, R. (2015). Epigenetic silencing in transgenic plants. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1–8.
- Razin, A., & Cedar, H. (1991). DNA methylation and gene expression. *Microbiological Reviews*, 55, 451–8.
- Rich, D. H., Schmidt, P. G., Bernatowicz, M. S., Agarwal, N. S., Kawai, M., & Salituro, F. G. (1985). Inhibition of Aspartic Proteases by Pepstatin and 3-Methylstatine Perivatives of Pepstatin. Evidence for Collected-Substrate Enzyme Inhibition. *Biochemistry*, 24, 3165-3173.
- Sano, H., Kamada, I., Youssefian, S., Katsumi, M., & Wabiko, H. (1990). A single treatment of rice seedlings with 5-azacytidine induces heritable dwarfism and undermethylation of genomic DNA. *MGG Molecular & General Genetics*, 220, 441–447.
- Santos, R. B., Abranches, R., Fischer, R., Sack, M., & Holland, T. (2016). Putting the Spotlight Back on Plant Suspension Cultures. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1–12.
- Schillberg, S., Raven, N., Fischer, R., Twyman, R. M., & Schiermeyer, A. (2013). Molecular farming of pharmaceutical proteins using plant suspension cell and tissue cultures. *Current Pharmaceutical Design*, 19, 5531–42.
- Secco, D., Whelan, J., Rouached, H., & Lister, R. (2017). Nutrient stress-induced chromatin changes in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 39, 1–7.
- Siegfried, Z., & Simon, I. (2010). DNA methylation and gene expression. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 2, 362–371.
- Sijmons, P. C., Dekker, B. M. M., Schrammeijer, B., Verwoerd, T. C., Van Den Elzen, P. J. M., & Hoekema, A. (1990). Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Bio/Technology*, 8, 217–221.
- Singal, Rakesh & Ginder, G. D. (1999). DNA Methylation. *Blood - The American Society of Hematology*, 93, 4059–4070.
- Streatfield, S. J. (2007). Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 5, 2–15.
- Suzuki, M. M., & Bird, A. (2008). DNA methylation landscapes: Provocative insights from epigenomics. *Nature Reviews Genetics*, 9, 465–476.
- Tariq, M., & Paszkowski, J. (2004). DNA and histone methylation in plants. *Trends in Genetics*, 20, 244–251.
- Tate, P. H., & Bird, A. P. (1993). Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Current Opinion in Genetics & Development*, 3, 226–231.
- Tollefsbol, T. O. (2011). *Epigenetics: The new science of genetics. Handbook of Epigenetics* 1, 1-6.
- Twyman, R. M., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., & Fischer, R. (2003). Molecular farming in plants: Host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology*, 21, 570–578.
- Twyman, R. M., Schillberg, S., & Fischer, R. (2005). Transgenic plants in the biopharmaceutical market. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 10, 185–218.
- Tyunin, A. P., Kiselev, K. V., & Zhuravlev, Y. N. (2012). Effects of 5-azacytidine induced DNA demethylation on methyltransferase gene expression and resveratrol production in cell cultures of *Vitis amurensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 111, 91–100.
- Urade, Y., & Hayaishi, O. (2000). Prostaglandin D synthase: structure and function. *Vitamins and Hormones*, 58, 89–120.

- Vaissière, T., Sawan, C., & Herceg, Z. (2008). Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 659, 40–48.
- Weinhold, A., Kallenbach, M., & Baldwin, I. T. (2013). Progressive 35S promoter methylation increases rapidly during vegetative development in transgenic *Nicotiana attenuata* plants. *BMC Plant Biology*, 13, 1–18.
- White, D. M., Takeda, T., DeGroot, L. J., Stefansson, K., & Arnason, B. G. (1997). Beta-trace gene expression is regulated by a core promoter and a distal thyroid hormone response element. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 14387–14393.
- Woo, H. R., & Richards, E. J. (2008). Natural variation in DNA methylation in ribosomal RNA genes of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 8, 1–12.
- Xu, J., Ge, X., & Dolan, M. C. (2011). Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures. *Biotechnology Advances*, 29, 278–299.
- Yang, F., Zhang, L., Li, J., Huang, J., Wen, R., *et al.* (2010). Trichostatin A and 5-azacytidine both cause an increase in global histone H4 acetylation and a decrease in global DNA and H3K9 methylation during mitosis in maize. *BMC Plant Biology*, 178, 1–11.
- Yao, J., Weng, Y., Dickey, A., & Wang, K. Y. (2015). Plants as factories for human pharmaceuticals: Applications and challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 28549–28565.
- Zemach, A., McDaniel, I. E., Silva, P., & Zilberman, D. (2010). Genome-Wide Evolutionary Analysis of Eukaryotic DNA Methylation. *Science*, 328, 916–919.
- Zilberman, D., Gehring, M., Tran, R. K., Ballinger, T., & Henikoff, S. (2007). Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nature Genetics*, 39, 61–69.

6. Anexos

6.1. Reagentes e Soluções

6.1.1. Manutenção da linha celular BY2 BTAH 4

Meio de cultura para BY2:

50ml de MS (Murashige e Shoog) (*Duchefa Biochemie, Holanda*) 20x sem vitaminas;

88mM de sacarose (*Duchefa Biochemie, Holanda*);

550 μ M de inositol (*Sigma, EUA*);

2,96 μ M de tiamina (*Sigma, EUA*);

9,05 μ M de 2,4 D (Ácido diclorofenoxiacético) (*Sigma, EUA*);

1,5mM de KH₂PO₄ (Fosfato monopotássico) (*Riedel-de Haen, Alemanha*);

Perfazer com água destilada até 1L e acertar o pH para 5,8 no eletrodo (*Crison, pH Meter Basic 20*), com a solução KOH 0,4M (Hidróxido de Potássio) (*Riedel-de Haen, Alemanha*). O meio necessita de ser autoclavado e posteriormente armazenado a temperatura ambiente.

Meio Murashing & Skoog (MS) 20x:

Diluir 215,1 g de MS em 5L de água destilada. De seguida, a solução é repartida por vários tubos de 50ml e armazenada a -20°C.

6.1.2. Perfil da proteína total e detecção da proteína recombinante

Tampão de Amostra SDS-PAGE (4x):

40% de glicerol (*Scharlau, Espanha*);

320mM de Tris/HCl pH 6,8 (*Sigma, EUA*);

8% de SDS (Dodecil sulfato de sódio) (*Duchefa Biochemie, Holanda*);

0,04% de azul bromofenol (*Merck, EUA*);

20% de β -mercaptoetanol (*Sigma, EUA*);

Perfazer com água destilada até 10ml, aliquotar em microtubos de 1,5ml e depois armazenar a -20°C.

Tampão de Amostra SDS-PAGE 1x: 250 μ l da solução stock (tampão de amostra 4x) para um volume final de 1ml;

Tampão de Concentração 0,5M Tris-HCl pH 6,8:

0,5M de Tris-base;

48% de HCl 1M (Ácido clorídrico) (*Riedel-de Haen, Alemanha*);

Acertar o pH para 6,8 com HCl 3M, e perfazer com água destilada até 100ml, guardando no final a solução a 4°C;

Tampão de Resolução 3M Tris-HCl pH 8,8:

3M de Tris-Base;

48% de HCl 1M;

Acertar o pH para 8,8 com HCl 1M e perfazer com água destilada até 100ml. Guardar posteriormente a solução a 4°C;

Tampão de Corrida 10x:

25mM de Tris-Base;

0,1% de SDS;

192mM de glicina (*Nzytech, Portugal*);

Perfazer com água destilada até 1L, sendo a solução posteriormente armazenada a temperatura ambiente;

Tampão de Corrida 1x: diluir 100ml da solução stock (tampão de corrida 10x) para um volume final de 1L.

SDS a 10%:

10g de SDS em 100ml de água destilada. A solução é guardada a temperatura ambiente.

Acrilamida-bisacrilamida (30:0,8):

Usado na forma fornecida (*Nzytech, Portugal*) e guardado a 4°C.

TEMED (Tetrametiletilenodiamina):

Usado na forma fornecida (*Sigma, EUA*) e guardado a 4°C.

APS (Persulfato de amónia) 1,5%:

450mg de APS (*Merck, EUA*) em 30ml de água destilada;

Distribuir a solução por microtubos de 1,5ml e armazenar a -20°C;

Tampão de Transferência de Proteínas:

Diluir 20% de metanol (*Carlo Erba, Itália*) em tampão de corrida 1x, e armazenar a temperatura ambiente;

Solução de bloqueio da membrana:

5% de leite em pó (*Nestlé, Suíça*);

3% de albumina soro de bovino (*Nzytech, Portugal*);

Perfazer até 10ml com PBS T. Esta solução é feita e utilizada na hora.

Tampão PBS (tampão fosfato salino) 10x:

1,36M de NaCl (Cloreto de Sódio) (*Panreac, Espanha*);

26,9mM de KCl (Cloreto de potássio) (*Carl Roth, Alemanha*);

16,8mM de Na₂HPO₄ (Fosfato dissódico) (*Sigma, EUA*);

15mM de KH₂PO₄;

Perfazer com água destilada até 1L e armazenar a temperatura ambiente;

PBS 1x: diluir 100ml da solução stock (PBS 10x) para um volume final de 1L, armazenando a temperatura ambiente;

PBS T: dissolver 0,1% (v/v) de Tween 20 (*Sigma, EUA*) em PBS 1x, e armazenar a temperatura ambiente;

Tampão NBT/BCIP:

0,1M de Tris-HCl a Ph 9.0;

0,01M de NaCl;

0,05M de MgCl₂ (cloreto de magnésio) (*ThermoFisher Scientific, EUA*)

Os reagentes são dissolvidos em água destilada, e a solução é armazenada a 4°C.

Solução de Detecção NBT/BCIP:

6,6µl de BCIP (5-bromo-4-cloro-3'-indolfosfato) (*Promega, EUA*);

13,2µl de NBT (nitroazul de tetrazólio) (*Promega, EUA*);

O BCIP e o NBT são adicionados ao tampão NBT/BCIP num microtubo de 1,5ml envolvido em alumínio. Esta solução é feita e utilizada na hora.

6.1.3. Obtenção de protoplastos e isolamento de núcleos em BY2Tampão de lavagem de células:

0,4M de Manitol (*Sigma, EUA*);

10mM de MES/KOH pH 5,5 (Ácido 2-Morfolino Etano Sulfônico) (*DuchefaBiochemie, Holanda*);

Perfazer com água destilada até 200ml, e armazenar a 4°C;

Solução Enzimática:

1% de Macerozyme (*Duchefa Biochemie, Holanda*);

1% de Celulase “Onozuka” R-10 (*Duchefa Biochemie, Holanda*);

Dissolver em 10ml de tampão de protoplastos. Esta solução é feita e utilizada na hora.

Tampão de flutuação:

60% de Percoll (v/v) (*VWR, EUA*);

0,5M de sorbitol (*Sigma, EUA*);

10mM de MES/KOH pH5.5;

Perfazer com água destilada até 50ml e armazenar a 4°C;

Gradiente de Densidade com Percoll:

Para fazer o gradiente de densidades com o Percoll é necessário diluir o tampão de flutuação com o tampão de protoplastos, sendo que as soluções finais são feitas para 10ml.

Percoll 45%: 7,5ml de tampão de flutuação + 2,5ml de tampão de protoplastos;

Percoll 35%: 5,83ml de tampão de flutuação + 4,17ml de tampão de protoplastos;

Percoll 0%: 10ml de tampão de protoplastos;

Tampão de Protoplastos:

0,5M de sorbitol;

10mM de MES/KOH pH 5,5;

Perfazer com água destilada até 200ml, e armazenar a 4°C;

Solução NIB (tampão de isolamento de núcleos):

10mM de MES/KOH pH 5,5;

0,2M de Sacarose;

2,5mM EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético) (*VWR, EUA*);

2,5mM de DTT (1,4-ditiotreitól) (*Sigma, EUA*);

0,1mM de Espermina (*Sigma, EUA*);

0,5mM de Espermidina (*Sigma, EUA*);

10mM de NaCl;

10mM de KCl;

4 μ M de Aprotinina (*Sigma, EUA*);

Perfazer com água destilada para 20ml. Esta solução é feita e utilizada na hora.

Tratamento das lâminas com Poli-lisina:

Diluir a solução de Poli-lisina (1:10) (*Sigma, EUA*) com água desionizada. As lâminas têm de ser limpas com álcool antes de se aplicar a solução. Colocar as lâminas num *coplin jar* horizontal, com a solução de poli-lisina diluída, durante 5 minutos num agitador. Deixar as lâminas a secar ao ar *overnight*.

Paraformaldeído 4%:

Fazer uma solução de 8% paraformaldeído (p/v) (*Merck, EUA*) em água. Como o composto ainda está polimerizado não se irá dissolver, por isso é necessário aquecer a solução a 60°C. Adicionar umas gotas de NaOH (Hidróxido de Sódio) (*Pronalab, EUA*) a 1M até a solução ficar transparente (isto faz com que os níveis de pH aumentem fazendo com que o paraformaldeído despolimerize passando a formaldeído, acabando desta maneira por se dissolver). De seguida, deixar a solução arrefecer. Adicionar igual volume de solução 8% de formaldeído e de tampão 2xcc MTSB. Por fim, verificar o nível do pH, acertando o mesmo para 7,0 com H₂SO₄ (Ácido sulfúrico) (*Sigma, EUA*) a 0,4M, se

necessário (nunca usar HCl uma vez que ocorre libertação de gases tóxicos). A solução deve ser preparada e usada no próprio dia.

2xcc MTSB (Tampão estabilizador de microtúbulos):

50mM de PIPES (ácido piperaxín-N,N'-bis(2-etanosulfónico)) (*Sigma, EUA*);

5mM de MgSO₄ (Sulfato de magnésio) (*Sigma, EUA*);

5mM de EGTA (Ácido Egtázico) (*Sigma, EUA*);

A solução é preparada em água destilada. Para dissolver o EGTA (insolúvel em meio ácido), adicionar NaOH e depois ajustar o pH final da solução (pH 6,9) com H₂SO₄ a 0,4M. A solução é armazenada a temperatura ambiente.

6.1.4. Imunodeteção da 5-metilcitosina em núcleos de BY2

PBS T:

Dissolver 0,03% (v/v) de Tween 20 em PBS 1x, e armazenar a temperatura ambiente;

DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol dicloridrato):

A solução stock de DAPI (1,6 mg/ml) (*Sigma, EUA*) é diluída em água destilada para obter uma solução final (1 µg/ml);

6.1.5. Determinação do estado de metilação do ADN total de BY2 BTAH 4

Agarose 0,8%:

0,8% de agarose (*Nzytech, Portugal*);

10% de TBE 5x;

Perfazer com água destilada até aos 300ml, e aquecer a solução no micro-ondas até ficar homogénea. A mesma é armazenada a temperatura ambiente;

Solução TBE (Tampão Tris/Borato/EDTA) 5x:

Quantidade de reagentes para 1L de solução;

2,23M de Tris Base;

2,22M de ácido bórico (*Merck, EUA*);

2,5% de EDTA 0,2M pH 8;

TBE 0,5x: diluir 50ml da solução stock (TBE 5x) para um volume final de 500ml, e armazenar a temperatura ambiente;

Orange G (10x concentrado):

100mg de Orange G (*Sigma, EUA*);

15mL de Glicerol;

Perfazer com água destilada para 50mL e misturar bem. A solução é guardada a 4°C.

6.1.6. Determinação do grau de metilação do genoma total através do método do Dot blot

Azul de Metileno:

0,04% de Azul de Metileno (*Merck, EUA*);

5M de $C_2H_3NaO_2$ (Acetato de sódio) (*Fluka, EUA*);