



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

BEATRIZ BEZERRA DE MACÊDO

**DESENVOLVIMENTO DE UMA LINHAGEM DE *Komagataella phaffii* PARA
PRODUÇÃO RECOMBINANTE DA *PUMPKIN PHLOEM LECTIN* (PPL) DE
*Cucurbita maxima***

FORTALEZA

2024

BEATRIZ BEZERRA DE MACÊDO

**DESENVOLVIMENTO DE UMA LINHAGEM DE *Komagataella phaffii* PARA
PRODUÇÃO RECOMBINANTE DA *PUMPKIN PHLOEM LECTIN* (PPL) DE
*Cucurbita maxima***

Monografia apresentada à Graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal do
Ceará, como requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da
Rocha

Fortaleza

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M119d Macêdo, Beatriz Bezerra de.

Desenvolvimento de uma linhagem de *Komagataella phaffii* para produção recombinante da pumpkin phloem lectin (PPL) de *Cucurbita maxima* / Beatriz Bezerra de Macêdo. – 2025.
45 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2025.

Orientação: Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha.

1. Lectinas. 2. Expressão heteróloga. 3. Transformação genética. 4. Levedura. I. Título.

CDD 661

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Paula e Roberto, e ao meu irmão Arthur, as pessoas que mais amo no mundo. Saber que independente do que acontecesse eles estariam lá para me apoiar me deu força para enfrentar os obstáculos, até nos piores dias. Agradeço por todas as palavras de incentivo, o colo, a companhia e todo amor que vocês me deram até aqui.

À minha família em Natal-RN, avós, tios, tias, primos, primas, afilhada e agregados, que, apesar da distância geográfica, nunca deixaram de se fazer presentes em cada etapa da minha vida. Obrigada por acreditarem em mim mais do que eu mesma acredito.

Aos meus amigos mais antigos, da época do Ari de Sá. Em especial Camilla, Giovanna, Bia Cordeiro, Patrícia, Débora, Laura, Sarah, Marcela e Yasmim. Sou imensamente grata por todos os momentos compartilhados da infância até a vida adulta, a vida é mais leve quando estou com vocês.

Aos amigos mais recentes, que fiz na Biotec UFC, as velhas e a T11. Em especial Duda e Júlia, minhas parceiras para todos os momentos. Foram 5 anos intensos! Com vocês, aprendi e aprendo muito, vocês me estenderam a mão e não me deixaram desistir nos momentos de dificuldade. Amo muito cada um e torço infinitamente para o nosso sucesso nessa carreira.

A todos os meus colegas, que também viraram amigos, do Laboratório de Biocristalografia/GBME, em especial Leonardo, Gabriel, Roberta, Talita e Wallady, que estiveram bastante envolvidos nesse trabalho. Obrigada, por me guiarem nesse caminho com zelo e dedicação e por dividirem comigo as belezas e frustrações da ciência. Com vocês, aprendi que nenhum peso é tão pesado quando repartido.

Agradeço o Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha, pela excelente orientação e pelo tempo em que fui aluna de iniciação científica, de 2022 a 2025. Agradeço, também, ao Prof. Dr. André Coelho por toda a contribuição ao grupo e comentários generosos sobre esse trabalho.

Aos membros participantes da banca examinadora: Profa. Dra. Marjory Holanda e Dra. Talita Camila Nascimento agradeço pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

À Instituição CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de iniciação científica.

RESUMO

As lectinas são proteínas que têm a capacidade de ligar-se a carboidratos, de modo específico e reversível, podendo ser aplicadas em diversas áreas. A lectina de Floema de *Cucurbita maxima* (PPL) tem especificidade a quito-oligossacarídeos e RNA e está associada com mecanismos de defesa da planta contra pragas e patógenos. Contudo, a obtenção da proteína a partir do floema por métodos de purificação clássicos não apresenta alto rendimento, o que pode limitar futuras aplicações biotecnológicas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi a obtenção de uma linhagem de *Komagataella phaffii* geneticamente modificada para expressão recombinante da *Pumpkin Phloem Lectin* (PPL) de *Cucurbita maxima*. Para o desenho do vetor de expressão (SnapGene 6.1), a sequência gênica da PPL foi coletada no Uniprot e otimizada para *K. phaffii*. A sequência foi sintetizada pela Genone no vetor pPICZαA. Cepas de *Escherichia coli* TOP 10 foram transformadas para replicação, seguida de extração e linearização do DNA com Sac I. Células competentes de *K. phaffii* X-33 foram preparadas e transformadas por eletroporação. A análise dos transformantes foi feita por PCR e eletroforese em gel de agarose. Colônias foram selecionadas para teste de resistência à zeocina (100-2000 µg/mL). A expressão foi realizada em meio BMMY com metanol (1% e 2%) e, em um segundo teste, com sorbitol. Os sobrenadantes foram precipitados com sulfato de amônio (0-80%), dialisados e concentrados. A expressão foi analisada por atividade hemaglutinante e SDS-PAGE. Após a transformação genética foi observado ao fim do segundo dia de incubação a formação de colônias isoladas de *K. phaffii* X-33. A PCR de colônia mostrou bandas de 1150 pb, correspondentes ao gene AOX. No teste de resistência à zeocina, todas as colônias cresceram nas maiores concentrações. As análises por SDS-PAGE indicaram bandas no peso molecular esperado para a PPL, mas o ensaio de atividade hemaglutinante foi inconclusivo, pois proteínas do cultivo não transformado também apresentaram atividade. Assim, conclui-se que a transformação genética de *K. phaffii* foi bem-sucedida e que as colônias obtidas são aptas aos testes de expressão. A análise por SDS-PAGE sugeriu a presença da PPL, mas sem confirmação definitiva. Métodos mais específicos, como Western blot e espectrometria de massas, além da otimização das condições de cultivo, são alternativas para validar a expressão da PPL e viabilizar sua aplicação biotecnológica.

Palavras-chave: Aglutinina; Transformação Genética; *Pichia pastoris*.

ABSTRACT

Lectins are proteins that have the ability to bind to carbohydrates in a specific and reversible manner, making them applicable in various fields. The Pumpkin Phloem Lectin (PPL) has specificity for chito-oligosaccharides and RNA and is associated with the plant's defense mechanisms against pests and pathogens. However, obtaining the protein from the phloem using classical purification methods does not yield high quantities, which may limit future biotechnological applications. Therefore, the objective of this work was to obtain a genetically modified *Komagataella phaffii* strain for the recombinant expression of Pumpkin Phloem Lectin (PPL) from *Cucurbita maxima*. For the design of the expression vector (SnapGene 6.1), the gene sequence of PPL was collected from Uniprot and optimized for *K. phaffii* (Genscript). The sequence was synthesized by Genone in the pPICZaA vector (Invitrogen). *Escherichia coli* TOP 10 strains were transformed for replication, followed by extraction and linearization of the DNA with Sac I. Competent cells of *K. phaffii* X-33 were prepared and transformed by electroporation. The analysis of the transformants was performed by PCR and agarose gel electrophoresis. Colonies were selected for zeocin resistance testing (100-2000 µg/mL). Expression was carried out in BMMY medium with methanol (1% and 2%) and, in a second test, with sorbitol. The supernatants were precipitated with ammonium sulfate (0-80%), dialyzed, and concentrated. Expression was analyzed by hemagglutinating activity and SDS-PAGE. After genetic transformation, isolated colonies of *K. phaffii* X-33 were observed at the end of the second day of incubation. Colony PCR showed bands of 1150 bp, corresponding to the AOX gene. In the zeocin resistance test, all colonies grew at the highest concentrations. SDS-PAGE analyses indicated bands at the expected molecular weight for PPL, but the hemagglutinating activity assay was inconclusive, as proteins from the untransformed culture also showed activity. Thus, it is concluded that the genetic transformation of *K. phaffii* was successful and that the obtained colonies are suitable for expression testing. SDS-PAGE analysis suggested the presence of PPL, but without definitive confirmation. More specific methods, such as Western blot and mass spectrometry, along with optimization of cultivation conditions, are alternatives to validate PPL expression and enable its biotechnological application.

Keywords: Agglutinin; Genetic transformation; *Pichia pastoris*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------|---|
| AOX1 | Alcohol oxidase 1 |
| BleoR | Gene que confere resistência a Zeocina |
| BMGY | Buffered Glycerol-complex Medium |
| BMMY | Buffered Methanol-complex Medium |
| CPL | Cucurbita phloem exudate lectin |
| CRD | Carbohydrate Recognizing Domain |
| FLO10 | Proteína floculante FLO10 |
| GNA | Aglutinina de <i>Galanthus nivallis</i> |
| HHA | Aglutinina de <i>Hippeastrum hybrid</i> |
| kDa | Quilodaltons |
| LB | Meio de cultura Luria Bertani |
| MCS | Multiple Cloning Site |
| ORI | Origem de replicação |
| PCR | Reação da Polimerase em Cadeia |
| PMSF | Fluoreto de Fenilmetilsulfonila |
| PP1 | Phloem Protein 1 |
| PP2 | Phloem Protein 2 |
| PPL | Pumpkin Phloem Lectin |
| TCA | Ácido Tricloroacético |
| YPD | Meio de cultura contendo extrato de levedura, peptona e D-Glicose |

SUMÁRIO

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 10 |
| 1.1 | Lectinas vegetais: Histórico, Classificação e funções | 11 |
| 1.2 | <i>Pumpkin Phloem Lectin (PPL)</i> | 14 |
| 1.3 | Aplicações biotecnológicas das lectinas | 15 |
| 1.4 | Expressão heteróloga de proteínas | 17 |
| 2 | OBJETIVOS | 20 |
| 2.1 | Objetivo geral | 20 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 21 |
| 3 | METODOLOGIA | 21 |
| 3.1 | Desenho e obtenção do vetor de expressão | 22 |
| 3.2 | Preparo de células de <i>Escherichia coli</i> top 10 competentes | 22 |
| 3.3 | Replicação do vetor <i>ppiczaa+ppl</i> em <i>Escherichia coli</i> (top 10) | 23 |
| 3.4 | Extração de DNA plasmidial e linearização | 23 |
| 3.5 | Preparo de <i>Komagataella phaffii</i> x-33 competentes | 23 |
| 3.6 | Transformação da cepa <i>Komagataella phaffii</i> x-33 | 24 |
| 3.7 | Análise dos transformantes | 24 |
| 3.8 | Teste de resistência a zeocina | 25 |
| 3.9 | Indução da expressão da <i>ppl</i> em <i>K. phaffii</i> x-33 | 25 |
| 3.10 | Análise do teste de expressão | 26 |
| 3.10.1 | Preparo de amostras | 26 |
| 3.10.2 | Lise celular | 26 |
| 3.10.3 | Atividade hemaglutinante | 26 |
| 3.10.4 | Concentração de proteínas e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) | 27 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 28 |
| 4.1 | Construção e replicação do vetor de expressão em <i>Escherichia coli</i> | 28 |
| 4.2 | Transformação genética de <i>Komagataella phaffii</i> x-33 | 31 |
| 4.3 | Teste de resistência a zeocina | 32 |
| 4.4 | Análise dos testes de indução da expressão | 33 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4.5 | Análise da atividade hemaglutinante das amostras dos testes de expressão..... | 39 |
| 5 | CONCLUSÃO | 42 |
| 6 | PERSPECTIVAS | 43 |
| | REFERÊNCIAS | 44 |

1 INTRODUÇÃO

As lectinas são proteínas amplamente distribuídas pelos organismos vivos e desempenham atividades biológicas essenciais, atuando no reconhecimento celular, modulação do sistema imune, transporte e armazenamento de açúcares etc. (Chettri *et al.*, 2021; Van Damme *et al.*, 1998). Essas funções se devem principalmente pela presença de domínios de reconhecimento a carboidratos (CRDs) conferindo às lectinas a capacidade de se ligar, de forma específica e reversível a essas moléculas (Drickamer, 1988).

As lectinas vegetais têm sido estudadas há séculos e são um grupo de proteínas com elevado potencial biotecnológico. Entre elas, destacam-se as lectinas presentes no exsudato do floema, pertencentes ao grupo PP2, que possuem sítios de reconhecimento a quitina conservados (Bobbili *et al.*, 2018).

É relatado que essas lectinas desempenham funções importantes na planta, como defesa contra patógenos e pragas, participação no transporte de longa distância de RNAs com base na formação de complexos ribonucleoproteicos, e a formação de complexos de alto peso molecular no floema em conjunto com as proteínas PP1, o que auxilia na reparação rápida em casos de lesões vasculares (Furch; Zimmermann, 2013). Apesar de estarem em abundância no floema da família *Curcubitaceae*, existem poucos estudos relacionados à resolução das estruturas tridimensionais dessas lectinas, o que dificulta o estudo de seus mecanismos de ação.

Neste trabalho, a proteína alvo de estudo é a lectina do exsudato do floema de *Cucurbita maxima*, denominada PPL. Pertencente à família PP2, é uma proteína homodimérica, expressa pelas células companheiras do sistema vascular. Com uma massa molecular de 48 kDa e uma cadeia de 218 resíduos de aminoácidos, o estudo e caracterização da PPL é importante tanto para a compreensão dos mecanismos de defesa vegetal quanto para possíveis aplicações na biotecnologia agrícola (Bostwick *et al.*, 1992; Bostwick; Skaggs; Thompson, 1994).

Devido a localização desta proteína na planta, sua obtenção em altas concentrações a partir da retirada do tecido vegetal se torna dificultada. Porém, com o advento da tecnologia do DNA recombinante tornou-se possível estudar proteínas de difícil obtenção, a partir da expressão heteróloga. A *Komagataella phaffii*, conhecida como *Pichia pastoris*, é uma levedura comumente utilizada como sistema de expressão de proteínas recombinantes devido ao seu baixo custo em comparação a outras células eucarióticas, facilidade de manejo, capacidade de realizar modificações pós-traducionais, como glicosilação, e sua escalabilidade (Juturu; Wu, 2018), nesse contexto, que a *K. phaffii* foi escolhida como organismo modelo neste trabalho.

1.1 Lectinas vegetais: histórico, classificação e funções

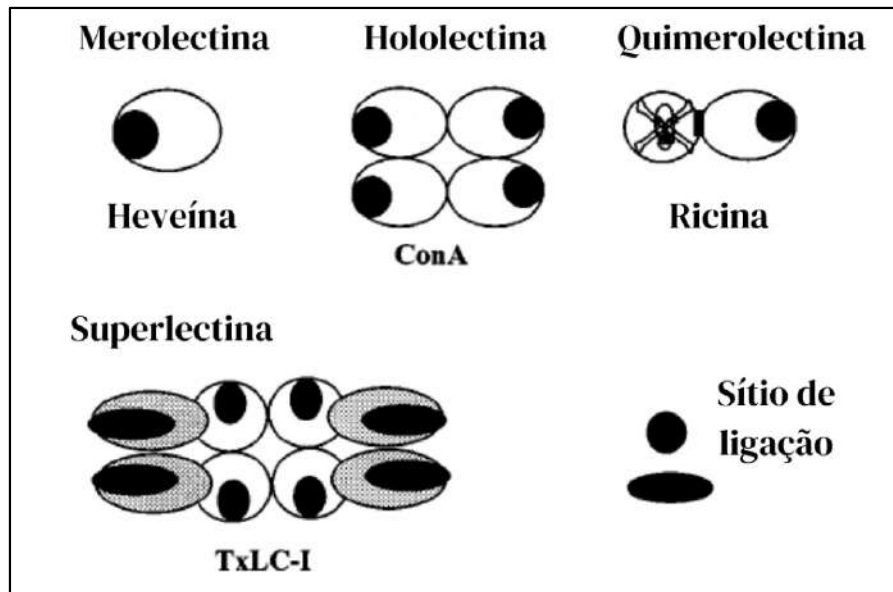
A descoberta da ricina, proteína tóxica isolada de *Ricinus communis*, realizada por Peter H. Stilmark em 1888, representou o marco do início do estudo das lectinas. Inicialmente elas foram denominadas de hemaglutininas por Elfstrand, em 1898 devido a capacidade de aglutinar eritrócitos. Desde então, inúmeras dessas moléculas foram identificadas e caracterizadas (Van Damme *et al.*, 2008).

A observação de que algumas hemaglutininas apresentavam seletividade a grupos sanguíneos do sistema ABO, levou a introdução do termo lectina, que deriva de “legere”, o verbo em latim para “selecionar” (Boyd; Reguera, 1949); Renkonen, 1948). Já a associação das propriedades das lectinas com a sua especificidade de ligação aos carboidratos só foi feita em 1952 por Watkins e Morgan (Van Damme *et al.*, 2008).

Denomina-se lectina, as proteínas que possuam, no mínimo, um domínio não catalítico que se liga reversivelmente e especificamente a mono ou oligossacarídeos (Peumans, Van Damme, 1995). A quantidade e organização desses domínios de reconhecimento a carboidratos (CRDs) permite uma classificação das lectinas. Dessa forma, são divididos dois grupos principais: as hololectinas, que possuem exclusivamente domínios de reconhecimento a carboidratos, e as quimerolectinas, que apresentam, além dos domínios lectínicos, outros domínios com funções independentes.

As hololectinas são subdivididas de acordo com a quantidade de CRDs. Quando possuem apenas um único domínio de reconhecimento, são classificadas como merolectinas, já as que apresentam dois ou mais CRDs, capazes de se ligar a diferentes tipos de sacarídeos, recebem a denominação de superlectinas (Van Damme *et al.*, 2008). Essa divisão está esquematizada na Figura 1.

Figura 1 - Classificação das lectinas por quantidade e organização de domínios de reconhecimento a carboidratos



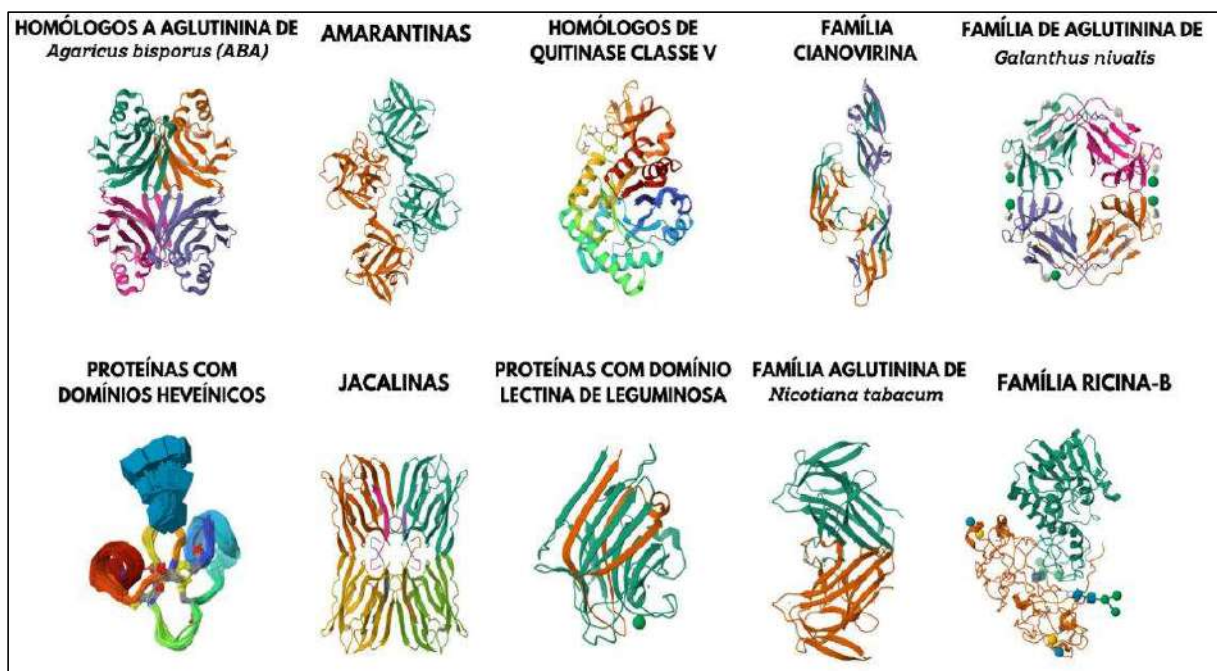
Fonte: Adaptado de Van Damme *et al.*, 1988. Representação esquemática da classificação das lectinas em Merolectinas, Hololectinas, Quimerolectinas e Superlectinas. Os exemplos são a heveína, a ConA, a Ricina (Uma lectina tóxica, inativadora de ribossomos) e a TxLC-I. Os círculos brancos e cinzas representam subunidades das proteínas, os círculos pretos representam os sítios de ligação a carboidratos, a caveira representa o sítio catalítico da ricina, responsável pela toxicidade.

No reino vegetal, as lectinas apresentam ampla distribuição taxonômica e funcional. Inicialmente, associava-se a elas apenas as funções de proteção contra pragas e patógenos e de reserva energética (Van Damme, 2022). No entanto, estudos recentes destacam papéis em outros processos biológicos dessas proteínas nas plantas, podendo desempenhar funções específicas dentro da célula vegetal ou na interação com outros organismos, como a transdução de sinais de estresse e a modulação da imunidade das plantas (Van Holle; Van Damme, 2018; Van Damme, 2022).

Por ser um grupo amplo e heterogêneo, as lectinas vegetais foram divididas em famílias. A classificação mais recente, feita em 2008, agrupa proteínas estruturalmente relacionadas e foi feita com base em dados de sequenciamento de proteínas e de clonagem de sequências de cDNA. As 12 famílias incluem: Homólogos a aglutinina de *Agaricus bisporus* (ABA); Amarantinas; homólogos de quitinase classe V; família cianovirina; família de aglutinina de *Euonymus heveinicus*; família de aglutinina de *Galanthus nivalis*; proteínas com domínios heveínicos; jacalinas; proteínas com domínio lectina de leguminosa; domínios LysM; Domínios heveínicos; família aglutinina de *Nicotiana tabacum*, e família Ricina-B.

A Figura 2 mostra as estruturas tridimensionais dos representantes das famílias, depositadas no Protein Data Bank, com ausência da Aglutinina de *Euonymus heveinicus* e domínios LysM, que não foram encontrados no banco de dados.

Figura 2 – Classificação das lectinas vegetais em famílias evolutivamente relacionadas.



Elaborado pela autora. Representação da estrutura tridimensional de lectinas pertencentes a cada família. Fonte: Protein Data Bank (IDs: 1Y2T, 1JLY, 4URI, 4J4E, 1NIV, 1T0W, 1KU8, 1BQP, 8QMG, 2AAI)

Dentre as lectinas da família Nictaba (aglutinina de *Nicotiana tabacum*), destacam-se as lectinas de floema do tipo PP2 (Phloem Protein 2), particularmente abundantes em membros da família Cucurbitaceae. Estas proteínas são expressas pelas células companheiras do tecido vascular e transportadas para o floema através dos plasmodesmos (Golecki *et al.*, 1999).

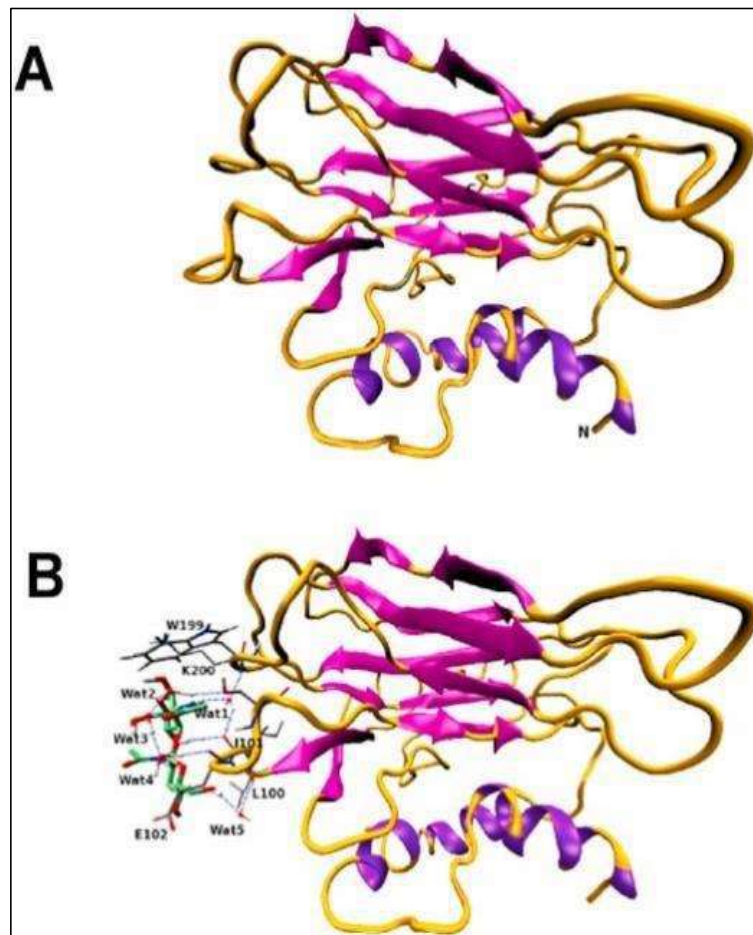
É relatado que as PP2 desempenham múltiplas funções biológicas, incluindo o transporte de RNAs ao longo do sistema vascular. As PP2 também são conhecidas por sua capacidade de formar complexos de alto peso molecular no floema com as proteínas PP1 através de pontes dissulfeto, contribuindo para a reparação rápida em casos de lesão vascular, protegendo contra a invasão de patógenos e herbívoros (Van Damme *et al.*, 2008). Estudos indicam que estas lectinas possuem afinidade por quitoooligossacarídeos, o que sugere sua ação de defesa nas interações planta-patógeno (Tsaneva; Van Damme, 2020; Van Damme *et al.*, 1998). Além disso, suas propriedades estruturais as tornam relevantes em pesquisas voltadas para o entendimento da dinâmica do floema e para potenciais aplicações biotecnológicas.

1.2 Pumpkin Phloem Lectin (PPL)

A lectina de floema de Abóbora (PPL, do inglês *Pumpkin Phloem Lectin*), é uma proteína do tipo PP2 amplamente presente no floema de *Cucurbita maxima*, com um papel associado ao transporte de macromoléculas e à defesa da planta (Bobbili *et al.*, 2014).

A PPL consiste em um homodímero, cujas subunidades possuem aproximadamente 24 kDa e contêm 218 resíduos de aminoácidos. Estudos de dicroísmo circular e modelagem molecular demonstram que a estrutura secundária dessa proteína é predominantemente composta por folhas β , conforme ilustrado na Figura 3 (Musti *et al.*, 2022).

Figura 3 - Modelo molecular da PPL e interação com quitobiase



Fonte: Adaptado de Narahari *et al.* (2011b).

(A) Modelo de homologia da PPL gerado pelo I-TASSER. (B) Quitobiase acoplada no sítio de ligação potencial da PPL. No modelo da PPL, as alfa-hélices estão representadas em roxo, as folhas beta em rosa e os loops em amarelo. Na quitobiase, o esqueleto de carbono está em verde, os oxigênios estão em vermelho e os hidrogênios ligados ao oxigênio estão em branco.

Além disso, a PPL apresenta afinidade por quito-oligossacarídeos. A termodinâmica dessa interação foi estudada por meio de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) e métodos computacionais. Os resultados indicaram que a quitotriose apresenta uma afinidade um pouco maior em comparação com a quitotetrose e a quito-pentose, enquanto a quito-hexaose demonstrou uma afinidade aproximadamente 40 vezes superior à da quitotriose (Narahari *et al.*, 2011).

Essa ligação é predominantemente impulsionada por entalpia, com contribuição entrópica negativa, indicando que as interações são estabilizadas por ligações de hidrogênio e forças de van der Waals (Narahari *et al.*, 2011; Musti *et al.*, 2022). Análises mutacionais realizadas por Bobbili *et al.* (2014) identificaram aminoácidos envolvidos nessa interação, determinando a presença de um sítio estendido de ligação a carboidratos. Nesse sítio, os aminoácidos Leu-100 e Glu-102 compõem o sítio primário; Ile-101, Ser-104 e Trp-105 compõem o sítio secundário; e Trp-199 e Lys-200 compõem o sítio terciário. No mesmo estudo, ensaios de calorimetria diferencial de varredura (DSC), aliados à análise do espectro de dicroísmo circular (CD), demonstraram que a PPL mantém sua atividade hemaglutinante inalterada em temperaturas entre 4 °C e 70 °C, sofrendo uma transição conformacional em seu enovelamento por volta de 81,5 °C (Bobbili *et al.*, 2014).

1.3 Aplicações biotecnológicas das lectinas

“Biotecnologia significa qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos, ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica”, segundo a Convenção sobre Diversidade Biológica e Legislação Correlata (2008, p. 25). Tendo isso em vista, ao longo dos últimos anos inúmeras lectinas têm sido aplicadas em áreas diversas da biotecnologia. Essas proteínas, devido a capacidade de interação com carboidratos e outras moléculas, têm se mostrado ferramentas úteis em diversas aplicações biotecnológicas, desde o campo da agricultura até a saúde humana.

O papel das lectinas vegetais em condições de estresse e defesa contra patógenos pode ser explorado para benefício de outras plantas na agricultura. Nesse sentido, estratégias biotecnológicas como super expressão ou knockout de genes e transformação genética de plantas podem ser aplicadas para aprimorar o desenvolvimento vegetal (Van Damme, 2022).

Devido às propriedades de ligação a carboidratos, lectinas também podem ser utilizadas como carreadores de moléculas. A aglutinina de *Galanthus nivalis* (GNA) por exemplo, pode carrear proteínas tóxicas facilitando o acesso delas à hemolinfa dos insetos, visto que interage com glicanos do trato gastrointestinal do animal. Sendo assim, a GNA vem sendo aplicada na formulação de biopesticidas (Van Damme, 2022).

Além disso, muitas lectinas têm propriedades interessantes para o campo da saúde. Islam *et al.* (2024) mostrou que a lectina do floema de *Cucurbita pepo* (CPL) apresenta atividade bactericida contra diferentes patógenos, antifúngica contra *Aspergillus niger* e capacidade de aglutinar esporos de *Aspergillus flavus*. Ademais, a CPL apresentou efeito antiproliferativo *in vivo* contra células de carcinoma ascítico de Ehrlich (EAC) em camundongos e inibiu o crescimento de células de câncer de mama (MCF-7) e pulmão (A-549) em ensaios *in vitro* (Islam *et al.*, 2024). Esses resultados demonstram o potencial das lectinas como agentes terapêuticos e reforçam a importância de estudos adicionais.

Ainda no âmbito da saúde humana, lectinas vegetais têm se destacado no estudo das infecções virais devido à capacidade de reconhecer e interagir com glicoproteínas da superfície dos vírus. Essas interações permitem o bloqueio da entrada do vírus nas células hospedeiras, impedindo sua replicação (Van Damme, 2022).

Um estudo observou que a exposição prolongada do HIV à Aglutinina de *Hippeastrum hybrid* (HHA) pode modificar o perfil de glicosilação da proteína gp120, resultando na perda de infectividade (Balzarini *et al.*, 2005). Além disso, a ligação das lectinas aos glicanos da superfície viral pode expor epítomos previamente mascarados, facilitando o reconhecimento pelo sistema imune (Van Damme, 2022).

1.4 Expressão heteróloga de proteínas

As proteínas são macromoléculas constituídas por cadeias de resíduos de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. Essas moléculas desempenham funções essenciais para todos os organismos, participando da estruturação, regulação e funcionamento das células. Em vista disso, o conhecimento da estrutura e função das proteínas é de extrema importância no entendimento dos processos biológicos, na descoberta de alvos para novos fármacos e biofármacos, na prospecção de moléculas de interesse biotecnológico, no diagnóstico de doenças, em aplicações em processos industriais, entre outras (Nelson; Cox; Hoskins, 2022).

“Para estudar detalhadamente uma proteína, o pesquisador deve ser capaz de separá-la de outras proteínas para obtê-la na forma pura; para isso, ele deve dispor de técnicas adequadas para determinar as propriedades da proteína. Os métodos necessários vêm da química de proteínas, disciplina tão antiga quanto a própria bioquímica e que mantém uma posição central na pesquisa bioquímica” (NELSON; COX; HOSKINS, 2022, p. 83).

Nesse contexto, diversas técnicas podem ser empregadas para obtenção de uma proteína pura. Uma delas parte da extração da proteína nativa diretamente dos tecidos ou órgãos de origem, utilizando métodos de lise celular, separação de proteínas por precipitação e/ou cromatografias, entre outros.

Tendo em vista a complexidade do floema das Cucurbitáceas, a obtenção de proteínas puras e em concentrações adequadas a partir do exsudato do floema é um desafio. Isso ocorre devido à mistura de componentes de diferentes células no exsudato, dificultando a separação das proteínas de interesse. Além disso, com o corte, as proteínas PP1 e PP2 se agregam rapidamente e bloqueiam os tubos crivados, tornando sua extração e análise mais complexas (Turgeon, 2016).

Uma alternativa para a obtenção e estudo das proteínas de floema é a expressão heteróloga, que envolve a inserção do gene codificante da proteína alvo em um organismo hospedeiro, o qual utiliza a própria maquinaria de síntese proteica para expressar a proteína recombinante. A escolha do organismo hospedeiro pode ser baseada nas vantagens e limitações, destacadas no Quadro 1.

Quadro 1 -Vantagens e desvantagens dos sistemas de expressão heteróloga de proteínas

| Organismo | Vantagens | Desvantagens |
|---|---|--|
| <i>Escherichia coli</i> | <ul style="list-style-type: none"> - Fácil manipulação e cultivo - Rápido crescimento - Baixo custo - Ampla diversidade de vetores - Escalonável | <ul style="list-style-type: none"> - Maioria das cepas incapazes de realizar modificações pós-traducionais - Enovelamento incorreto de proteínas recombinantes no citoplasma - Possibilidade de formação de corpos de inclusão |
| Leveduras (<i>Komagataella phaffii</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>) | <ul style="list-style-type: none"> - Fácil cultivo, manutenção e armazenamento - Podem expressar de forma eficiente moléculas eucarióticas complexas, como anticorpos - Realizam modificações pós-traducionais importantes - Escalonável | <ul style="list-style-type: none"> - Podem apresentar requerimento nutricional mais complexo - Pode haver hiperglicosilação - Proteases presentes no meio podem degradar a proteína antes da purificação, necessitando de inibidores |
| Células de insetos | <ul style="list-style-type: none"> - Fácil manipulação - Pode expressar de forma eficiente moléculas eucarióticas complexas - Realizam modificações pós-traducionais importantes | <ul style="list-style-type: none"> - Apresentam requerimentos nutricionais complexos - Cultivo e obtenção do produto demorados - Baixa escalabilidade - Proteases presentes no meio podem degradar a proteína antes da purificação, necessitando de inibidores |
| Organismo | Vantagens | Desvantagens |
| Células de mamíferos | <ul style="list-style-type: none"> - Geneticamente estáveis - Fácil manipulação e transformação, - Pode expressar de forma eficiente moléculas eucarióticas complexas - Realizam modificações pós-traducionais importantes - Escalonável | <ul style="list-style-type: none"> - Menor velocidade específica de crescimento - Apresentam requerimentos nutricionais complexos - Cultivo e obtenção do produto demorados - Alto custo - Proteases presentes no meio podem degradar a proteína antes da purificação, necessitando de inibidores |
| Células vegetais | <ul style="list-style-type: none"> - Pode expressar de forma eficiente moléculas eucarióticas complexas - Realizam modificações pós-traducionais importantes - Menor custo de produção de proteínas em relação a cultura de células de mamíferos. - Possibilitam um bom rendimento do produto expresso e tem escalonabilidade | <ul style="list-style-type: none"> - Baixa velocidade específica de crescimento - Apresentam requerimentos nutricionais complexos - Cultivo e obtenção do produto demorados - Proteases presentes no meio podem degradar a proteína antes da purificação, necessitando de inibidores |

Elaborado pela autora. Referência: (Mukhtar *et al.*, 2023)

A levedura *K. phaffii* tem se destacado como um dos principais sistemas de expressão para a produção heteróloga de proteínas recombinantes, sendo amplamente utilizada em pesquisas acadêmicas e aplicações industriais. Sua popularidade se deve a diversas vantagens em relação a outros sistemas, como a capacidade de crescimento em altas densidades celulares e a possibilidade de expressar proteínas tanto no meio intracelular quanto no meio extracelular (Unver; Dagci, 2024).

Além disso, *K. phaffii* apresenta um metabolismo aeróbico eficiente e um sistema de glicosilação que pode ser modificado para se assemelhar ao das células de mamíferos, tornando-a uma plataforma versátil para a produção de proteínas terapêuticas e industriais. Seu sistema de promotores, especialmente o promotor *AOX1*, permite uma indução forte e regulada pela presença de metanol, garantindo altos rendimentos de proteína recombinante. Para atender diferentes necessidades experimentais, diversas cepas mutantes foram desenvolvidas como a X-33, uma cepa prototrófica amplamente utilizada por apresentar alta eficiência na secreção de proteínas recombinantes e melhor adaptação a diferentes condições de cultivo (Juturu; Wu, 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Desenvolver uma linhagem de *Komagataella phaffii* geneticamente modificada para expressão recombinante da *Pumpkin Phloem Lectin* (PPL) de *Cucurbita maxima*.

2.2 Objetivos Específicos:

Transformar *K. phaffii* com o vetor de expressão contendo o gene da PPL;

Selecionar as linhagens de *K. phaffii* mais promissoras para produção de PPL.;

Avaliar a expressão da PPL em diferentes condições de cultivo.

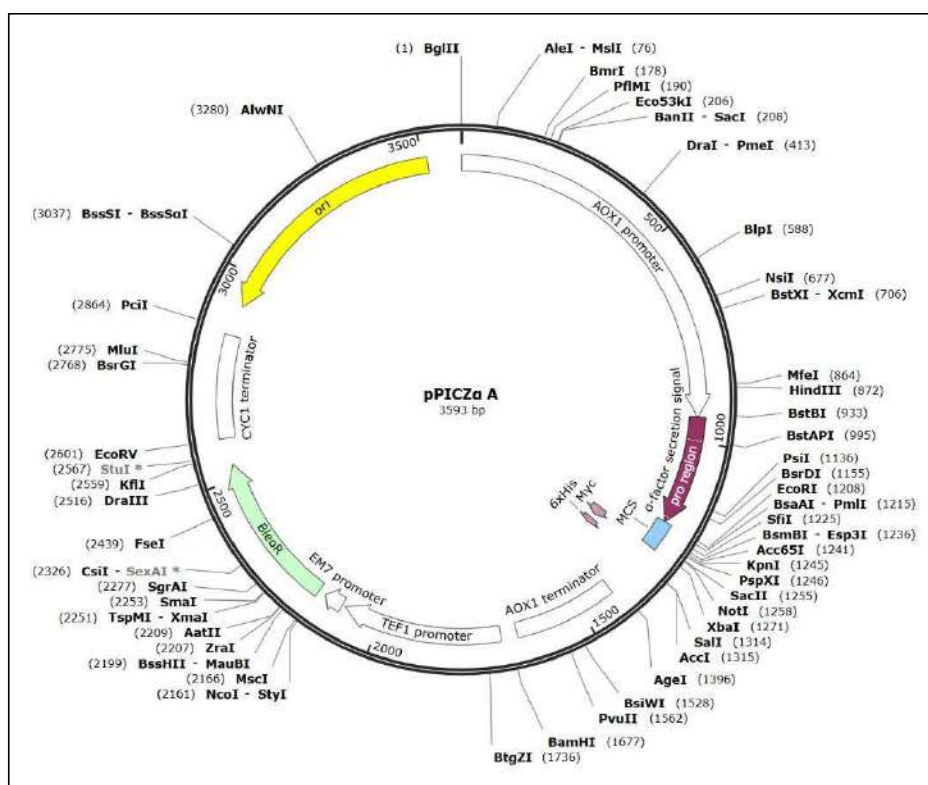
3 METODOLOGIA

Todas as atividades envolvendo organismos geneticamente modificados foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Molecular (LabBMol), localizado no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular situado no Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC). A UFC possui o Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) expedido pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). No CQB número 0102/99 (processo 01200.004129/98-53), que consta no Item XVII do Comunicado Número 77/CTNBio, publicado no Diário Oficial da União Número 52-E em 18/03/1999 (Seção 3, páginas 59-61), estão incluídas as instalações do LabBMol, que está autorizado a realizar atividades de pesquisa em regime de contenção com organismos geneticamente modificados do Grupo I (Nível de Biossegurança: NB-1). Assim, o LabBMol é uma das unidades operativas (R007-2016) que integram a CIBio-UFC, e tem como responsável técnico o Prof. André Luis Coelho da Silva (<http://www.cibio.ufc.br/index.php/pt-br/unidades-operativas#>).

3.1 Desenho e obtenção do vetor de expressão

Foi utilizado plasmídeo customizado para clonagem e expressão do gene-alvo referente à PPL. Para desenho do plasmídeo, a sequência de aminoácidos da proteína PPL, obtida no banco de dados UniProt (acesso: Q42383), foi otimizada para o códon usage da levedura *Komagataella phaffii*, organismo hospedeiro escolhido para a expressão recombinante, utilizando a ferramenta GenSmart Codon Optimization (GenScript). Em seguida a sequência foi inserida *in silico* com o uso da plataforma SnapGene no vetor de expressão pPICZαA, representado na Figura 4. O plasmídeo desenhado, denominado pPICZαA+PPL foi sintetizado pela empresa especializada GENONE.

Figura 4 - Plasmídeo pPICZ α A, utilizado na transformação genética de *K. phaffii*



Representação do plasmídeo pPICZ α A. Fonte: SNAPGENE. *pPICZ(α) A – Yeast Plasmids*.

3.2 Preparo de células de *Escherichia coli* TOP 10 competentes

Para replicação do gene-alvo foram utilizadas células quimio-competentes de *Escherichia coli* cepa TOP 10. Para preparo das células de *E. coli* competentes, seguiu-se metodologia descrita por Sambrook, 2012. Uma colônia de *E. coli* TOP 10 foi inoculada em 5 mL de meio caldo LB (Luria Bertani) mantido sob agitação (120 rpm, a 37 °C, *overnight*), após esse período, 1 mL desse pré-inóculo foi inoculado em 100 mL meio LB e agitado a 120 rpm, 37°C, até atingir DO_{600nm} entre 0,4 – 0,6. Em seguida, o cultivo foi centrifugado (5000 x g, 4 °C, 10 minutos) e o sobrenadante descartado. O pellet celular foi ressuscitado em 40 mL de MgCl₂ 0,1 M e a suspensão foi centrifugada (3000 x g, 4 °C, 10 minutos). O precipitado celular ressuscitado em 20 mL de CaCl₂ 0,1 M. A suspensão celular foi centrifugada (3000 x g, 4°C, 10 minutos) e o pellet foi novamente ressuscitado em 2 mL de CaCl₂ (0,1 M) e foi adicionado glicerol para concentração final 25% para proteger as células do congelamento. As células foram aliquotadas em tubos de 1,5 mL, previamente gelados e estocadas a -80 °C.

3.3 Replicação do vetor *pPICZαA+PPL* em *Escherichia coli* (TOP 10)

Para replicação do vetor de expressão, foi realizado o protocolo de transformação de *E. coli* TOP 10 por choque térmico seguindo metodologia descrita por Green; Sambrook, (2012). Para preparo da reação em um microtubo utilizou-se 50 µL de células competentes e 50 ng de plasmídeo que foi incubado em gelo por 30 min. Posteriormente, o microtubo foi incubado a 42 °C por 1 minuto e 30 segundos e depois, incubado no gelo por 1 minuto. Para a regeneração, adicionou-se 1 mL de caldo LB às células, que foram imediatamente incubadas a 37 °C, sob agitação de 200 rpm, por 1 h. As bactérias foram plaqueadas em meio LB ágar contendo ampicilina (100 µg/mL) e mantidas em estufa a 37 °C, overnight.

3.4 Extração de DNA plasmidial e linearização do plasmídeo

Uma colônia isolada de *E. coli*, transformada com o plasmídeo *ppiczαA+PPL* foi inoculada em 5 mL de caldo LB e incubada (37°C, 180 rpm, overnight). Após o crescimento, a cultura foi utilizada para extração do DNA plasmidial utilizando o kit comercial QIAprep Spin Miniprep Kit da empresa QIAGEN. Após a extração do DNA plasmidial a amostra foi quantificada em espectrofotômetro NanoDrop e concentrada a 1 µg/µL. O DNA plasmidial foi linearizado utilizando a enzima de restrição Sac I (Promega), seguindo as recomendações do *Data Sheet*.

3.5 Preparo de *Komagataella phaffii* X-33 competentes

Células de *K. phaffii* X-33 foram inoculadas em meio YPD ágar a 30 °C por 48 h. Para preparo do pré-inóculo, uma colônia foi inoculada em 5 mL de YPD, e a cultura incubada a 30 °C, 180 rpm até atingir uma DO_{600nm} entre 1,5 e 3,0. A partir do pré-inóculo fez-se a diluição com meio YPD até atingir 50 mL de cultura a uma D.O de 0,6, o qual foi incubado nas mesmas condições do pré inóculo, por 4 horas, até atingir DO_{600nm} entre 1,3 - 1,5.

Quando o inóculo atingiu o crescimento esperado, aplicou-se o protocolo para obtenção de células competentes adaptado de Joan Lin-Cereghino *et al.*, (2022). Nesse sentido, a cultura foi centrifugada (500 x g, 5 minutos, 25 °C), e o pellet foi ressuscitado em 10 mL de solução BEDS com Ditioneitol (DTT) gelada.

Após incubação (30 °C, 100 rpm, 5 minutos), a cultura foi novamente centrifugada (500 x g, 5 minutos, 25 °C), o pellet ressuspensionado em 1 mL de BEDS. As células competentes foram aliqüotadas e armazenadas a -80 °C.

3.6 Transformação da cepa *Komagataella phaffii* X-33

Para a etapa de transformação genética, 40 µL de células competentes foram combinadas com 4 µL do plasmídeo *pPICZαA*+PPL (80 ng/µL), linearizado. A mistura foi depositada na cubeta de eletroporação e incubada no gelo por 5 minutos. Posteriormente, as células foram eletroporadas a 1500 V no eletroporador (Eppendorf Mastercycler). Para etapa de regeneração das células, foi adicionado 1 mL de meio YPD contendo Sorbitol 1 M, e incubadas a 30 °C, 180 rpm, por 1 hora. As células regeneradas foram plaqueadas em meio YPD ágar, contendo zeocina (100 µg/mL), e incubadas a 30 °C por 3 dias.

3.7 Análise dos transformantes

Para análise e seleção das colônias transformadas foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para cada reação de PCR, foram utilizados 0,5 µL de enzima DNA-polimerase Taq (5 U/µL, Sigma-Aldrich); 2,5 µL de tampão de reação 10X para PCR contendo MgCl₂ (100 mM de Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM de KCl; 15 mM de MgCl₂; 0,01% de gelatina; Sigma-Aldrich); 0,5 µL de dNTPs (10 mM); 2,5 µL do iniciador 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3' (5' AOX1 *sequencing primer*); 2,5 µL do iniciador 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3' (3' AOX1 *sequencing primer*); 16,5 µL de água ultrapura livre de nucleases. O volume final da reação foi de 25 µL. Foi coletada uma fração de cada colônia e adicionada a cada reação.

A reação ocorreu por 30 ciclos de 94 °C/30 segundos, 55 °C/40 segundos, 72 °C/50 segundos e um último ciclo de extensão a 72 °C/5 minutos. Os produtos de amplificação foram submetidos ao fracionamento eletroforético em gel de agarose 1%. Após a adição de tampão de amostra (6X) para DNA (0,25% azul de bromofenol; 0,25% etilenoglicol; 30% de glicerol em H₂O) contendo GelRed, os fragmentos foram fracionados no gel em TAE 1X (0,04 M Tris-acetato; 0,001 M EDTA). Os DNAs fracionados no gel foram observados em luz ultravioleta (U.V.).

3.8 Teste de resistência a zeocina

Para a realização do teste de resistência ao antibiótico de seleção seguiu-se a metodologia descrita no *Data Sheet* do EasySelect™ Pichia Expression Kit (Invitrogen). Foram selecionadas quatro colônias de *K. phaffii* X-33 transformadas (C1, C2, C3 e C4). As colônias selecionadas foram inoculadas em 5 mL de meio YPD + zeocina 100 µg/mL e cultivadas a 30 °C, 180 rpm, por 24 h. Para o teste foram preparadas 4 placas contendo meio YPD ágar + zeocina (200, 500, 1000 e 2000 µg/mL). Cada placa foi dividida em 4 quadrantes e em cada quadrante foi inoculado 3 µL das culturas C1, C2, C3 e C4. As placas foram incubadas a 30 °C, por 3 dias.

3.9 Indução da expressão da PPL em *K. phaffii* X-33

A célula transformada contendo o gene da PPL resistente à zeocina foi inoculada em 20 mL de meio BMGY (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,0, 13,4 g/L de YNB, 4×10^{-5} g/L de biotina e 10 g/L de glicerol). E pré-inóculo o foi incubado a 30 °C, 180 rpm, por 24 h, até que a DO_{600nm} estivesse entre 1,5 e 3,0. centrifugado a 3000 rpm, 25°C. As células lavadas com água destilada estéril, centrifugadas (condições), em seguida foram ressuspensas em 150 mL de meio BMMY (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,0, 13,4 g/L de YNB, 4×10^{-5} g/L de biotina), com concentrações de metanol de 1% e 2%. As culturas foram mantidas a 28°C, 180 rpm, por 96 horas. Durante esse período, diariamente foi adicionado metanol PA 1% e 2% no meio. Durante o período de 96 horas foram retiradas alíquotas de 1 mL a cada 24 horas para análise da expressão. As alíquotas foram centrifugadas a 5000 x g, 25 °C, em seguida o sobrenadante e o pellet foram estocados a -80 °C. Para o segundo teste condição de indução da expressão, o mesmo processo foi realizado, no entanto com o acréscimo Sorbitol 1% ao meio BMMY (1% de metanol), diariamente.

3.10 Análise do teste de expressão

3.10.1 Preparo de amostras

Após a indução da expressão, os cultivos foram centrifugados a 10.000 x g, por 5 minutos, a 25°C, separando o sobrenadante do pellet celular. Os pellets foram armazenados a -20 °C, e os sobrenadantes foram submetidos à precipitação fracionada com sulfato de amônio na faixa de 0 a 80% de saturação. O sal foi adicionado gradualmente, sob agitação constante banho de gelo. A solução permaneceu sob agitação no gelo, overnight. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 16.000 x g, por 15 minutos, a 4 °C, e o precipitado obtido foi ressuspensionado em 1 mL de água destilada. Esta solução foi dialisada em membrana de diálise com poros de 12 kDa, em volume de 1:2000 e trocas com intervalos de 2 horas. Após esse processo, o dialisado foi submetido a concentração em ultrafiltro de centrífuga.

3.10.2 Lise celular

Visando analisar as proteínas intracelulares, foi feita uma etapa de lise celular. Os pellets celulares de *K. phaffi* obtidos na etapa 3.7.1 foram ressuspensos em 100 µL de Tampão de lise (50 mM de fosfato de sódio; pH 7,4; 1 mM de PMSF; 1 mM de EDTA; 5% de glicerol), e em seguida adicionou-se à suspensão celular um volume equivalente de microesferas de vidro (0,5 mm). As células foram lisadas com 8 ciclos de agitação em vórtex por 30 segundos, intercalada com incubação no gelo por 30 segundos. Os debris celulares foram removidos por centrifugação (10.000 x g, 10 min, a 4 °C), e os sobrenadantes contendo as proteínas solúveis foram transferidos para um novo microtubo, identificados e armazenados a -20 °C.

3.10.3 Atividade Hemaglutinante

As alíquotas coletadas nos diferentes tempos da expressão, bem como a amostra concentrada após o processo de diálise e o lisado das células, foram submetidas ao ensaio de atividade hemaglutinante. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, onde foram adicionados 50 µL de eritrócitos de coelho a 3% (v/v), 50 µL de solução de NaCl 0,15 M e 50 µL da amostra, totalizando um volume final de 150 µL por poço. As amostras foram testadas em triplicata.

Como controle positivo, utilizou-se a proteína frutalina, enquanto a água foi empregada como controle negativo. As placas foram incubadas por 30 minutos, a 30 °C, e a presença de hemaglutinação foi avaliada visualmente.

3.10.4 Concentração de proteínas e Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para concentrar as proteínas do sobrenadante, foi realizada uma precipitação com ácido tricloroacético (TCA), garantindo a remoção de contaminantes e permitindo uma melhor visualização das bandas proteicas.

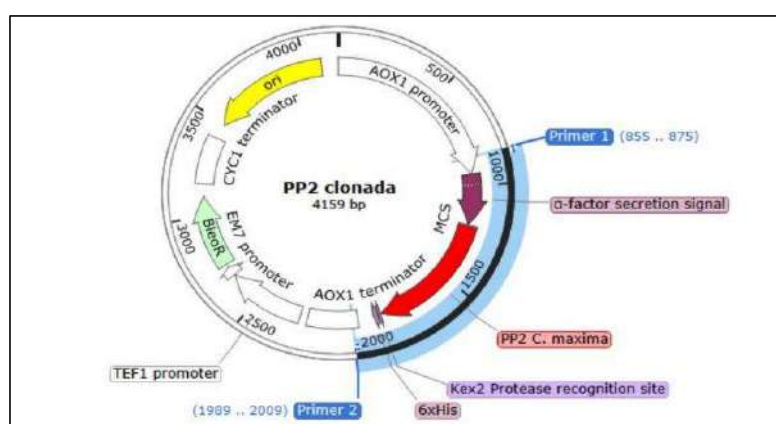
Os ensaios em PAGE (sob condições desnaturante e desnaturante/redutora) para análise do perfil de expressão de proteínas nos diferentes tempos (12, 24, 48, 72 e 96 horas) foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970) em gel de poliacrilamida a 12%. As bandas proteicas foram coradas com Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,05%, preparado em uma solução de metanol:ácido acético:água (1:3,5:8, v/v/v).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Construção e replicação do vetor de expressão em *Escherichia coli*

A construção do vetor de expressão pPICZ α A com o gene da proteína PPL foi realizada visando a produção heteróloga da enzima em *Komagataella phaffii* e o esquema pode ser visualizado na Figura 5.

Figura 5 - Vetor de expressão ppicz α A + PPL



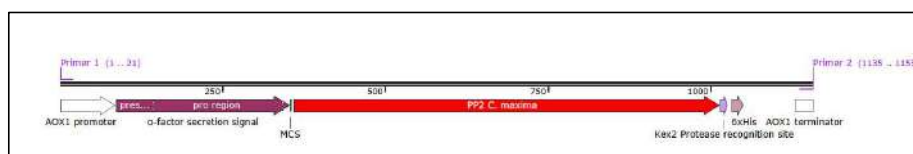
Fonte: elaborado pela autora.

A escolha do vetor pPICZ α A para a expressão de proteínas recombinantes em *K. phaffii* é amplamente justificada por suas características funcionais e vantagens técnicas. Esse vetor utiliza o promotor AOX1, que é forte e regulável por metanol, permitindo um controle da expressão gênica e altos níveis de produção proteica (CREGG *et al.*, 2000). Além disso, o pPICZ α A contém o sinal de secreção α -factor, que direciona a proteína para o meio extracelular, facilitando sua purificação (DALY; HEARN, 2005). A presença de um gene de resistência à zeocina permite a seleção de clones transformados, garantindo eficiência no processo de transformação (INVITROGEN, 2002).

Com o objetivo de aumentar a eficiência da expressão gênica da PPL, o gene que codifica essa proteína foi submetido à otimização de códons, ajustando-se sua sequência nucleotídica ao viés de uso de códons preferenciais da *K. phaffii*. Como exposto por Quax *et al.* (2015), o viés de códons desempenha um papel crucial na regulação da expressão gênica, influenciando diretamente a eficiência e a precisão da tradução. Ao adaptar os códons da PPL para *K. phaffii*, pretende-se maximizar a taxa de tradução.

A localização exata dos primers, utilizados nas etapas de confirmação de clonagem, no vetor está destacada na Figura 5, onde o **Primer 1** (5' AOX1) está posicionado na região do promotor AOX1 e o **Primer 2** (3' AOX1) na região do terminador *AOX1*. A Figura 6, gerada por simulação de PCR, é a representação do produto amplificado, destacando o tamanho esperado do amplicon e as regiões incluídas.

Figura 6 - Simulação de PCR com os primers AOX1



Fonte: elaborado pela autora. Representação do produto de PCR.

Com o objetivo de replicar o gene em bactérias foi realizada a transformação de células de *E. coli* TOP 10. A Figura 7 mostra o crescimento de colônias isoladas da bactéria em meio LB ágar + ampicilina (100 ug/uL), após a transformação.

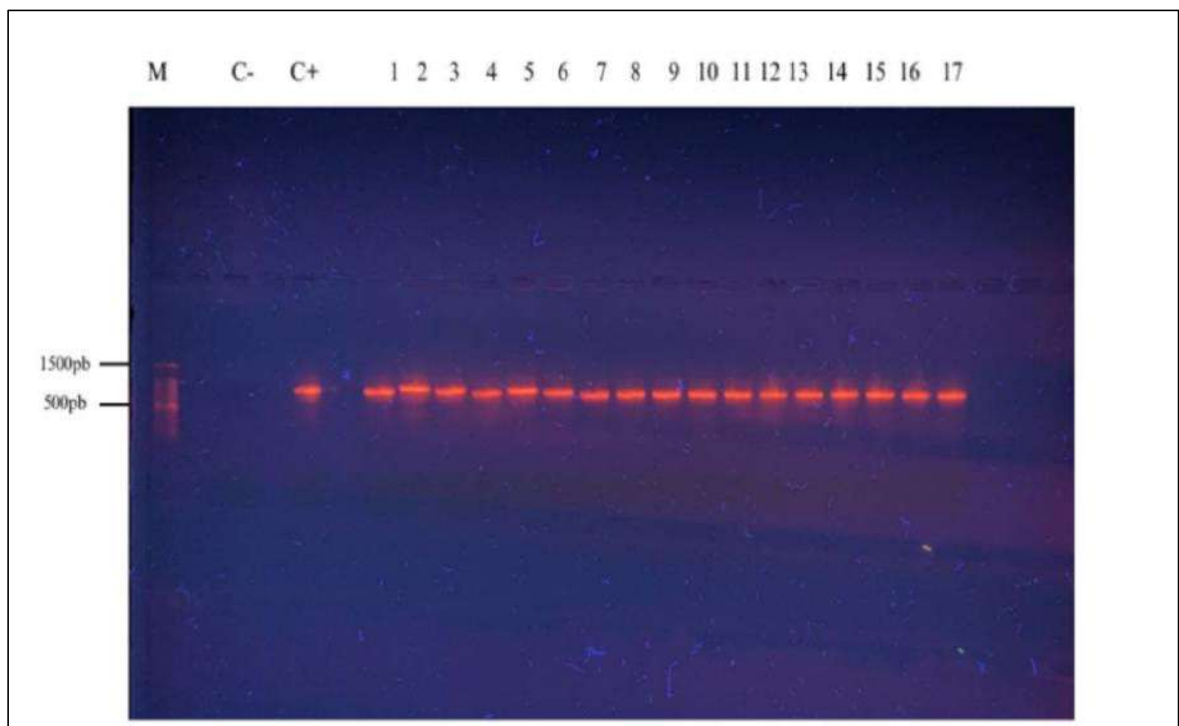
Figura 7 - Placas com *E. coli* Top10 transformada com pPICZαA + PPL



Fonte: elaborado pela autora. *E. coli* transformada pPICZαA + PPL em placa com meio LB ágar + zeocina;

Para confirmar a transformação utilizou-se a técnica de PCR para amplificar a região codificadora do gene AOX1 presente no DNA extraído das colônias. Os produtos de PCR foram visualizados após separação em gel de agarose 1%. Na figura 8 é possível visualizar a presença de fragmentos de DNA com tamanho aparente de 1150 pb, correspondentes à amplificação do gene AOX presente no plasmídeo, confirmando que todas as colônias selecionadas continham o plasmídeo pPICZαA + PPL.

Figura 8 - Análise de Transformação de colônias de *E. coli* por Eletroforese em gel de agarose (1%)



Fonte: elaborado pela autora.

M: Marcador de peso molecular da Promega (100pb - 1000pb, com banda adicional de 1500pb);

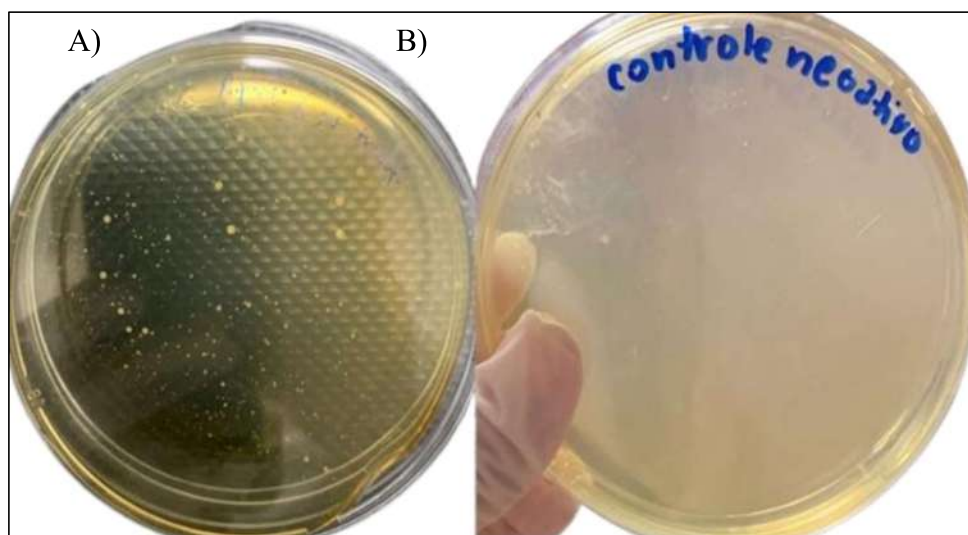
C-: Controle negativo; C+: Controle positivo, com adição de 0,5 µL do vetor pPICZαA;

1-17: Produtos de PCR de colônias isoladas obtidas da placa.

4.2 Transformação genética de *Komagataella Phaffii* X-33

Após a transformação, foi possível visualizar a formação de colônias isoladas de *K. phaffii* X-33 (Figura 9A).

Figura 9 – Placas com meio YPD após inoculação de *K. phaffii* transformada

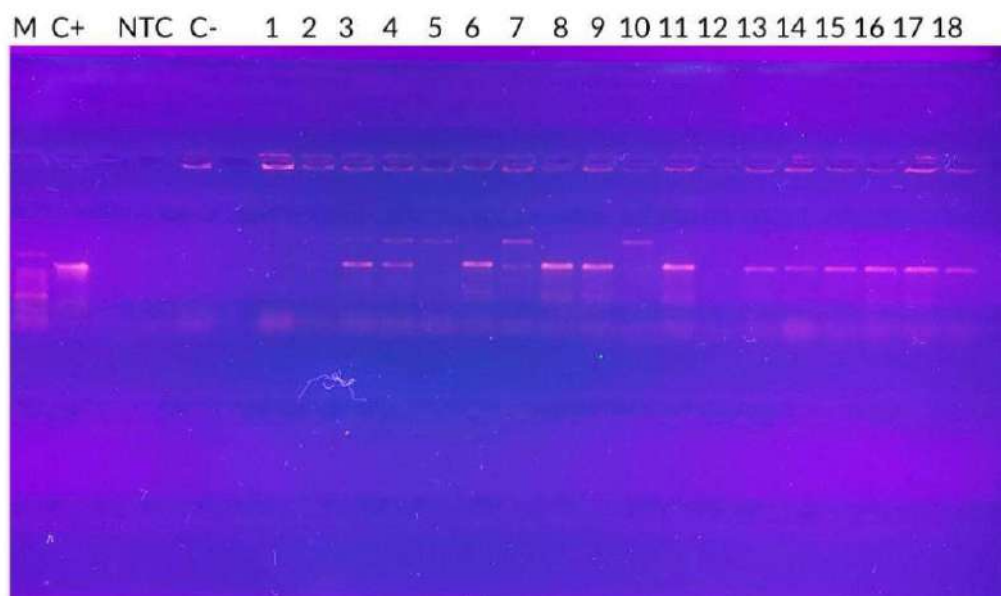


Fonte: elaborado pela autora.

- A) Colônias de *K. phaffii* X-33 transformadas crescidas em meio YPD + zeocina (100 mg/mL);
B) Controle negativo (não foi inoculado).

Para confirmar a transformação utilizou-se a técnica de PCR para amplificar a região codificadora do gene AOX1 presente no DNA extraído das colônias. Os produtos de PCR foram visualizados após separação em gel de agarose 1%. Na figura 10 é possível visualizar a presença de fragmentos de DNA com tamanho aparente de 1150 pb, correspondentes à amplificação do gene AOX presente no plasmídeo, confirmando que 13 das 18 colônias continham o plasmídeo pPICZαA + PPL.

Figura 10 – Análise de Transformação de colônias de *K. phaffii* por Eletroforese em gel de agarose (1%)



Fonte: elaborado pela autora.

M: Marcador 100pb (100-1000 + banda de 1.5kpb); C+: ppiczA+PPL; NTC: No template control; C-: *Komagataella phaffii* X-33 não transformada; 1 a 18: colônias 1 a 18.

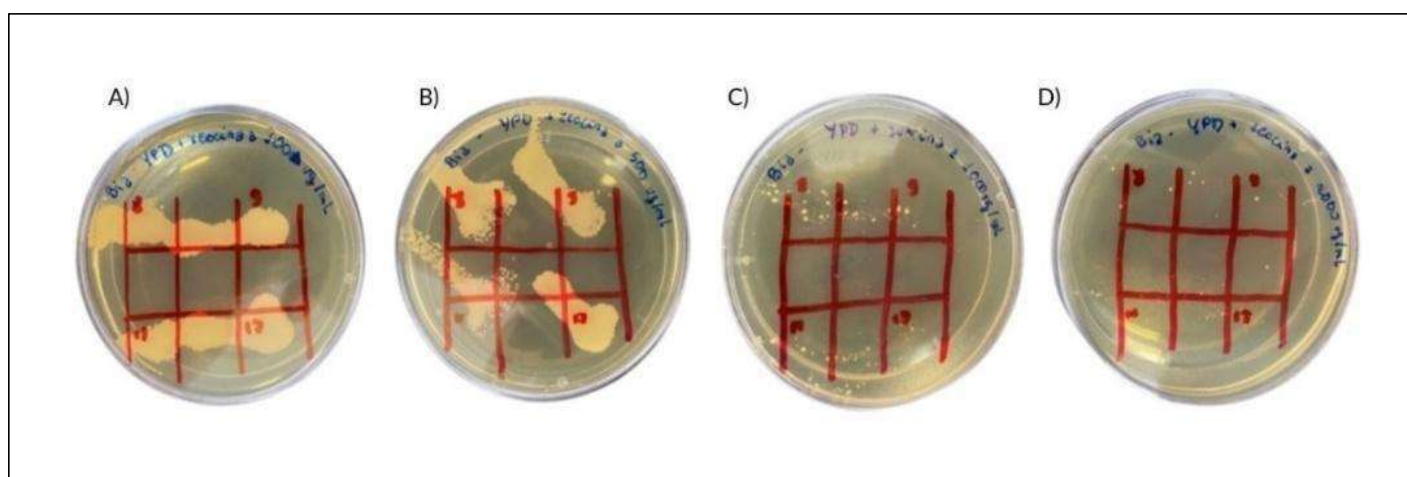
O crescimento de algumas colônias em placas contendo zeocina, sem a amplificação correspondente ao tamanho esperado do vetor pPICZαA, pode ser explicado. Embora essas colônias apresentem resistência ao antibiótico, a ausência da banda sugere que o vetor pode não ter sido integrado no locus AOX1 de forma estável ou completa. Assim, as bandas menos intensas observadas no gel de agarose, podem corresponder à amplificação do gene AOX1 nativo de *K. phaffii*, indicando que a recombinação homóloga não ocorreu como esperado. Isso pode acontecer devido à integração episomal (não genômica) do vetor ou à recombinação em loci não específicos, que não garantem a expressão controlada pelo promotor AOX1 (CREGG et al., 2000; INVITROGEN, 2002).

4.3 Teste de resistência à zeocina

A partir da visualização das placas, foi possível confirmar o crescimento das 4 colônias testadas (colônias 8, 9, 13 e 17), nas diferentes concentrações de zeocina (Figura 8), após 3 dias de inoculação. Esse teste, é uma etapa importante para garantir a seleção de clones com integração estável e múltiplas cópias do vetor de expressão no genoma.

Segundo Cregg *et al.* (2000), a resistência a concentrações elevadas de zeocina está diretamente associada à integração de múltiplas cópias do vetor, o que resulta em níveis mais altos de expressão da proteína recombinante. Além disso, esse teste permite eliminar falsos positivos, como células que podem ter adquirido resistência parcial ao antibiótico, mas que não integraram o vetor de forma estável (INVITROGEN, 2002). Sendo assim, esse resultado confirmou que qualquer uma dessas colônias é candidata adequada aos testes de expressão da proteína recombinante. A colônia escolhida para seguir para as demais etapas foi a colônia 17.

Figura 11 – Placas com concentrações crescentes de zeocina inoculadas com colônias de *K. phaffii* transformadas



Fonte: elaborado pela autora.

A: Placa com YPD + zeocina (100 µg/mL); B: Placa com YPD + zeocina (500 µg/mL);
C: Placa com YPD + zeocina (1000 µg/mL); D: Placa com YPD + zeocina (2000 µg/mL).

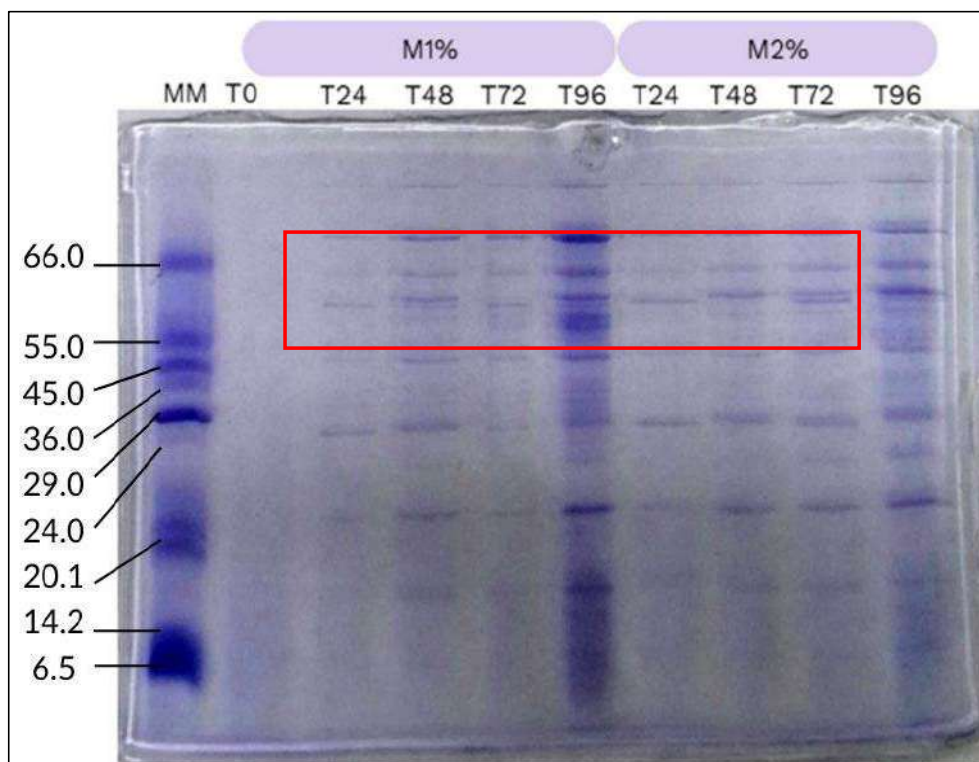
4.4 Análise dos testes de indução da expressão

A análise teve como objetivo a avaliação qualitativa da expressão da proteína de interesse ao longo do tempo, comparando os diferentes pontos coletados. A Figura 12 mostra o gel de SDS-PAGE das amostras coletadas em diferentes tempos de indução de expressão, precipitadas com TCA, evidenciando o padrão de bandas nas condições analisadas no primeiro teste de expressão. Em ambas as condições (1% e 2% de metanol), observa-se bandas nas faixas de 24 a 29 kDa e 45 a 55 kDa, com intensidades aumentando gradualmente ao longo do tempo.

Bobilli *et al.* (2014) relataram a expressão recombinante de PPL em *K. phaffii* e análise por SDS-PAGE. Os autores observaram o aparecimento de duas bandas com massas moleculares de aproximadamente 26 kDa e 28 kDa, valores compatíveis com a massa molecular calculada a partir da sequência primária da PPL, considerando a adição de um epítipo **c-myc** e uma cauda de histidina na proteína recombinante.

Embora as bandas que destacadas no gel possam corresponder à PPL recombinante, em forma de dímero (aproximadamente 48 kDa) ou monômero (aproximadamente 24 kDa), essa associação não pode ser confirmada unicamente com base no peso molecular. Isso ocorre porque o secretoma de *K. phaffii* em culturas induzidas por metanol apresenta uma variedade de proteínas nativas que também podem migrar para faixas de peso molecular semelhantes. Nesse sentido, Huang *et al.* (2011), destaca a identificação de uma diversidade de proteínas secretadas por *K. phaffii* em culturas induzidas por metanol, incluindo proteínas associadas à parede celular, como glucanases e proteínas de manutenção da parede celular, que possuem pesos moleculares na faixa de 24 a 48 kDa.

Figura 12 - Análise do teste de indução da expressão utilizando meio BMMY (Metanol 1%) e BMMY (Metanol 2 %)



Fonte: elaborado pela autora.

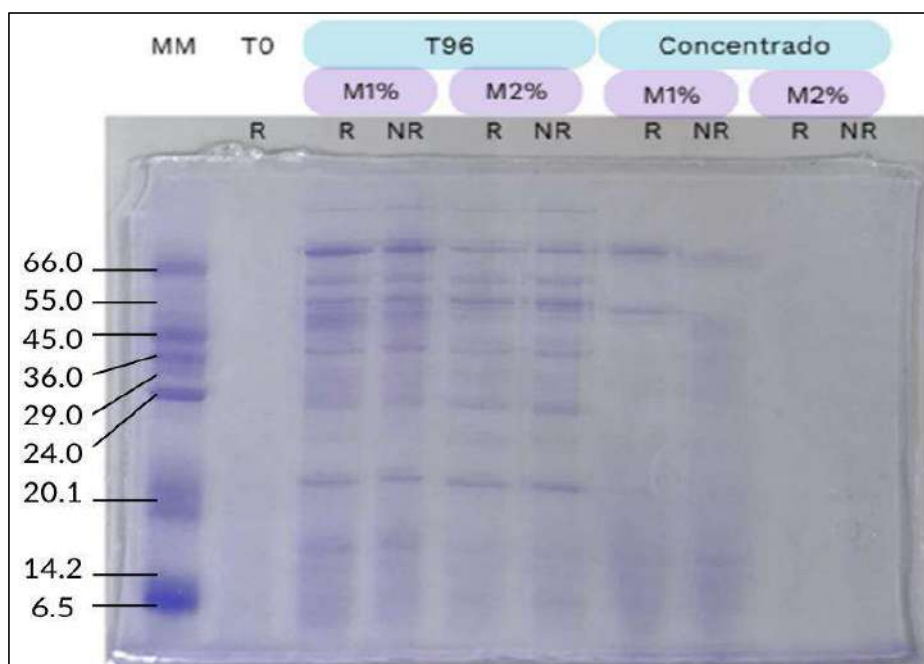
MM: Marcador de peso molecular (unidade kDa). T0 a T96: Amostras do sobrenadante ao longo do tempo de expressão em horas; M1 e M2: cultivos de 1% e 2% de metanol.

Para investigar a possível expressão da PPL recombinante, as amostras do tempo final foram analisadas em condições redutoras e não redutoras, o resultado pode ser visualizado na Figura 13. Caso a proteína estivesse presente, esperava-se a visualização de uma banda em torno de 48 kDa na condição não redutora, enquanto na condição redutora, a quebra das pontes dissulfeto que liga os monômeros, levaria ao aparecimento de uma banda mais intensa em aproximadamente 24 kDa. No entanto, não há uma diferença expressiva no padrão de bandas entre as condições redutoras e não redutoras.

Além disso, as amostras finais precipitadas, dialisadas e concentradas também foram avaliadas, no intuito de comparar o perfil eletroforético com as que não passaram apenas por precipitação com TCA. Com isso, esperava-se observar uma menor variedade de bandas, já que as proteínas foram precipitadas numa fração de 0 a 80%, porém com bandas mais evidentes.

Entretanto, pode-se visualizar na Figura 13 que na condição de 1% de metanol houve a prevalência de 2 bandas, uma acima de 66 kDa e outra acima de 45 kDa, ambas com intensidade parecida às amostras precipitadas com TCA. Já na condição de 2% de metanol percebe-se uma ausência de bandas. Esse resultado sugere que o tratamento dessas amostras pode ter gerado uma perda maior de proteínas solúveis, dificultando a visualização no gel.

Figura 13 - Análise das amostras finais do 1º teste de expressão de PPL por SDS-PAGE



Fonte: elaborado pela autora.

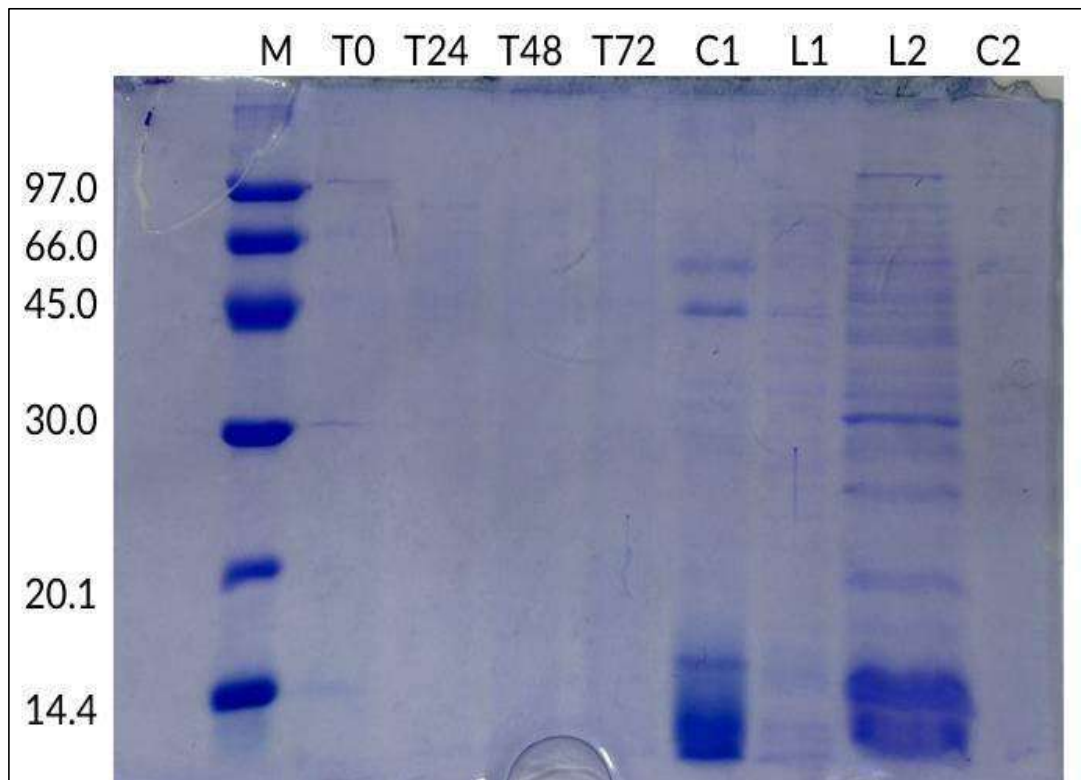
MM: Marcador Molecular (unidade kDa); T0: Tempo inicial; T96: Tempo final;

Concentrado M1%: Amostra da condição de 1% de metanol concentrada; Concentrado M2%: Amostra da condição de 2% de metanol concentrada; R: Condição Redutora; NR: Condição Não Redutora.

Para avaliar a possível expressão da PPL recombinante, as amostras do segundo teste, que consistiu na utilização do meio BMMY com 1% de metanol e 1% de sorbitol, foram analisadas por SDS-PAGE em condições redutoras e não redutoras, conforme ilustrado nas Figuras 14 e 15, respectivamente. A análise das amostras coletadas ao longo do tempo de expressão não revelou bandas evidentes, o que sugere que a precipitação com TCA pode não ter sido eficiente para a concentração das proteínas. A ausência de bandas distintas poderia indicar também baixos níveis de expressão, degradação proteica ou dificuldades na solubilização da proteína durante o processo de extração e precipitação.

Por outro lado, a amostra concentrada, representada na figura por “C1”, revelou as mesmas duas bandas identificadas no primeiro teste: uma acima de 66 kDa e outra acima de 45 kDa, ambas presentes tanto nas condições redutora quanto não redutora, levando a crer que a ausência de bandas nas amostras T0 a T72 se deu por uma falha do método e não por uma degradação das proteínas no sobrenadante do cultivo. Na amostra concentrada correspondente ao sobrenadante do cultivo de *K. phaffii* não transformada, representada na figura por “C2”, a visualização de bandas também foi comprometida, dificultando a interpretação dos resultados.

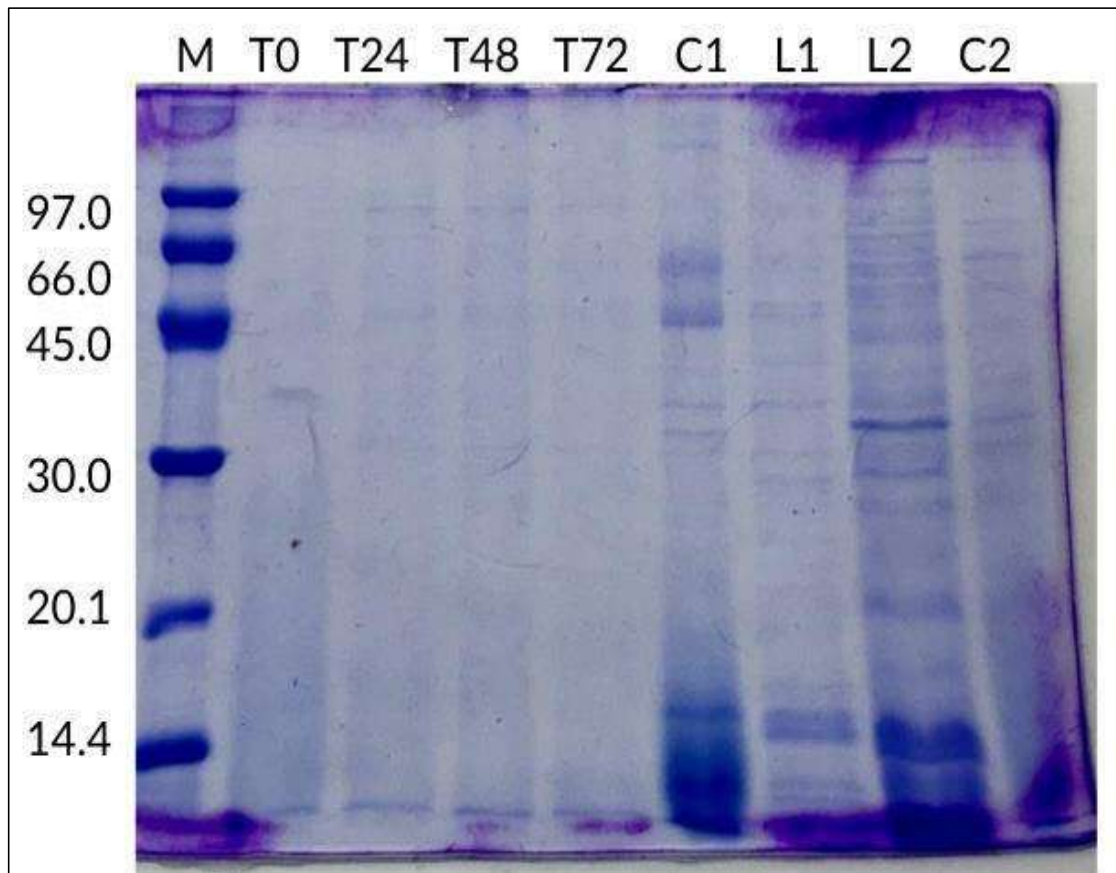
Figura 14 - Análise da expressão de PPL por *K. phaffii* utilizando meio BMMY (Metanol 1%) suplementado com sorbitol 1%.



Fonte: elaborado pela autora.

M: Marcador de peso molecular (unidade kDa). T0 a T72: Amostras do sobrenadante ao longo do tempo de expressão em horas; C1: amostra concentrada do cultivo de *K. phaffii* transformada; L1: Lisado do pellet de *K. phaffii* transformada; C2: amostra concentrada do cultivo de *K. phaffii* não transformada; L2: Lisado do pellet de *K. phaffii* não transformada

Figura 15 - Análise da expressão de PPL por *K. phaffii* utilizando meio BMMY (Metanol 1%) suplementado com sorbitol 1%.



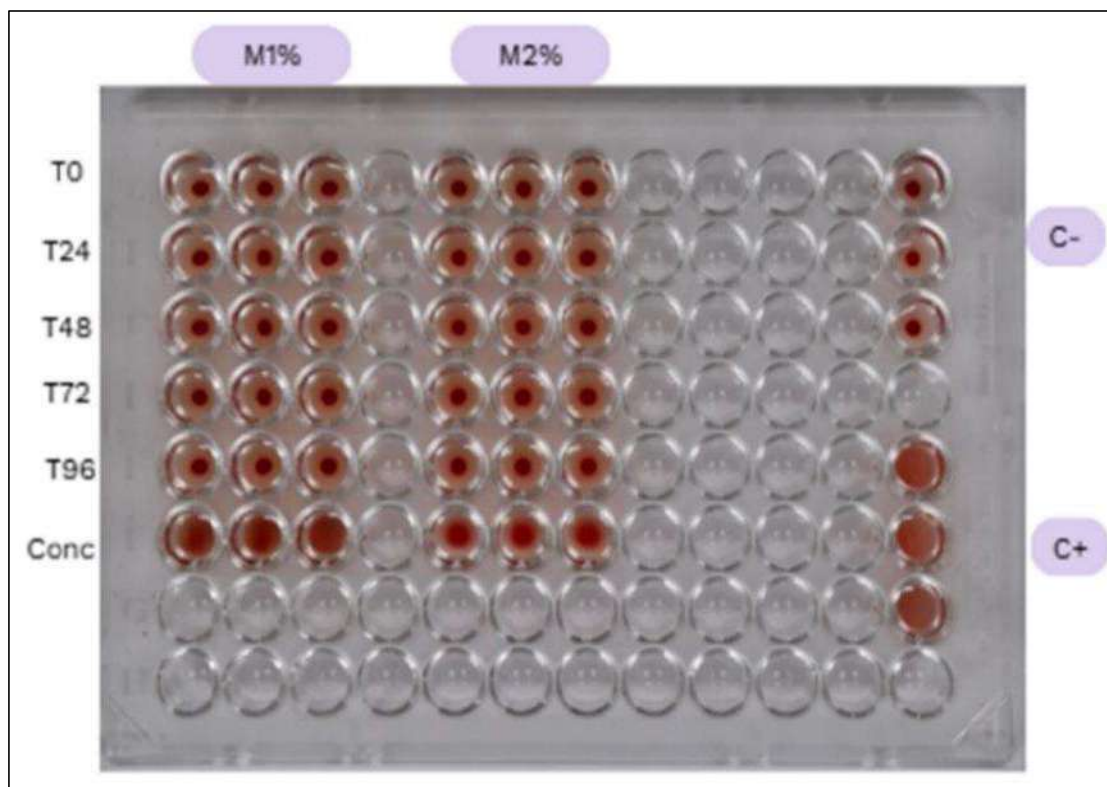
Fonte: elaborado pela autora.

M: Marcador de peso molecular (unidade kDa). T0 a T72: Amostras do sobrenadante ao longo do tempo de expressão em horas; C1: amostra concentrada do cultivo de *K. phaffii* transformada; L1: Lisado do pellet de *K. phaffii* transformada; C2: amostra concentrada do cultivo de *K. phaffii* não transformada; L2: Lisado do pellet de *K. phaffii* não transformada.

4.5 Análise da atividade hemaglutinante das amostras dos testes de expressão

As amostras dos testes de expressão foram submetidas a ensaios de atividade hemaglutinante, o resultado obtido está evidenciado nas Figuras 16 e 17, respectivamente.

Figura 16 - Ensaio de Atividade Hemaglutinante das alíquotas coletadas do 1º Teste de expressão de PPL



Fonte: elaborado pela autora. T0 a T96: tempos de expressão em horas;
Conc: sobrenadante final concentrado; C+: controle positivo; C-: controle negativo.

Figura 17 – Ensaio de Atividade Hemaglutinante das alíquotas coletadas do 2º Teste de expressão de PPL



Fonte: elaborado pela autora.

T0 a T72: amostras coletadas ao longo do tempo de expressão centrifugadas; Conc1: Amostra coletada do tempo final e concentrada; L1: amostra do lisado do pellet celular; Conc 2: Amostra coletada do tempo final e concentrada de *K. phaffii* não modificada; C-: controle negativo; C+: controle positivo (Frutalina).

Nos ensaios de hemaglutinação realizados, as amostras coletadas ao longo do tempo de expressão e do lisado não demonstraram atividade hemaglutinante, como pode ser observado pelos eritrócitos decantados ao fundo dos poços da placa. No entanto, em ambos, o sobrenadante final concentrado demonstrou atividade, o que pode ser observado pela formação de uma “rede” de eritrócitos ao fundo dos poços, sugerindo a presença de lectina.

A atividade hemaglutinante é uma propriedade característica das lectinas, que possuem a capacidade de se ligar a carboidratos presentes na superfície de eritrócitos, promovendo a aglutinação dessas células (Sharon & Lis, 2004). Essa propriedade é frequentemente utilizada como um método para detectar e caracterizar lectinas, uma vez que a aglutinação de eritrócitos é um fenômeno facilmente observável e quantificável (Van Damme *et al.*, 1998).

Curiosamente, o cultivo de *K. phaffii* não transformada concentrado, também apresentou atividade, sugerindo a presença de alguma molécula endógena da levedura capaz de interagir com eritrócitos.

Nesse sentido, na avaliação do secretoma de *K. phaffii* em cultivo induzido por metanol, HUANG *et al.* (2011) identificou a proteína FLO10, descrita como uma proteína semelhante a lectina, envolvida em processos de floculação celular e com potencial interação com carboidratos, dessa forma sendo uma molécula que poderia estar associada com a atividade hemaglutinante relatada.

A proteína FLO10 está atrelada a agregação celular de leveduras, se projetando para fora da parede celular e se ligando seletivamente a resíduos de manose nas paredes celulares de células adjacentes. Sua atividade é inibida por manose, glicose, maltose e sacarose (Guo *et al.*, 2020). No entanto, não há relatos quanto à atividade de aglutinação de eritrócitos.

Assim, a atividade hemaglutinante observada nos poços “Conc 1” sugere a presença da PPL recombinante. No entanto, a atividade detectada nos poços “Conc 2” torna esse resultado inconclusivo. Apesar de a hemaglutinação ser um método amplamente utilizado para a detecção de lectinas, a confirmação definitiva da presença da PPL recombinante requer técnicas mais específicas, como Western blot ou espectrometria de massas, para descartar a interferência de outras proteínas. Além da detecção, as condições de expressão da PPL devem ser otimizadas no intuito de obter maiores rendimentos.

Nesse sentido de aprimorar a expressão da PPL recombinante, diversas estratégias podem ser adotadas, incluindo a modificação dos parâmetros de cultivo. Fonte de carbono, a temperatura e o pH são fatores cruciais que afetam a síntese de proteínas em *K. phaffii* (Looser *et al.* 2015). Nesse contexto, estudos demonstram que a co-alimentação com metanol e sorbitol pode aumentar a expressão de proteínas recombinantes (Gao *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2011). Com base nessa abordagem, na segunda tentativa de expressão, foi adicionado 1% de sorbitol ao meio BMMY na tentativa de otimizar a produção da PPL, porém, essa modificação não resultou em diferenças significativas neste caso.

Entretanto, outras condições de cultivo, como pH, temperatura e concentração de metanol, podem ser otimizadas para maximizar a expressão da proteína. A temperatura de cultivo, por exemplo, pode ser ajustada para melhorar o enovelamento e a estabilidade da proteína. Temperaturas mais baixas (20-25°C) foram associadas a uma maior produção de proteínas funcionais, reduzindo a formação de agregados e corpos de inclusão (DALY; HEARN, 2005). Outra estratégia que pode ser adotada é a utilização de outras cepas de *K. phaffii* que apresentem características interessantes. O uso de linhagens mutantes deficientes em proteases, por exemplo, como SMD1168 (pep4Δ), consiste em uma boa opção no intuito reduzir a degradação da proteína recombinante (Juturu; Wu, 2018).

5 CONCLUSÃO

A transformação genética da cepa X-33 com o vetor pPICZ α A contendo o gene da PPL foi bem-sucedida, conforme evidenciado pela formação de colônias resistentes à zeocina e pela confirmação por PCR. A detecção da PPL recombinante nos ensaios de expressão, embora suportada parcialmente pelos dados aqui apresentados, não foi conclusiva, no entanto, os resultados obtidos fornecem uma base para posteriores otimizações do processo.

6 PERSPECTIVAS

Em perspectivas futuras, a otimização da expressão heteróloga da PPL em *K. phaffii* pode abrir caminho para a obtenção dessa proteína com altos rendimentos, viabilizando o estudo das propriedades estruturais dessa molécula, a partir de técnicas como a biocristalografia e a difração de raios-X, que podem fornecer informações sobre seus mecanismos de ação e interações moleculares, contribuindo para o desenvolvimento de novas aplicações na agricultura, saúde e indústria. A otimização da expressão heteróloga em *K. phaffii* é importante, também, para futuras etapas em produção em larga escala, o que é essencial no caso de aplicações industriais.

Além disso, estudos funcionais dessa proteína são importantes para futuras aplicações biotecnológicas. A PPL, com sua capacidade de ligação a quito-oligossacarídeos e RNA, pode ter aplicações em estudos de defesa vegetal e desenvolvimento de biopesticidas como outras lectinas (Van Damme, 2022). Além disso, estudos adicionais podem investigar o potencial da PPL como agente antimicrobiano ou antitumoral, seguindo os resultados promissores observados em outras lectinas do grupo PP2, como a CPL (Islam *et al.*, 2024).

Em conclusão, embora a expressão da PPL recombinante não tenha sido confirmada de forma definitiva neste estudo, os resultados obtidos fornecem uma base para posteriores otimizações do processo. Sendo assim, a combinação de estratégias de biologia molecular, otimização de bioprocessos e técnicas analíticas mais sensíveis pode levar ao sucesso na produção e purificação da PPL, viabilizando sua aplicação em diversas áreas da biotecnologia.

REFERÊNCIAS

- BALZARINI, J.; VAN LAETHEM, K.; HATSE, S.; FROEYEN, M.; VAN DAMME, E.; BOLMSTEDT, A.; PEUMANS, W.; DE CLERCQ, E.; SCHOLS, D. Marked depletion of glycosylation sites in HIV-1 gp120 under selection pressure by the mannose-specific plant lectins of *Hippeastrum hybrid* and *Galanthus nivalis*. **Molecular Pharmacology**, v. 67, p. 1556–1565, 2005. Acesso em: 11 fev. 2025.
- BOBBILI, Kishore Babu; BANDARI, Shyam; GROBE, Kay; SWAMY, Musti J. Mutational analysis of the pumpkin (*Cucurbita maxima*) phloem exudate lectin, PP2 reveals Ser-104 is crucial for carbohydrate binding. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 450, n. 1, p. 622–627, 2014. ISSN 0006-291X. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X14010985>. Acesso em: 30 jan. 2025.
- BOYD, William C.; REGUERA, Rose M. Hemagglutinating substances for human cells in various plants. **The Journal of Immunology**, v. 62, n. 3, p. 333–339, 1949. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.62.3.333>. Acesso em: 23 jan. 2025.
- CHETTRI, Dixita; BORO, Manswama; SARKAR, Lija; VERMA, Anil Kumar. Lectins: Biological significance to biotechnological application. **Carbohydrate Research**, v. 506, p. 108367, 2021. ISSN 0008-6215. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2021.108367>. Acesso em: 14 jan. 2025.
- CREGG, J. M. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 23–52, 2000. DOI: 10.1385/MB:16:1:23.
- DALY, R.; HEARN, M. T. W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**, v. 18, n. 2, p. 119–138, 2005. DOI: 10.1002/jmr.687. Acesso em: 11 fev. 2025.
- DAMME, Els J. M.; PEUMANS, Willy J.; BARRE, Annick; ROUGÉ, Pierre. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 6, p. 575–692, 1998. DOI: 10.1080/07352689891304276. Acesso em: 21 jan. 2025.
- DANNENHOFFER, J.; SCHULZ, A.; SKAGGS, M. Expression of the phloem lectin is developmentally linked to vascular differentiation in cucurbits. **Planta**, v. 201, p. 405–414, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s004250050083>. Acesso em: 21 jan. 2025.
- ELS, J. M. Van Damme; LANNOO, Nausicaa; PEUMANS, Willy J. Plant lectins. In: KADER, Jean-Claude; DELSENY, Michel (Ed.). **Advances in Botanical Research**. Academic Press, v. 48, p. 107–209, 2008. ISSN 0065-2296. ISBN 9780123746009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065229608004035>. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)00403-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)00403-5). Acesso em: 28 jan. 2025.
- GUO, B.; STYLES, C. A.; FENG, Q.; FINK, G. R. A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 22, p. 12158–12163, 2000. Disponível

em: <https://doi.org/10.1073/pnas.220420397>. Acesso em: 10 fev. 2025.

HUANG, C. J.; DAMASCENO, L. M.; ANDERSON, K. A.. A proteomic analysis of the *Pichia pastoris* secretome in methanol-induced cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 235–247, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3118-5>. Acesso em: 10 fev. 2025.

INVITROGEN. **Pichia Expression Kit: A Manual for High-Level Expression and Purification of Recombinant Proteins in Pichia pastoris**. Carlsbad: Invitrogen, 2002. Acesso em: 7 fev. 2025

ISLAM, M. A.; HOSSAIN, M. M.; KHANAM, A.; ASADUZZAMAN, A. K. M.; KABIR, S. R.; OZEKI, Y.; FUJII, Y.; HASAN, I. Carbohydrate-binding properties and antimicrobial and anticancer potential of a new lectin from the phloem sap of *Cucurbita pepo*. **Molecules**, v. 29, p. 2531, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules29112531>. Acesso em: 5 fev. 2025.

JUTURU, Veeresh; WU, Jin Chuan. Heterologous protein expression in *Pichia pastoris*: latest research progress and applications. **ChemBioChem**, v. 19, n. 7, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cbic.201700556>. Acesso em: 27 jan. 2025.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970. DOI: 10.1038/227680a0. PMID: 5432063. Acesso em: 15 fev. 2025.

LANNOO, Nausicaä; VAN DAMME, Els J. M. Lectin domains at the frontiers of plant defense. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n.?, p.? 2014. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2014.00397>. Acesso em: 13 jan. 2025. DOI: 10.3389/fpls.2014.00397. Acesso em: 11 jan. 2025.

MUKHTAR, Hamid; SAHREEN, Sania; SHARIF, Sundas; AHMAD, Hamna. Comparison of host expression systems used for efficient recombinant proteins production: Host expression system for recombinant proteins production. **Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences: B. Life and Environmental Sciences**, v. 60, p. 5-28, 2023. DOI: 10.53560/PPASB(60-1)731. Acesso em: 11 fev. 2025.

MUSTI, J. Swamy; BOBBILI, Kishore Babu; MONDAL, Saradmoni; NARAHARI, Akkaladevi; DATTA, Debparna. Cucurbitaceae phloem exudate lectins: Purification, molecular characterization and carbohydrate binding characteristics. **Phytochemistry**, v. 201, p. 113251, 2022. ISSN 0031-9422. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113251>. Acesso em: 13 jan.

NARAHARI, A.; SWAMY, M. Rapid affinity-purification and physicochemical characterization of pumpkin (*Cucurbita maxima*) phloem exudate lectin. **Bioscience Reports**, v. 30, n. 5, p. 341-349, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BSR20090117>. Acesso em: 7 fev. 2025.

NARAHARI, A.; SINGLA, H.; NAREDDY, P. K.; BULUSU, G.; SUROLIA, A.; SWAMY, M. J. Isothermal titration calorimetric and computational studies on the binding of chitoooligosaccharides to Pumpkin (*Cucurbita maxima*) Phloem Exudate Lectin. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, n. 14, p. 4110–4117, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jp110468n>. Acesso em: 30 jan. 2025.

NASCIMENTO, Maria Clara do; BATISTA, Juanize Matias da Silva; NASCIMENTO, Thiago Pajeú; COSTA, Romero Marcos Pedrosa Brandão; PORTO, Ana Lúcia Figueiredo. Revisão bibliográfica: lectinas – aspectos gerais e seus benefícios à agroindústria. In: **Tendências e estratégias para a agroindústria do futuro**, p. 165-182. DOI: <https://doi.org/10.31692/978-65-88970-26-3.165-182>. Acesso em: 11 fev. 2025.

NELSON, David L.; COX, Michael M.; HOSKINS, Aaron A. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. v.1. 8. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2022. E-book. p.83. ISBN 9786558820703. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9786558820703/>. Acesso em: 27 jan. 2025.

QUAX, T. E. F.; CLAASSENS, N. J.; SÖLL, D.; VAN DER OOST, J. Codon bias as a means to fine-tune gene expression. **Molecular Cell**, v. 59, n. 2, p. 149-161, 2015. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.05.035. Acesso em: 10 fev. 2025.

READ, S. M.; NORTHCOTE, D. H. Subunit structure and interactions of the phloem proteins of *Cucurbita maxima* (pumpkin). **European Journal of Biochemistry**, v. 134, n. 3, p. 561-569, 15 ago. 1983. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1983.tb07603.x. Disponível em: PubMed ID: 6884347. Acesso em: 14 jan. 2025

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R-62R, nov. 2004. DOI: 10.1093/glycob/cwh122. PMID: 15229195. Acesso em: 13 jan. 2025

SNAPGENE. pPICZ(α) A – Yeast Plasmids. Disponível em: [https://www.snapgene.com/plasmids/yeast_plasmids/pPICZ\(alpha\)_A](https://www.snapgene.com/plasmids/yeast_plasmids/pPICZ(alpha)_A). Acesso em: 13 fev. 2025. Acesso em: 10 fev. 2025

TSANEVA, M.; VAN DAMME, E. J. M. 130 years of plant lectin research. **Glycoconjugate Journal**, v. 37, n. 5, p. 533-551, out. 2020. DOI: 10.1007/s10719-020-09942-y. PMID: 32860551; PMCID: PMC7455784. Acesso em: 20 jan. 2025

TURGEON, R. Phloem biology of the cucurbitaceae. In: GRUMET, R.; KATZIR, N.; GARCIA-MAS, J. (eds). **Genetics and Genomics of Cucurbitaceae**. Plant genetics and genomics: crops and models, v. 20. Cham: Springer, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1007/7397_2016_23. Acesso em: 14 jan. 2025

UNVER, Yagmur; DAGCI, Ibrahim. *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) as a powerful yeast expression system for biologics production. **Frontiers in Bioscience** v. 16, n. 2, p. 19, 2024. DOI: 10.31083/j.fbe1602019. Acesso em: 13 jan. 2025

VAN DAMME, E. J. M. 35 years in plant lectin research: A journey from basic science to applications in agriculture and medicine. **Glycoconjugate Journal**, v. 39, p. 83–97, 2022.

Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10719-021-10015-x>. Acesso em: 15 jan. 2025.

VAN DAMME, E. J.; FOUQUAERT, E.; LANNOO, N.; VANDENBORRE, G.; SCHOUPE, D.; PEUMANS, W. J. Novel concepts about the role of lectins in the plant cell. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 705, p. 271-294, 2011. DOI: 10.1007/978-1-4419-7877-6_13. PMID: 21618113. Acesso em: 13 jan. 2025

VAN HOLLE, S.; VAN DAMME, E. J. M. Signaling through plant lectins: modulation of plant immunity and beyond. **Biochemical Society Transactions**, v. 46, p. 217–233, 2018. Acesso em: 13 jan. 2025.