RELATÓRIO ANUAL DA COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA CIBio-UFV – ANO 2021

1. Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - CNPJ: 25.944.455/0001-96

2. CQB nº: 0024/97

3. Período a que se refere: 01 de janeiro de 2021 a 31 de dezembro de 2021.

4. Informar sobre as alterações ocorridas na composição da CIBio:
A atual CIBio foi estabelecida pela Portaria Nº 0559/2020, de 27/11/2020, e é constituída por: Prof. Adriano Nunes Nesi (Presidente); Prof. Abelardo Silva Júnior; Prof. Denise Mara Soares Bazzolli; Prof. Francisco Murilo Zerbini Júnior; Prof. Juliana Lopes Rangel Fietto; Prof. Wagner Campos Otoni. Como membros suplentes: Prof. Leandro Licursi de Oliveira; Prof. Gustavo Costa Bressan; Prof. Hilário Cuquetto Mantovani.

5. Relacionar as unidades operativas e instalações utilizadas, especificando os níveis de biossegurança, técnico principal, os projetos de pesquisa ou atividades concluídos ou em andamento, constando os objetivos, a relação dos OGM e derivados que foram objeto das atividades (mencionar o nome comum, nome científico das espécies, genes introduzidos, sua origem e funções específicas), incluindo resumo dos resultados mais relevantes obtidos e referenciar, quando houver, publicações e pedidos de patentes.

Unidades operativas que estão sob a cobertura do CQB 024/97:
– Instalações do BIOAGRO/UFV. Comunicado CTNBio 19, Processo n.º 01200.002610/9704.
– Instalações do Departamento de Engenharia Florestal – UFV. Comunicado CTNBio 67, Processo n.º 01200.002610/9704.
– Instalações da Fazenda Experimental de Coimbra. Comunicado CTNBio nº 85, Processo nº 01200.002610/9704.
– Laboratório de Cultura de Tecido II. Parecer CTNBio 0847/2006.
– Instalações do Laboratório de Celulose e Papel. Parecer CTNBio 0595/2006.
– Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade. Parecer CTNBio 0847/2006.

– Casa de Vegetação do Departamento de Engenharia Florestal. Parecer CTNBio 0847/2006.
– Laboratório de Solos Florestais. Parecer CTNBio 0847/2006.
– Casa de Vegetação na unidade que faz parte do BIOAGRO. Parecer CTNBio 3519/2012.
– Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia. Parecer CTNBio 4775/2015.
– Laboratório de Imunovirolgia Molecular. Parecer CTNBio 4775/2015.
– Laboratório de Biologia Molecular de Plantas e Laboratório de Cultivo e Crescimento de Plantas. Parecer CTNBio 4939/2016.
– Laboratório de Cultura de Tecidos e de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal. Parecer CTNBio 4945/2016.
– Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos 1. Parecer CTNBio 5701/2017.
– Unidade de Crescimento de Plantas. Parecer CTNBio 5847/2017.
– Laboratório de Biotecnologia Molecular I e II. Parecer CTNBio 6223/2018.
– Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos 2. Parecer CTNBio 7458/2020.

5.1. Projetos em andamento

5.1.1. Projeto: SARS-CoV-2: DESENVOLVIMENTO DE TESTES DIAGNÓSTICOS DISCRIMINATÓRIOS E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

Objetivos: Desenvolver testes diagnósticos molecular e sorológico otimizados e mapear a distribuição da Covid-19 no estado de Minas Gerais.

Equipe: Tiago Antônio de Oliveira Mendes, Poliane Alfenas Zerbini, Thaís Viana Fialho Martins, Mônica Maria Magalhães Caetano, Renato Lima Senra, Gustavo Costa Bressan, Juliana Lopes Rangel Fietto, Leandro Licursi de Oliveira

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Organismo receptor: *Escherichia coli*; Organismo parental: SARS-CoV-2

Nível de contenção: NB-1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Imunovirologia Molecular, Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia e Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos 1.

Medidas de biossegurança adotadas: Acesso aos laboratórios restrito ao pessoal credenciado. Todas as manipulações envolvendo OGM são realizadas em câmara de fluxo laminar. O trabalho com o micro-organismo é feito em capela de fluxo vertical laminar. Todo material de trabalho utilizado como o micro-organismo, assim como, o micro-

organismo são descartados após o procedimento de esterilização em autoclave, à temperatura de 121 °C por 20 minutos.

Órgão financiador: UFV (CHAMADA UFV/PPG 01/2020)

Resultado parcial: não há

5.1.2. Projeto: Caracterização funcional da proteína APJ e avaliação da sua correlação com a tolerância a etanol em leveduras

Objetivos: Avaliar o efeito fisiológico da deleção de APJ1 em *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes condições de crescimento.

Resumo dos resultados mais relevantes: No presente estudo, foi avaliado o efeito da deleção de *APJ1* na fisiologia de linhagens de *S. cerevisiae*, a fim de compreender o impacto da mutação no crescimento sob a exposição a diversos estresses, como etanol, temperatura, elevada concentração de açúcar e presença de ácido acético. Nenhuma diferença significativa foi observada entre as linhagens nos diferentes ensaios de crescimento ou fermentação. Além disso, o crescimento das células em meio contendo etanol foi similar, apesar do aumento da expressão de *APJ1* na linhagem background. Estudos anteriores de RNA-seq do nosso grupo revelaram pouca diferença entre os transcriptomas das leveduras sob estresse por etanol. Juntos, esses resultados apontam que os efeitos fisiológicos da deleção de *APJ1* em *S. cerevisiae* não estão diretamente relacionados a tolerância ao etanol e a outros estresses importantes para processos fermentativos.

Responsável: Luciano Gomes Fietto

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Levedura *Saccharomyces cerevisiae* linhagem BY4741 (MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0); Levedura *Saccharomyces cerevisiae* linhagem Y02999 (MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 apj1Δ::KAN)

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Biotecnologia Molecular I e II, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, situados à sala 212 e 217, respectivamente, do prédio CCB II, Campus Universitário.

Medidas de biossegurança adotadas: Acesso ao laboratório é restrito ao pessoal credenciado junto ao Laboratório, com controle de acesso de usuários. Todas as manipulações envolvendo OGM são realizadas em câmara de fluxo laminar. O trabalho com micro-organismos é feito em capela de fluxo vertical laminar. Todo material de trabalho

utilizado como o micro-organismo, assim como, o micro-organismo são descartados após o procedimento de esterilização em autoclave, à temperatura de 121 °C por 20 minutos.

Produtos:

Alex Gazolla de Castro. Resposta ao estresse por etanol em *Saccharomyces cerevisiae* e *Spathaspora passalidarum*. 2019. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada (32002017023P7)) - Universidade Federal de Viçosa.

5.1.3. Projeto: Caracterização bioquímica e funcional de transfatores da família Bzip relacionados com a resposta à ferrugem asiática em soja (*Glycine max*)

Objetivos: Caracterizar a função de fatores de transcrição da família Bzip de soja.

Resumo dos resultados mais relevantes:

Os resultados mostram que *P. pachyrhizi* mimetiza um patógeno necrotófico na interação compatível em soja. A expressão de *GmbZIP159* (*GmbZIP89*) é induzida com um perfil semelhante ao de genes responsivos a jasmonato, o que indica um novo gene marcador para esta via de sinalização. Sugere-se que GmbZIP159 tenha um papel como regulador negativo na resistência ao fungo, uma vez que plantas silenciadas para o gene apresentam menor severidade de infecção. Demonstramos também que GmbZIP45 é capaz de se ligar ao *cis*-elemento H-box, regulando a expressão de *CHS8*, gene chave na via de fenilpropanoides. A superexpressão de *GmbZIP45* ativa a transcrição de *CHS8*, mas não induz a expressão dos outros genes analisados, que também possuem H-box. Estes dados sugerem que a interação com H-box de forma cooperativa com outros fatores de transcrição pode ser um potencial mecanismo de regulação de genes alvos pelo GmbZIP45. Assim, os resultados obtidos neste trabalho mostram o papel dos transfatores bZIP em vias de defesa em soja e aponta estes como possíveis alvos para obtenção de plantas mais tolerantes às adversidades do ambiente.

Responsável: Luciano Gomes Fietto

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: As seguintes estirpes de bactérias foram usadas como hospedeira para expressão heteróloga de proteínas: *Escherichia coli* DH5 alfa, *E. coli* BL21, *E. coli* C41, *E. coli Origami, E. coli* pRARE 2, *E. coli Shuffle, E. coli* Arctic Express.

As seguintes linhagens de leveduras foram utilizadas como hospedeiras: *Saccharomyces cerevisiae* (AH109 e W303).

Na tabela abaixo seguem apresentados: a relação dos genes de soja (*Glycine max*) que foram clonados em vetores de expressão do sistema Gateway, e que foram expressos em diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *E. coli.*

Gene	**Produto gênico**	**Organismo hospedeiro**
GmbZIP62	Fator de transcrição bZIP de soja	*Escherichia coli/ **S**accharomyces cerevisiae*
GmbZIP105	Fator de transcrição bZIP de soja	*Escherichia coli/ **S**accharomyces cerevisiae*
GmbZIPE1	Fator de transcrição bZIP de soja	*Escherichia coli/ **S**accharomyces cerevisiae*
GmbZIPE2	Fator de transcrição bZIP de soja	*Escherichia coli/ **S**accharomyces cerevisiae*
GmTGA2	Fator de transcrição bZIP de soja	*Escherichia coli/ **S**accharomyces cerevisiae*
GmTGA3	Fator de transcrição bZIP de soja	*Escherichia coli/ **S**accharomyces cerevisiae*
GmARP	Proteína regulatória de soja	*Escherichia coli/ **S**accharomyces cerevisiae*
GmNPR1	Proteína regulatória de soja	*Escherichia coli/ **S**accharomyces cerevisiae*
GmLSD1	Proteína regulatória de soja	*Escherichia coli/ **S**accharomyces cerevisiae*

GmANK1	Proteína regulatória de soja	*Escherichia coli/ **S**accharomyces cerevisiae*
GmWhyB	Fator de transcrição Whirly de soja	*Escherichia coli/ **S**accharomyces cerevisiae*

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Biotecnologia Molecular I e II, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, situados à sala 212 e 217, respectivamente, do prédio CCB II, Campus Universitário.

Medidas de biossegurança adotadas: Acesso ao laboratório é restrito ao pessoal credenciado junto ao Laboratório, com controle de acesso de usuários. Todas as manipulações envolvendo OGM são realizadas em câmara de fluxo laminar. O trabalho com micro-organismos é feito em capela de fluxo vertical laminar. Todo material de trabalho utilizado como o micro-organismo, assim como, o micro-organismo são descartados após o procedimento de esterilização em autoclave, à temperatura de 121 °C por 20 minutos.

Produtos:

DE ALMEIDA BARROS, VANESSA ; et. al. *Phakopsora pachyrhizi* triggers the jasmonate signaling pathway during compatible interaction in soybean and GmbZIP89 plays a role of major component in the pathway. PLANT PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY, v. 151, p. 526-534, 2020.

GONÇALVES, AMANDA BONOTO ; et al. GmbZIP45 binds to H-box cis-element in vitro and overexpression in soybean protoplasts induces the expression of CHS8 gene. PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR PLANT PATHOLOGY, v. 112, p. 101556, 2020.

5.1.4. Projeto: Caracterização funcional de fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*

Objetivos: Expressar os genes que codificam lipoproteínas de *S. aureus* em sistema heterólogo.

Resumo dos resultados mais relevantes: Estudos realizados por nosso grupo identificaram no genoma de *S. aureus* um gene que codifica uma lipoproteína (*lpl*) capaz de diferenciar

cepas envolvidas em mastite clínica daquelas que causam mastite subclínica. Embora fosse verificada a presença do gene em todos os isolados de campo, existe uma variação na sequência de nucleotídeos que pode se refletir na estrutura e função da proteína. Neste projeto realizou-se a expressão heteróloga dos genes que codificam a Lpls das cepas RF122, USA 300 e 302 visando elucidar o seu papel para a patogênese bacteriana. Análises de western-blot confirmaram a expressão da Lpl de USA300 e 302. Há necessidade de otimizar a expressão da proteína de RF122.

Responsável: Andrea de Oliveira Barros Ribon

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: As seguintes estirpes de bactérias foram usadas como hospedeira para expressão heteróloga de proteínas: *Escherichia coli* DH5 alfa, *E. coli* BL21, E. coli C41, E. coli Arctic Express. Os genes *lpl* das cepas *S. aureus* RF122, 302 e USA 300 foram clonados em vetor pET 28a.

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Biotecnologia Molecular I e II, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, situados à sala 212 e 217, respectivamente, do prédio CCB II, Campus Universitário.

Medidas de biossegurança adotadas: Acesso ao laboratório é restrito ao pessoal credenciado junto ao Laboratório, com controle de acesso de usuários. Todas as manipulações envolvendo OGM são realizadas em câmara de fluxo laminar. O trabalho com micro-organismos é feito em capela de fluxo vertical laminar. Todo material de trabalho utilizado como o micro-organismo, assim como, o micro-organismo são descartados após o procedimento de esterilização em autoclave, à temperatura de 121 °C por 20 minutos.

Produtos:

Rocha, l. S. Estudo da variabilidade e organização de genes que codificam proteínas de superfície de cepas deS*taphylococcus aureus* associadas à mastite bovina. 2021. Tese de doutorado. 120 p.

Rocha LS, Silva DM, Silva MP, Vidigal PMP, Silva JCF, Guerra ST, Ribeiro MG, Mendes TAO, Ribon AOB. Comparative genomics of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical and clinical bovine mastitis. PLoS One. 2019 Aug 7;14(8):e0220804. doi: 10.1371/journal.pone.0220804. PMID: 31390381; PMCID: PMC6685620.

5.1.5. Projeto: Produção de antígeno vacinal recombinante em *E. coli* para desenvolvimento de vacina contra neosporose bovina

Objetivos: Produzir proteínas quiméricas contendo epítopos de célula B e T identificados no genoma de *Neospora caninum* através de expressão heteróloga em bactéria *E. coli*.

Resumo dos resultados mais relevantes: Os epítopos de célula B e T foram preditos no genoma de *Neospora caninum* utilizando abordagens de imunoinformática. Um gene sintético codificador de proteína quimérica contendo os epítopos identificados foi quimicamente sintetizada e clonada em vetor pet28a. Bactéria *E. coli* Arctic Express foram transformadas com o vetor e a proteína foi produzida por expressão heteróloga e purificada. O antígeno foi utilizado para avaliação de poder de diagnóstico e controle da neosporose bovina.

Responsável: Tiago Antônio de Oliveira Mendes

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: *E. coli* Arctic Express superexpressora de proteína quimérica com epitopes de *Neospora caninum*.

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Biotecnologia Molecular I e II, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, situados à sala 212 e 217, respectivamente, do prédio CCB II, Campus Universitário.

Medidas de biossegurança adotadas: Acesso ao laboratório é restrito ao pessoal credenciado junto ao Laboratório, com controle de acesso de usuários. Todas as manipulações envolvendo OGM são realizadas em câmara de fluxo laminar. O trabalho com micro-organismos é feito em capela de fluxo vertical laminar. Todo material de trabalho utilizado como o micro-organismo, assim como, o micro-organismo são descartados após o procedimento de esterilização em autoclave, à temperatura de 121 °C por 20 minutos.

Produtos:

PEREIRA, HIGOR SETTE ; E ALMEIDA, LUDMILA TAVARES ; FERNANDES, VITÓRIA ; SENRA, RENATO LIMA ; FONTES, PATRÍCIA PEREIRA ; BITTAR, EUSTÁQUIO RESENDE ; RIBON, ANDRÉA DE OLIVEIRA BARROS ; ROTTA, POLYANA PIZZI ; MENEZES-SOUZA, DANIEL ; BITTAR, JOELY FERREIRA FIGUEIREDO ; MENDES, TIAGO ANTÔNIO DE OLIVEIRA . Chimeric protein designed by genome scale immunoinformatic enhances serodiagnosis of bovine neosporosis. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 2020.

OLIVEIRA MENDES, TIAGO ANTÔNIO DE; ALMEIDA, L. T. ; PEREIRA, H. S. ; SENRA, R. L. ; MENEZES-SOUZA, D. ; RIBON, A. O. B. ; BITTAR, J. F. F. ; BITTAR,

E. R. ; FERNANDES, V. ; BARROS, G. C. ; BONOTO, A. G. . PROTEÍNA QUIMÉRICA, MÉTODO E KIT PARA DIAGNÓSTICO DA NEOSPOROSE BOVINA, COMPOSIÇÕES VACINAIS E/OU TERAPÊUTICAS E USOS. 2019, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10201900372, título: "PROTEÍNA QUIMÉRICA, MÉTODO E KIT PARA DIAGNÓSTICO DA NEOSPOROSE BOVINA, COMPOSIÇÕES VACINAIS E/OU TERAPÊUTICAS E USOS" , Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 22/02/2019.

5.1.6. Projeto: Produção de antígeno vacinal recombinante em *E. coli* para desenvolvimento de vacina contra tripanossomíase bovina

Objetivos: Produzir proteínas quiméricas contendo epítopos de célula B e T identificados no genoma de *Trypanosoma vivax* através de expressão heteróloga em bactéria *E. coli*.

Resumo dos resultados mais relevantes: Os epítopos de célula B e T foram preditos no genoma de *Trypanosoma vivax* utilizando abordagens de imunoinformática. Um gene sintético codificador de proteína quimérica contendo os epítopos identificados foi quimicamente sintetizada e clonada em vetor pet28a. Bactéria *E. coli* Arctic Express foram transformadas com o vetor e a proteína foi produzida por expressão heteróloga e purificada. O antígeno foi utilizado para avaliação de poder de diagnóstico e controle da triponossomíase bovina.

Responsável técnico: Tiago Antônio de Oliveira Mendes

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: *E. coli* Arctic Express superexpressora de proteína quimérica com epitopes de *Trypanosoma vivax*.

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Biotecnologia Molecular I e II, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, situados à sala 212 e 217, respectivamente, do prédio CCB II, Campus Universitário.

Medidas de biossegurança adotadas: Acesso ao laboratório é restrito ao pessoal credenciado junto ao Laboratório, com controle de acesso de usuários. Todas as manipulações envolvendo OGM são realizadas em câmara de fluxo laminar. O trabalho com micro-organismos é feito em capela de fluxo vertical laminar. Todo material de trabalho utilizado como o micro-organismo, assim como, o micro-organismo são descartados após o procedimento de esterilização em autoclave, à temperatura de 121 °C por 20 minutos.

Produtos:

OLIVEIRA MENDES, TIAGO ANTÔNIO DE; PEREIRA, H. S.; SENRA, R. L.; CARVALHO, A. M. R. S.; MENEZES-SOUZA, D.; RIBON, A. O. B.; SOUZA, G. B.; FONTES, P. P.; DADALTO, S. P.; BITTAR, E. R.. MÉTODO E KIT PARA DIAGNÓSTICO DA TRIPANOSSOMÍASE BOVINA, COMPOSIÇÕES VACINAIS E/OU TERAPÊUTICAS E USO. 2019, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10201900371, título: "MÉTODO E KIT PARA DIAGNÓSTICO DA TRIPANOSSOMÍASE BOVINA, COMPOSIÇÕES VACINAIS E/OU TERAPÊUTICAS E USO", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 22/02/2019.

5.1.7. Projeto: Produção de antígeno vacinal recombinante em *E. coli* para desenvolvimento de vacina contra anaplasmose, babesiose e erliquiose canina

Objetivos: Produzir proteínas quiméricas contendo epítopos de célula B e T conservados identificados no genoma de *Anaplasma platys*, *Erlichia canis* e *Babesia canis* através de expressão heteróloga em bactéria *E. coli*.

Resumo dos resultados mais relevantes: Os epítopos de célula B e T foram preditos no genoma de *Anaplasma platys*, *Erlichia canis* e *Babesia canis* utilizando abordagens de imunoinformática. Um gene sintético codificador de proteína quimérica contendo os epítopos identificados foi quimicamente sintetizada e clonada em vetor pet28a. Bactéria *E. coli* Arctic Express foram transformadas com o vetor e a proteína foi produzida por expressão heteróloga e purificada. O antígeno foi utilizado para avaliação de poder de diagnóstico e controle de doenças transmitidas por carrapato.

Responsável técnico: Tiago Antônio de Oliveira Mendes

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: *E. coli* Arctic Express superexpressora de proteína quimérica com epitopes conservados de Anaplasma platys, *Erlichia canis* e *Babesia canis*

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Biotecnologia Molecular I e II, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, situados à sala 212 e 217, respectivamente, do prédio CCB II, Campus Universitário.

Medidas de biossegurança adotadas: Acesso ao laboratório é restrito ao pessoal credenciado junto ao Laboratório, com controle de acesso de usuários. Todas as manipulações envolvendo OGM são realizadas em câmara de fluxo laminar. O trabalho com

micro-organismos é feito em capela de fluxo vertical laminar. Todo material de trabalho utilizado como o micro-organismo, assim como, o micro-organismo são descartados após o procedimento de esterilização em autoclave, à temperatura de 121 °C por 20 minutos.

Produtos:

ACORDO DE PARCERIA No 23/2021 PARA PESQUISA, DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO QUE ENTRE SI CELEBRAM A UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA E O LABORATÓRIO BIOVET LTDA, COM INTERVENIÊNCIA DA FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES - FUNARBE.

5.1.8. Projeto: Desenvolvimento de ferramentas moleculares para sileciamento e controle de genes de resistência de bactérias

Objetivos: Produzir vetores de DNA plasmidial para expressão de gRNAs específicos e Cas9 para silenciar genes de resistência em bactérias gram-negativas.

Resumo dos resultados mais relevantes: Espécies multi-drogas resistentes de micro-organismos pertencentes à família Enterobacteriaceae têm emergido nos últimos anos, tornando-se cada vez mais frequentes não apenas em hospitais, mas também em infecções associadas à comunidade. Considerando a alta virulência dessa espécie e tendo em vista que a resistência bacteriana vem sendo mais disseminada do que a introdução de novos antimicrobianos no mercado, estudos que implementem novas abordagens para a redução de virulência e/ou resistência em micro-organismos patogênicos devem ser incentivados. O sistema de CRISPR-Cas9, descoberto recentemente, vêm sendo uma importante ferramenta de edição gênica para eliminar genes de resistência e virulência de micro-organismos de relevância clínica. O presente estudo objetivou avaliar o potencial de edição gênica por CRISPR-Cas9 para reversão de resistência induzida pela gene blaTEM por meio de RNAs guias conservados para silenciamento deste gene. As sequências conservadas desses genes foram avaliadas para desenho do alvo (gRNA) do sistema CRISPR-Cas9. Após a síntese do gRNA, o sistema CRISPR foi montado em plasmídeo e sua funcionalidade foi testada em amostras de *E. coli* BL21.

Responsável técnico: Tiago Antônio de Oliveira Mendes

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: *E. coli* BL21 superexpressora do gene blaTEM e *E. coli* BL21 transformada com vetor contendo gRNA para silenciamento de gene blaTEM por sistema CRISPR/Cas9

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Biotecnologia Molecular I e II, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, situados à sala 212 e 217, respectivamente, do prédio CCB II, Campus Universitário.

Medidas de biossegurança adotadas: Acesso ao laboratório é restrito ao pessoal credenciado junto ao Laboratório, com controle de acesso de usuários. Todas as manipulações envolvendo OGM são realizadas em câmara de fluxo laminar. O trabalho com micro-organismos é feito em capela de fluxo vertical laminar. Todo material de trabalho utilizado como o micro-organismo, assim como, o micro-organismo são descartados após o procedimento de esterilização em autoclave, à temperatura de 121 °C por 20 minutos.

Produtos:

TAGLIAFERRI, T. L. ; GUIMARAES, N. R. ; PEREIRA, M. P. M. ; VILELA, L. F. F. ; HORZ, H. ; SANTOS, S. G. ; MENDES, TIAGO ANTÔNIO DE OLIVEIRA . Exploring the Potential of CRISPR-Cas9 Under Challenging Conditions: Facing High-Copy Plasmids and Counteracting Beta-Lactam Resistance in Clinical Strains of Enterobacteriaceae. Frontiers in Microbiology, v. 11, p. 1-11, 2020.

PEREIRA, HIGOR SETTE ; TAGLIAFERRI, THAYSA LEITE ; MENDES, TIAGO ANTÔNIO DE OLIVEIRA . Enlarging the Toolbox Against Antimicrobial Resistance: Aptamers and CRISPR-Cas. Frontiers in Microbiology, v. 12, p. 606360, 2021

5.1.9. Projeto: Otimização metabólica de *Leishmania tarentolae* para produção heteróloga de glicoproteínas terapêuticas

Objetivos: Produzir vetores de DNA plasmidial para expressão de gRNAs específicos e Cas9 para silenciar genes de resistência em bactérias gram-negativas.

Resumo dos resultados mais relevantes: Espécies multi-drogas resistentes de micro-organismos pertencentes à família Enterobacteriaceae têm emergido nos últimos anos, tornando-se cada vez mais frequentes não apenas em hospitais, mas também em infecções associadas à comunidade. Considerando a alta virulência dessa espécie e tendo em vista que a resistência bacteriana vem sendo mais disseminada do que a introdução de novos antimicrobianos no mercado, estudos que implementem novas abordagens para a redução de virulência e/ou resistência em micro-organismos patogênicos devem ser incentivados. O sistema de CRISPR-Cas9, descoberto recentemente, vêm sendo uma importante ferramenta

de edição gênica para eliminar genes de resistência e virulência de micro-organismos de relevância clínica. O presente estudo objetivou avaliar o potencial de edição gênica por CRISPR-Cas9 para reversão de resistência induzida pela gene blaTEM por meio de RNAs guias conservados para silenciamento deste gene. As sequências conservadas desses genes foram avaliadas para desenho do alvo (gRNA) do sistema CRISPR-Cas9. Após a síntese do gRNA, o sistema CRISPR foi montado em plasmídeo e sua funcionalidade foi testada em amostras de *E. coli* BL21.

Responsável técnico: Tiago Antônio de Oliveira Mendes

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: *Leishmania tarentolae* superexpressora de sialiltransferase, *Leishamania tarentolae* superexpressora de interferon-beta e *Leishmania tarentolae* superexpressora de sialiltransferase e interferon-beta.

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Biotecnologia Molecular I e II, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, situados à sala 212 e 217, respectivamente, do prédio CCB II, Campus Universitário.

Medidas de biossegurança adotadas: Acesso ao laboratório é restrito ao pessoal credenciado junto ao Laboratório, com controle de acesso de usuários. Todas as manipulações envolvendo OGM são realizadas em câmara de fluxo laminar. O trabalho com micro-organismos é feito em capela de fluxo vertical laminar. Todo material de trabalho utilizado como os micro-organismos são descartados após o procedimento de esterilização em autoclave, à temperatura de 121 °C por 20 minutos.

Produtos:

OLIVEIRA MENDES, TIAGO ANTÔNIO DE; SENRA, R. L.; PEREIRA, H. S.; FIETTO, JULIANA LOPES RANGEL ; RIBON, A. O. B. ; OLIVEIRA, T. A. ; VILELA, L. F. F. ; FIUZA, J. A. . *Leishmania tarentolae* OTIMIZADA, PROCESSO DE PRODUÇÃO, E USO PARA PRODUÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS SIALIZADAS. 2019, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10201900367, título: "*Leishmania tarentolae* OTIMIZADA, PROCESSO DE PRODUÇÃO, E USO PARA PRODUÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS SIALIZADAS" , Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 22/02/2019

OLIVEIRA MENDES, TIAGO ANTÔNIO DE; SENRA, R. L. ; FIETTO, JULIANA LOPES RANGEL ; RIBON, A. O. B. ; PEREIRA, H. S. ; OLIVEIRA, T. A. ; ANDRADE, L. K. R. ; BARROS, G. C. ; MENEZES-SOUZA, D. ; FIUZA, J. A. ; BONOTO, A. G. .

PROCESSO DE PRODUÇÃO DA PROTEÍNA INTERFERON-BETA HUMANO EM *Leishmania tarentolae* E USO. 2019, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10201900369, título: "PROCESSO DE PRODUÇÃO DA PROTEÍNA INTERFERON-BETA HUMANO EM *Leishmania tarentolae* E USO" , Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 22/02/2019

5.1.10. Projeto: Caracterização bioquímica da e-ntpdase-1 de *Leishmania infantum chagasi* produzida em sistema LEXSY (Leishmania Expression System) CONSTITUTIVO

Objetivos: Purificação e caracterização da E-NTPDase-2 de *Leishmania infantum chagasi* clonada em sistema de expressão constitutiva LEXSY e a avaliação do seu papel na infecção e adesão em macrófagos.

Resumo dos resultados mais relevantes: Plasmídeos contendo DNA para expressão das proteínas foram gerados, as proteínas recombinantes derivadas estão padronizadas quanto à expressão e purificação para serem utilizadas em ensaios bioquímicos e funcionais.

Responsável técnico: Profa. Juliana Lopes Rangel Fietto

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: *Leishmania tarentolae* não patogênica usadas para a expressão de proteínas recombinantes (sistema comercial LEXSY-Jena bioscience). As cepas originais do sistema LEXSY (P10 e T7) são transformadas com plasmídeos comerciais (pLEXSY) contendo DNAs codificantes para versões totais ou parciais dos genes alvo de estudo: NTPDases de *Leishmania infantum chagasi*.

Nível de contenção: NB2. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos I.

Medidas de biossegurança adotadas: Acesso ao laboratório é restrito ao pessoal credenciado junto ao Laboratório, com controle de acesso de usuários. Todas as manipulações envolvendo OGM são realizadas em câmara de fluxo laminar. O trabalho com micro-organismos é feito em capela de fluxo vertical laminar. Todo material de trabalho utilizado como os micro-organismos são descartados após o procedimento de esterilização em autoclave, à temperatura de 121 °C por 20 minutos.

Produtos: Não há até o momento publicações ou pedidos de patente associados ao projeto.

5.1.11. Projeto: Avaliação do efeito leishmanicida de novos compostos em *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*

Objetivos: Neste projeto são realizados testes fenotípicos para busca de ação leishmanicida de compostos inibidores de histonas deacetilases (iHDAC).

Resumo dos resultados mais relevantes: foi produzida *Leishmania braziliensis* verde fluorescente usada para triagem e estudos de compostos leishmanicidas. Estes dados levaram à publicação de dois artigos científicos relacionados a seguir.

Responsável técnico: Profa. Juliana Lopes Rangel Fietto

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: cepa DH5α e similares de *Escherichia coli* não patogênica usada para produção de plamídios. Neste projeto são usados plasmídios do sistema de expressão em leishmania LEXSY com expressão constitutiva do gene codificante da proteína verde fluorescente (GFP) ou do gene codificante da proteína vermelha fluorescente (Cherry/RFP). Estas construções foram usadas para produzir uma linhagem de *Leishmania braziliensis* verde fluorescente e uma linhagem de *Leishmania infantum* vermelha fluorescente que são usadas em ensaios fenotípicos de busca de novos compostos com ação Leishmanicida.

Nível de contenção: NB2. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos I.

Medidas de biossegurança adotadas: Acesso ao laboratório é restrito ao pessoal credenciado junto ao Laboratório, com controle de acesso de usuários. Todas as manipulações envolvendo OGM são realizadas em câmara de fluxo laminar. O trabalho com micro-organismos é feito em capela de fluxo vertical laminar. Todo material de trabalho utilizado como os micro-organismos são descartados após o procedimento de esterilização em autoclave, à temperatura de 121 °C por 20 minutos.

Produtos:

Histone deacetylases inhibitors as new potential drugs against *Leishmania braziliensis*, the main causative agent of new world tegumentary leishmaniasis. BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, v.180, p.114191 - , 2020.

Achievement of constitutive fluorescent pLEXSY-egfp *Leishmania braziliensis* and its application as an alternative method for drug screening in vitro. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Online), v.112, p.155 -159, 2017.

5.1.12. Projeto: Produção de eCG recombinante bioativo glicosilado

Objetivos: Produzir em escala laboratorial o hormônio eCG recombinante bioativo glicosilado, usando o sistema comercial LEXSY baseado em expressão heteróloga constitutiva de proteínas glicosiladas em *Leishmania tarentolae*.

Resumo dos resultados mais relevantes: foram produzidos clones transfectados que expressam o eCG, para sinalização do eCG também foi produzida e usada a cepa P10 contendo o gene para expressão da sialil transferase humana.

Responsável técnico: Profa. Juliana Lopes Rangel Fietto

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: cepa DH5α e similares de Escherichia coli não patogênica usada para produção de plamídios e Leishmania tarentolae não patogênica usadas para a expressão de proteínas recombinantes (sistema comercial LEXSY-Jena bioscience). As cepas originais do sistema LEXSY (P10 e T7) são transformadas com plasmídeos do sistema pLEXSY contendo os genes codificantes para as subunidades formadoras do hormônio gonadotrofina coriônica equina e para a sialil transferase humana.

Nível de contenção: NB2. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos I.

Medidas de biossegurança adotadas: Acesso ao laboratório é restrito ao pessoal credenciado junto ao Laboratório, com controle de acesso de usuários. Todas as manipulações envolvendo OGM são realizadas em câmara de fluxo laminar. O trabalho com micro-organismos é feito em capela de fluxo vertical laminar. Todo material de trabalho utilizado como os micro-organismos são descartados após o procedimento de esterilização em autoclave, à temperatura de 121 °C por 20 minutos.

Produtos:

Patente

LEISHMANIA TARENTOLAE OTIMIZADA, PROCESSO DE PRODUÇÃO, E USO PARA PRODUÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS SIALIZADAS. BR 102019003674-5 A2. Data do Depósito: 22/02/2019.

5.1.13. Projeto: Caracterização funcional das ecto-ntpdases 1 e 2 de *Leishmania infantum chagasi*

Objetivos: O presente trabalho tem como objetivo geral estabelecer modelos celulares de *L. infantum* chagasi geneticamente modificados para as enzimas E-NTPDases1 e 2 para sua caracterização funcional. Objetivos específicos: obter clones mutantes de L. infantum chagasi super expressando as E-NTPDases 1 e 2 fusionadas ou não a eGFP; Obter clones mutantes nulos e complementados de *L. infantum* chagasi por CRISPR/Cas9; Avaliação bioquímica e molecular dos mecanismos de adesão e infectividade em macrófagos, dos clones obtidos; Avaliação bioquímica da modulação da resposta imune de macrófagos infectados pelos clones acima adquiridos.

Resumo dos resultados mais relevantes: A super-expressão e a deleção dos genes alvo mostrou uma importância significativa de ambos para a nutrição, adesão e infecção in vitro de *L. infantum chagasi* em macrófagos de linhagem celular.

Responsável técnico: Profa. Juliana Lopes Rangel Fietto

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: cepa DH5α e similares de *Escherichia coli* não patogênica usada para produção de plasmídeos pGEM, pLEXSY_neo2, necessários para realizar as construções para deleção e super-expressão dos genes alvo. Genes utilizados no estudo Cas9, eGFP, NTPDase1 LINF_100006600 e NTPDase2 LINF_150005200 de *Leishmania infantum chagasi* JPCM5). A CAS9 é de origem de Streptococcus pyogenes eGFP de origem do plasmídeo pLEXSY_neo2.

Nível de contenção: NB2. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos I.

Medidas de biossegurança adotadas: Acesso ao laboratório é restrito ao pessoal credenciado junto ao Laboratório, com controle de acesso de usuários. Todas as manipulações envolvendo OGM são realizadas em câmara de fluxo laminar. O trabalho com micro-organismos é feito em capela de fluxo vertical laminar. Todo material de trabalho utilizado como os micro-organismos são descartados após o procedimento de esterilização em autoclave, à temperatura de 121 °C por 20 minutos.

Produtos: ainda não foram publicados artigos com os resultados deste projeto.

5.1.14. Projeto: Avaliação do silenciamento por crispr/cas9 de serine-arginine protein kinases (srpks) na transdução de sinais mediada por thymosin beta 4 (t?4) no contexto da metástase tumoral

Objetivos: Avaliação do silenciamento por CRISPR/Cas9 de Serine-arginine protein kinases (SRPKs) na transdução de sinais mediada por Thymosin Beta 4 (T?4) no contexto da metástase tumoral.

Resumo dos resultados mais relevantes: As linhagens celulares mutantes foram obtidas e estão sendo caracterizadas.

Responsável técnico: Prof. Gustavo Costa Bressan

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: cepa DH5α e similares de *Escherichia coli* não patogênica usada para produção de plasmídeos, necessários para realizar as construções para deleção dos genes alvo. Genes utilizados no estudo Cas9, SRPK1 e SRPK2, genes envolvidos no splicing. Células alvo das deleções por técnica CRISPR/Cas9 linhagem de melanoma B16F10 (controle selvagem e knockouts para SRPK1 e SRPK2).

Nível de contenção: NB2. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos I.

Medidas de biossegurança adotadas: Acesso ao laboratório é restrito ao pessoal credenciado junto ao Laboratório, com controle de acesso de usuários. Todas as manipulações envolvendo OGM são realizadas em câmara de fluxo laminar. O trabalho com micro-organismos é feito em capela de fluxo vertical laminar. Todo material de trabalho utilizado como os micro-organismos são descartados após o procedimento de esterilização em autoclave, à temperatura de 121 °C por 20 minutos.

Produtos: ainda não foram publicados artigos com os resultados deste projeto.

5.1.15. Projeto: Desenvolvimento de um formulado vacinal contra leptospirose a partir de antígenos recombinantes quiméricos produzidos em *Escherichia coli*

Objetivos: desenvolver antígenos recombinantes e formulados vacinais contra a leptospirose.

Resumo dos resultados mais relevantes: Cepas comerciais de *Escherichia coli* não patogênicas são usadas para a clonagem de cDNAs (DH5α e similares) e para a expressão

de proteínas recombinantes (cepas BL21 e similares). Essas cepas bacterianas são transformadas com plasmídeos comerciais (pET e similares) contendo cDNAs codificantes para versões totais ou parciais dos genes alvo de estudo: LigA, LigB, RecA, LipL32 de *Leptospira* spp. – regulam a interação da bactéria ao hospedeiro ou o sistema de reparo ao dano do DNA. Plasmídeos contendo cDNA para expressão de proteínas quiméricas foram gerados, os antígenos recombinantes derivados foram expressos e purificados e estão sendo utilizados em ensaios funcionais.

Responsável técnico: Gustavo Costa Bressan

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Cepas comerciais de *Escherichia coli* não patogênicas são usadas para a clonagem de cDNAs (DH5α e similares) e para a expressão de proteínas recombinantes (cepas BL21 e similares). Essas cepas bacterianas são transformadas com plasmídeos comerciais (pET e similares) contendo cDNAs codificantes para versões totais ou parciais dos genes alvo de estudo: LigA, LigB, RecA, LipL32 de *Leptospira* spp. – regulam a interação da bactéria ao hospedeiro ou o sistema de reparo ao dano do DNA.

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos II, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Medidas de biossegurança adotadas: Acesso ao laboratório é restrito ao pessoal credenciado junto ao Laboratório, com controle de acesso de usuários. Todas as manipulações envolvendo OGM são realizadas em câmara de fluxo laminar. O trabalho com micro-organismos é feito em capela de fluxo vertical laminar. Todo material de trabalho utilizado como os micro-organismos são descartados após o procedimento de esterilização em autoclave, à temperatura de 121 °C por 20 minutos.

Produtos: Até o momento não há publicações ou pedidos de patente associados ao projeto.

5.1.16. Projeto: Novos adjuvantes para potencializar a eficiência de vacinas

Objetivos: desenvolver formulados vacinais que, dentre outros componentes, há a presença da proteína PhaPAz.

Resumo dos resultados mais relevantes: Cepas comerciais de *Escherichia coli* não patogênicas usadas para a clonagem de cDNAs (DH5α e similares) e para a expressão de proteínas recombinantes (cepas BL21 e similares). Essas cepas bacterianas são transformadas com plasmídeos comerciais (pET e similares) contendo cDNA codificante

para a fasina PhaP de Azotobacter sp. – envolvida na diminuição do enovelamento incorreto de proteínas e estresse celular ocasionado pela produção do PHB. A proteína PhaPAz foi obtida e purificada, formulações vacinais foram obtidas e tem sido avaliadas quanto a performance.

Responsável técnico: Gustavo Costa Bressan

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Cepas comerciais de Escherichia coli não patogênicas usadas para a clonagem de cDNAs (DH5α e similares) e para a expressão de proteínas recombinantes (cepas BL21 e similares). Essas cepas bacterianas são transformadas com plasmídeos comerciais (pET e similares) contendo cDNA codificante para a fasina PhaP de Azotobacter sp. – envolvida na diminuição do enovelamento incorreto de proteínas e estresse celular ocasionado pela produção do PHB.

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos II, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Medidas de biossegurança adotadas: Acesso ao laboratório é restrito ao pessoal credenciado junto ao Laboratório, com controle de acesso de usuários. Todas as manipulações envolvendo OGM são realizadas em câmara de fluxo laminar. O trabalho com micro-organismos é feito em capela de fluxo vertical laminar. Todo material de trabalho utilizado como os micro-organismos são descartados após o procedimento de esterilização em autoclave, à temperatura de 121 °C por 20 minutos.

Produtos: Até o momento não há publicações ou pedidos de patente associados ao projeto.

5.1.17. Projeto: Desenvolvimento de kits de diagnóstico rápido para Covid-19 baseados em proteínas recombinantes

Objetivos: Desenvolver antígenos recombinantes e kits de diagnóstico rápido para Covid-19.

Resumo dos resultados mais relevantes: Cepas comerciais de Escherichia coli não patogênicas usadas para a clonagem de cDNAs (DH5α e similares) e para a expressão de proteínas recombinantes (cepas BL21 e similares). Essas cepas bacterianas são transformadas com plasmídeos comerciais (pET e similares) contendo cDNAs codificantes para versões totais ou parciais dos genes alvo de estudo: Genes codificantes para proteína N e proteína S de SARS-CoV-2 bem como para proteína ACE2 humana – essas proteínas são importantes no metabolismo do RNA viral (N) e interação com o hospedeiro (S) através

de ACE2. Plasmídeos contendo cDNA para expressão de proteínas quiméricas foram gerados, os antígenos recombinantes derivados foram expressos e purificados e estão sendo utilizados em ensaios funcionais.

Responsável técnico: Gustavo Costa Bressan

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Cepas comerciais de *Escherichia coli* não patogênicas usadas para a clonagem de cDNAs (DH5α e similares) e para a expressão de proteínas recombinantes (cepas BL21 e similares). Essas cepas bacterianas são transformadas com plasmídeos comerciais (pET e similares) contendo cDNAs codificantes para versões totais ou parciais dos genes alvo de estudo: Genes codificantes para proteína N e proteína S de SARS-CoV-2 bem como para proteína ACE2 humana – essas proteínas são importantes no metabolismo do RNA viral (N) e interação com o hospedeiro (S) através de ACE2.

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos II, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Medidas de biossegurança adotadas: Acesso ao laboratório é restrito ao pessoal credenciado junto ao Laboratório, com controle de acesso de usuários. Todas as manipulações envolvendo OGM são realizadas em câmara de fluxo laminar. O trabalho com micro-organismos é feito em capela de fluxo vertical laminar. Todo material de trabalho utilizado como os micro-organismos são descartados após o procedimento de esterilização em autoclave, à temperatura de 121 °C por 20 minutos.

Produtos: Até o momento não há publicações ou pedidos de patente associados ao projeto.

5.1.18. Projeto: PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA E DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS DIAGNÓSTICAS DE LEPTOSPIROSES

Objetivos: Desenvolver antígenos recombinantes e estratégias diagnósticas de leptospiroses.

Resumo dos resultados mais relevantes: Cepas comerciais de *Escherichia coli* não patogênicas usadas para a clonagem de cDNAs (DH5α e similares) e para a expressão de proteínas recombinantes (cepas BL21 e similares). Essas cepas bacterianas são transformadas com plasmídeos comerciais (pET e similares) contendo cDNAs codificantes para versões totais ou parciais dos genes alvo de estudo: LigA, LigB, RecA, LipL32 de Leptospira spp. – regulam a interação da bactéria ao hospedeiro ou o sistema de reparo ao

dano do DNA. Plasmídeos contendo cDNA para expressão de proteínas quiméricas foram gerados, os antígenos recombinantes derivados foram expressos e purificados e estão sendo utilizados em ensaios funcionais.

Responsável técnico: Prof. Gustavo Costa Bressan

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Cepas comerciais de *Escherichia coli* não patogênicas usadas para a clonagem de cDNAs (DH5α e similares) e para a expressão de proteínas recombinantes (cepas BL21 e similares). Essas cepas bacterianas são transformadas com plasmídeos comerciais (pET e similares) contendo cDNAs codificantes para versões totais ou parciais dos genes alvo de estudo: LigA, LigB, RecA, LipL32 de Leptospira spp. – regulam a interação da bactéria ao hospedeiro ou o sistema de reparo ao dano do DNA.

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos II, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Medidas de biossegurança adotadas: Acesso ao laboratório é restrito ao pessoal credenciado junto ao Laboratório, com controle de acesso de usuários. Todas as manipulações envolvendo OGM são realizadas em câmara de fluxo laminar. O trabalho com micro-organismos é feito em capela de fluxo vertical laminar. Todo material de trabalho utilizado como o micro-organismo, assim como, o micro-organismo são descartados após o procedimento de esterilização em autoclave, à temperatura de 121 °C por 20 minutos.

Produtos: Até o momento não há publicações ou pedidos de patente associados ao projeto.

5.1.19. Projeto: As Serine/ Arginine Protein Kinases de Leishmania braziliensis (LbSRPK) como novo alvo terapêutico para tratamento da leishmaniose tegumentar

Objetivos: Desenvolver estratégias terapêutica contra a leishmanioses a partir da inibição de SRPKs em Leishmania.

Resumo dos resultados mais relevantes: Cepas comerciais de Escherichia coli não patogênicas usadas para a clonagem de cDNAs (DH5α e similares) e para a expressão de proteínas recombinantes (cepas BL21 e similares). Essas cepas bacterianas são transformadas com plasmídeos comerciais (pET e similares) contendo cDNAs codificantes para versões totais ou parciais dos genes alvo de estudo: genes codificantes para proteínas

SR e SRPKs de Leishmania braziliensis, regulam a fosforilação de proteínas SR, o splicing, a migração celular e dinâmica do citoesqueleto. Plasmídeos contendo cDNA para expressão de proteínas quiméricas foram gerados, os antígenos recombinantes derivados foram expressos e purificados e estão sendo utilizados em ensaios funcionais.

Responsável técnico: Raphael de Souza Vasconcellos

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Cepas comerciais de Escherichia coli não patogênicas usadas para a clonagem de cDNAs (DH5α e similares) e para a expressão de proteínas recombinantes (cepas BL21 e similares). Essas cepas bacterianas são transformadas com plasmídeos comerciais (pET e similares) contendo cDNAs codificantes para versões totais ou parciais dos genes alvo de estudo: genes codificantes para proteínas SR e SRPKs de Leishmania braziliensis, regulam a fosforilação de proteínas SR, o splicing, a migração celular e dinâmica do citoesqueleto.

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos II, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Medidas de biossegurança adotadas: Acesso ao laboratório é restrito ao pessoal credenciado junto ao Laboratório, com controle de acesso de usuários. Todas as manipulações envolvendo OGM são realizadas em câmara de fluxo laminar. O trabalho com micro-organismos é feito em capela de fluxo vertical laminar. Todo material de trabalho utilizado como os micro-organismos são descartados após o procedimento de esterilização em autoclave, à temperatura de 121 °C por 20 minutos.

Produtos: Até o momento não há publicações ou pedidos de patente associados ao projeto.

5.1.20. Projeto: Desenvolvimento e validação de kit de diagnostico rápido indireto para COVID 19 usando proteína quimérica

Objetivos: desenvolver antígenos recombinantes e kits de diagnóstico rápido para Covid-19.

Resumo dos resultados mais relevantes: Cepas comerciais de Escherichia coli não patogênicas usadas para a clonagem de cDNAs (DH5α e similares) e para a expressão de proteínas recombinantes (cepas BL21 e similares). Essas cepas bacterianas são transformadas com plasmídeos comerciais (pET e similares) contendo cDNAs codificantes para versões totais ou parciais dos genes alvo de estudo: Genes codificantes para proteína N e proteína S de SARS-CoV-– essas proteínas são importantes no metabolismo do RNA

viral (N) e interação com o hospedeiro (S) através de ACE2. Plasmídeos contendo cDNA para expressão de proteínas quiméricas foram gerados, os antígenos recombinantes derivados foram expressos e purificados e estão sendo utilizados em ensaios funcionais.

Responsável técnico: Juliana Lopes Rangel Fietto

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Cepas comerciais de Escherichia coli não patogênicas usadas para a clonagem de cDNAs (DH5α e similares) e para a expressão de proteínas recombinantes (cepas BL21 e similares). Essas cepas bacterianas são transformadas com plasmídeos comerciais (pET e similares) contendo cDNAs codificantes para versões totais ou parciais dos genes alvo de estudo: Genes codificantes para proteína N e proteína S de SARS-CoV-– essas proteínas são importantes no metabolismo do RNA viral (N) e interação com o hospedeiro (S) através de ACE2.

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos II, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Medidas de biossegurança adotadas: Acesso ao laboratório é restrito ao pessoal credenciado junto ao Laboratório, com controle de acesso de usuários. Todas as manipulações envolvendo OGM são realizadas em câmara de fluxo laminar. O trabalho com micro-organismos é feito em capela de fluxo vertical laminar. Todo material de trabalho utilizado como o micro-organismo, assim como, o micro-organismo são descartados após o procedimento de esterilização em autoclave, à temperatura de 121 °C por 20 minutos.

Produtos: Até o momento não há publicações ou pedidos de patente associados ao projeto.

5.1.21. Projeto: PADRONIZAÇÃO DA LiNTPDase2 RECOMBINANTE E QUIMERAS DERIVADAS COMO ANTÍGENOS EM ENSAIOS DE ELISA E IMUNOCROMATOGRÁFICOS PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Objetivos: desenvolver antígenos recombinantes e estratégias diagnósticas de leishmaniose canina

Resumo dos resultados mais relevantes: Cepas comerciais de Escherichia coli não patogênicas usadas para a clonagem de cDNAs (DH5α e similares) e para a expressão de proteínas recombinantes (cepas BL21 e similares). Essas cepas bacterianas são transformadas com plasmídeos comerciais (pET e similares) contendo cDNAs codificantes para versões totais ou parciais dos genes alvo de estudo: ENTPDases de Leishmania

infantum chagasi – envolvidas na hidrólise de nucleotídeos tri e difosfatados que regulam vários processos celulares através da sinalização purinérgica, e atuam como molécula de adesão celular. Plasmídeos contendo cDNA para expressão de proteínas quiméricas foram gerados, os antígenos recombinantes derivados foram expressos e purificados e estão sendo utilizados em ensaios funcionais.

Responsável técnico: Juliana Lopes Rangel Fietto

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: cepas comerciais de Escherichia coli não patogênicas usadas para a clonagem de cDNAs (DH5α e similares) e para a expressão de proteínas recombinantes (cepas BL21 e similares). Essas cepas bacterianas são transformadas com plasmídeos comerciais (pET e similares) contendo cDNAs codificantes para versões totais ou parciais dos genes alvo de estudo: ENTPDases de *Leishmania infantum* chagasi – envolvidas na hidrólise de nucleotídeos tri e difosfatados que regulam vários processos celulares através da sinalização purinérgica, e atuam como molécula de adesão celular.

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos II, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Medidas de biossegurança adotadas: Acesso ao laboratório é restrito ao pessoal credenciado junto ao Laboratório, com controle de acesso de usuários. Todas as manipulações envolvendo OGM são realizadas em câmara de fluxo laminar. O trabalho com micro-organismos é feito em capela de fluxo vertical laminar. Todo material de trabalho utilizado como o micro-organismo, assim como, o micro-organismo são descartados após o procedimento de esterilização em autoclave, à temperatura de 121 °C por 20 minutos.

Produtos: Até o momento não há publicações ou pedidos de patente associados ao projeto.

5.1.22. Projeto: Caracterização fisiológica, molecular e genética de linhagens morfologicamente e ecologicamente distintas de cianobactérias

Objetivos: Investigar como, e em que extensão, alterações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, bem como genômicas (expressão e regulação) e proteômicas estão envolvidas nas respostas a estresses abióticos em cianobactérias.

Resumo dos resultados mais relevantes:

As cianobactérias (filo Cyanobacteria, domínio Bacteria) constituem um grupo de procariotos gram-negativos, capazes de realizar fotossíntese oxigênica. As cianobactérias

além de muito diversas em termos morfológicos e filogenéticos e da sua importância nos ciclos do carbono e nitrogênio, são fontes de compostos com bioatividades variadas.

Equipe: Wagner Luiz Araújo (Líder); Adriano Nunes-Nesi, Mariana Machado, Marcelo Vaz

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Serão utilizadas construções visando à superexpressão e silenciamento gênico de genes envolvidos em estresses em linhagens morfologicamente e ecologicamente distintas de cianobactérias, a saber: *Synechocystis* sp. PCC6803 e *Synechocystis* sp. CCM-UFV039, unicelulares; *Arthrospira platensis* PCC7345 e *Pseudanabaena* sp. CCM-UFV063, filamentosas homocitadas; e *Nostoc* sp. PCC7120 e *Desmonostoc* sp. CCM-UFV018, filamentosas heterocitadas. Para sequenciamento dos fragmentos gênicos relativos às sequências de genes envolvidos na resposta ao estresse, os produtos das amplificações serão ligados em vetor plasmidial (pGEM®-T Easy Vector) de acordo com o fabricante, e transformados em células competentes de *E. coli* Dh5α.

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados na Unidade de Crescimento de Plantas, do Departamento de Biologia Vegetal.

Medidas de biossegurança adotadas: Acesso ao laboratório é restrito ao pessoal credenciado junto ao Laboratório, com controle de acesso de usuários. Todo o trabalho com OGMs ainda está sendo realizado em laboratório, devidamente equipados com câmara de fluxo laminar para manuseio de material bacteriano. Após a sua manipulação, todos os materiais incluindo microtubos, ponteiras de micropipetas, vidrarias e placas com meios de cultura são autoclavados antes de serem descartados. Uma vez obtidas cianobactérias geneticamente modificadas *in vitro*, estas serão aclimatadas em laboratórios devidamente adaptados e em condições de confinamento, segundo Normas estabelecidas pela CTNBio.

Produtos: Até o momento não há publicações ou pedidos de patente associados ao projeto.

5.1.23. Projeto: Como o estresse por Alumínio pode afetar o metabolismo mitocondrial e reparo de DNA em plantas?

Objetivos: Investigar como, e em que extensão, alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, bem como genômicas (expressão e regulação) e proteômicas estão envolvidas na resposta ao estresse por Al em plantas.

Resumo dos resultados mais relevantes: Ensaios fenotípicos com plantas cultivadas relevantes das famílias Poaceae (cereais) e Solanaceae (tomate, batata, tabaco), além de milho e Arabidopsis serão realizados para revelar a aspectos genéticos envolvidos na modulação da tolerância ao Alumínio (Al).

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Serão utilizadas linhas de T-DNA para genes envolvidos no estresse por Al em *Arabidopsis thaliana*. Em adição, mutantes insensíveis ao fotoperíodo no fundo de tomate cultivado (especificamente SELF PRUNING (SP) e SINGLE FLOWER TRUSS (SFT) serão utilizadas bem como cinco genótipos de milho (Zea mays), a saber: (i) L53, linhagem padrão de sensibilidade ao Al e (ii) NIL5, L53 introgredida com o ZmMATE1 (gene MATE1 originário do milho); (iii) linhagem elite de milho com tolerância intermediária ao Al (L3); (vi) linhagem L3 introgredida com o gene *ZmMATE1* derivado da linhagem Cateto Al237 por meio de retrocruzamento assistido (*L3_ZmMATE1*) e (v) linhagem L3 apresentando superexpressão do gene *SbMATE*de sorgo (*L3_SbMATE*) com alta tolerância ao Al^{3+}, porém baixa performance em campo (metade da produção de grãos da linhagem L3). Tais materiais vegetais serão gentilmente cedidos pela Embrapa Milho e Sorgo.

Para sequenciamento dos fragmentos gênicos relativos às sequências de genes envolvidos na resposta ao estresse, os produtos das amplificações serão ligados em vetor plasmidial (*pGEM*®-T Easy *Vector*) de acordo com o fabricante, e transformados em células competentes de *E. coli* Dh5α.

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados na Unidade de Crescimento de Plantas.

Medidas de biossegurança adotadas: Acesso ao laboratório é restrito ao pessoal credenciado junto ao Laboratório, com controle de acesso de usuários. Todo o trabalho com OGMs é realizado em laboratório, devidamente equipados com câmara de fluxo laminar para manuseio de material bacteriano, câmaras de crescimento para crescimento de plantas. Após a sua manipulação, todos os materiais, incluindo microtubos, ponteiras de micropipetas, vidrarias e placas com meios de cultura são autoclavados antes de serem descartados. Uma vez obtidas, as plantas geneticamente modificadas in vitro serão aclimatadas em laboratórios devidamente adaptados e em condições de confinamento, segundo Normas estabelecidas pela CTNBio.

Equipe envolvida: Wagner Luiz Araújo (Líder); Adriano Nunes-Nesi, Bianca Bueno Nogueira, Débora Gonçalves Gouveia, Marcelle Ferreira Silva, Welder Alves da Silva

Órgão financiador: FAPEMIG, CAPES e CNPq.

Resultado parcial: projeto em andamento

5.1.24. Projeto: Caracterização funcional de genes codificando transportadores mitocondriais da família MCF e enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA cycle) em *Arabidopsis thaliana*

Objetivos: Caracterizar fisiologicamente plantas de *A. thaliana* com reduzida expressão de carreadores mitocondriais e enzimas do ciclo TCA sob condições ambientais ótimas, bem como sob condições adversas ao crescimento e desenvolvimento.

Resumo dos resultados mais relevantes: Linhas T-DNA knockouts de *Arabidopsis thaliana* para os genes codificando AACs (AAC1, At3g08580; AAC2, At5g13490; AtAAC3, At4g28390), ADNT1 (At4g01100), NDTs (NDT1, At2g47490; NDT2, At1g25380; PXN At2g39970) e isoformas de subunidades da enzima 2-OGDH (e1-ogdh1.2, At3g55410; e e1-ogdh2.2, At5g65750) foram geradas e estão sendo caracterizadas fenotipicamente.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Linhas de *Arabidopsis thaliana* T-DNA knockouts para os genes indicados acima. Genes introduzidos: *SUL1* (resistência à sulfadiazina) e/ou NPTII (resistência a canamicina).

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados na Unidade de Crescimento de Plantas.

Medidas de biossegurança adotadas: Acesso ao laboratório é restrito ao pessoal credenciado junto ao Laboratório, com controle de acesso de usuários. Todo o trabalho com OGMs é realizado em laboratório, devidamente equipados com câmara de fluxo laminar para manuseio de material bacteriano, câmaras de crescimento para crescimento de plantas. Após a sua manipulação, todos os materiais, incluindo microtubos, ponteiras de micropipetas, vidrarias e placas com meios de cultura são autoclavados antes de serem descartados. Uma vez obtidas, as plantas geneticamente modificadas *in vitro* serão aclimatadas em laboratórios devidamente adaptados e em condições de confinamento, segundo Normas estabelecidas pela CTNBio.

Equipe envolvida: Adriano Nunes-Nesi (Líder), Wagner Luiz Araújo

Órgão financiador: FAPEMIG, CAPES e CNPq.

Resultado parcial: projeto em andamento

5.1.25. Transformação genética de *Brachypodium distichum*, *Passiflora* e *Solanum melongena*

Objetivos: O objetivo é avaliar possíveis modificações morfo-fisiológicas de RNAs pequenos (miRNAs) nos padrões de brotação lateral (arquitetura da planta) plantas regeneradas e aclimatizadas, bem como sobre o desenvolvimento de embriões zigóticos e somáticos de *Brachypodium distychum* e de *Solanum melongena*. Isso será realizado mediante a transformação de calos embriogênicos das duas espécies com construções contendo RNA pequenos (miR156 e miR529 de *Arabidopsis thaliana*) em *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101, EHA 105, LBA 4404 e AGL-1. Há relatos na literatura de que esses miRNAs controlam a heteroblastia e a dominância apical, além de desenvolvimento de frutos.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Serão utilizadas construções visando à superexpressão e silenciamento gênico de miRNAS 156 (p35S:AtMIR156b e o p35S:MIM156b) e miRNA159 (p35S:AtMIR159 e o p35S:MIM159) em Brachypodium, Passiflora e berinjela. As seguintes estirpes de *Agrobacterium tumefaciens* serão utilizadas: GV 3101, EHA 105, LBA4404 e AGL-1.

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos/BIOAGRO

Medidas de biossegurança adotadas: Todo o trabalho com PGMs ainda está sendo realizado em laboratório, devidamente equipados com câmara de fluxo laminar para manuseio de material bacteriano e vegetal. Após a sua manipulação, todos os materiais incluindo microtubos, ponteiras de micropipetas, vidrarias e placas com meios de cultura são autoclavados antes de serem descartados. Uma vez obtidas plantas geneticamente modificadas in vitro, estas serão aclimatadas em casa de vegetação devidamente adaptada e em condições de confinamento, segundo Normas estabelecidas pela CTNBio.

Equipe envolvida: Wagner Campos Otoni (Líder); Fábio Tebaldi Silveira Nogueira; Marcio Gilberto Cardoso Costa; Evelyn Jardim de Oliveira; Lorena Melo Vieira; Geraldo Felipe F. e Silva.

Órgão financiador: FAPEMIG e CNPq.

Resultado parcial:

Tese

Mamedes-Rodrigues, T.C. (2017) *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv.: caracterização metabólica e estabilidade genética durante a embriogênese somática e modulação da parede celular pela luz.

Dissertação

Jéssica R. Soares (2020). Efeitos da suprexpressão do microRNA156 sobre a morfofisiologia de *Passiflora edulis* Sims. durante a transição de fase juvenil/adulta. Dissertação, Mestrado em Fisiologia Vegetal, UFV.

Publicações:

Oliveira, E.J., Koehler, A.D., Rocha, D.I. *et al.* Morpho-histological, histochemical, and molecular evidences related to cellular reprogramming during somatic embryogenesis of the model grass *Brachypodium distachyon* . *Protoplasma* **254,** 2017–2034 (2017). https://doi.org/10.1007/s00709-017-1089-9

Mamedes-Rodrigues, T.C., Batista, D.S., Vieira, N.M. *et al.* Regenerative potential, metabolic profile, and genetic stability of *Brachypodium distachyon* embryogenic calli as affected by successive subcultures. *Protoplasma* **255,** 655–667 (2018). https://doi.org/10.1007/s00709-017-1177-x

Mamedes-Rodrigues, T.C., Batista, D.S., Napoleão, T.A. *et al.* Lignin and cellulose synthesis and antioxidative defense mechanisms are affected by light quality in *Brachypodium distachyon* . *Plant Cell Tiss Organ Cult* **133,** 1–14 (2018). https://doi.org/10.1007/s11240-017-1356-7

Mamedes-Rodrigues, T.C., Batista, D.S., Napoleão, T.A. *et al.* Regulation of cell wall development in *Brachypodium distachyon* in vitro as affected by cytokinin and gas exchange. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **136,** 207–219 (2019). https://doi.org/10.1007/s11240-018-1506-6.

Silva, M.L., Paim Pinto, D.L., Passos, A.B. *et al.* Novel and efficient transformation of wild passion fruit (*Passiflora cincinnata* Mast.) using sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 57, 380–386 (2021). https://doi.org/10.1007/s11627-020-10134

5.1.26. Transformação genética visando estudos de desenvolvimento e produção de metabólitos secundários

Espécies envolvidas: *Passiflora (P. alata*, *P. edulis* e *P. cincinnata*), urucum (*Bixa orellana*), citrus, *Crotalaria* sp., *Pfaffia glomerata* e *Hebanthe paniculata.*

Objetivos: O objetivo é avaliar possíveis modificações morfo-fisiológicas de RNAs pequenos (miRNAs) nos padrões de brotação lateral (arquitetura da planta) e morfologia foliar (blastia) em plantas regeneradas e aclimatizadas. Isso será realizado mediante a transformação das espécies com construções contendo RNA pequenos (miR156 e miR529 de *Arabidopsis thaliana*) em *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101, EHA 105, LBA 4404 e AGL-1. Para *Crotalaria, Hebanthe* e *Pfaffia* será utilizada a estirpe R1601 de *Agrobacterium rhizogenes* visando à produção de raízes transformadas para a avaliação de metabólitos secundários de interesse nas mesmas.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto:

Serão utilizadas construções visando à superexpressão e silenciamento gênico de miRNAS 156 (p35S:AtMIR156b e o p35S:MIM156b) e miRNA159 (p35S:AtMIR159 e o p35S:MIM159, para *Passiflora alata*, *Bixa orellana*, *Citrus.* As seguintes estirpes de *Agrobacterium tumefaciens* serão utilizadas: GV 3101, EHA 105, LBA4404 e AGL-1. Ainda, para *B. orellana*, a transformação de *B. orellana* via *A. tumefaciens* com vetor para edição de genes alvos da via de biossíntese de bixina [*CCD4*-3, *ALDH3H1-1* e *SABATH*4] será realizado segundo protocolo descrito por Faria et al. (2021).

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos/BIOAGRO

Medidas de biossegurança adotadas: Todo o trabalho com OGMs ainda está sendo realizado em laboratório, devidamente equipado com câmara de fluxo laminar para manuseio de material bacteriano e vegetal. Após a sua manipulação, todos os materiais, incluindo microtubos, ponteiras de micropipetas, vidrarias e placas com meios de cultura são autoclavados antes de serem descartados. Uma vez obtidas plantas geneticamente modificadas *in vitro*, estas serão aclimatizadas em casa de vegetação devidamente adaptada e em condições de confinamento, segundo Normas estabelecidas pela CTNBio.

Equipe envolvida: Wagner Campos Otoni (Líder); Fábio Tebaldi Silveira Nogueira; Marcio Gilberto Cardoso Costa; Kleiton Lima de Godoy Machado; Marcos Bruno Duarte,

Jessenia Jéssica Ribeiro Soares, Adriano Nunes-Nesi, Lana L. Lima, Lázara L. Simões, Claudinei Souza, Daniele Vidal Faria, Andréa Dias Koehler, Lorena Melo Vieira;

Órgão financiador: FAPEMIG e CNPq.

Resultado parcial: projeto em andamento

5.1.27. Tolerância de plantas a estresses bióticos e abióticos

Objetivos: Estudos recentes indicaram que níveis elevados de BiP em *N. tabacum* e soja conferiram tolerância a estresse hídrico durante crescimento da planta. O efeito da hiperexpressão de soyBiPD no acúmulo de proteínas secretórias de defesa e no sistema antioxidativo das plantas de soja está sendo avaliado. Dado o potencial de BiP em regular a via UPR de defesa a estresse do RE e de manter o turgor foliar em plantas transgênicas submetidas a déficit hídrico, a convergências destas vias será analisada por ensaios de microarranjos em soja e consistirão na análise da expressão de milhares de cDNas nas condições referidas de estresses. Tais estudos visam a elucidação das bases moleculares das interações entre células de plantas com seu ambiente, por meio de vias de sinalização conectadas ao retículo endoplasmático.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Região codificadora do gene soyBIPD obtido de soja, obtidos em construções em sentido senso e antisenso clonados em vetores binários sob o controle do promotor 35S do CAMV.

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (BIOAGRO).

Medidas de biossegurança adotadas: 1. Acesso ao laboratório restrito ao pessoal credenciado junto ao Bioagro, controlado pelo pesquisador principal. 2. Todas as manipulações envolvendo PGM são realizadas em câmara de fluxo laminar ou câmara-de-crescimento predeterminadas para esta finalidade. 3. Toda PGM mantida em casa-de-vegetação tem acesso controlado por meio de chave, e todas as flores são eliminadas na fase de botão (antes da primeira antese) a fim de impedir a disseminação de pólen. Material vegetal com finalidade de multiplicação de sementes é mantido em ambiente de contenção a fim de impedir a liberação de sementes ao meio ambiente. 4. Toda PGM é autoclavada antes do descarte, bem como o solo.

Equipe envolvida: Elizabeth Pacheco Batista Fontes (Líder); Francisco Murilo Zerbini; Wagner Campos Otoni; Francisco J. L. Aragão; Humberto Henrique de Carvalho; Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria; Pedro A.B. Reis.

Órgão financiador: FAPEMIG e CNPq

Resultado parcial: dissertação de mestrado e tese de doutorado em andamento

5.1.28. Aprimoramento de uma vacina de DNA para o vírus dengue-2

Objetivos: Este projeto tem como objetivo o aprimoramento de uma vacina de DNA recombinante para o vírus dengue-2, projeto este, que será desenvolvido em nosso laboratório em colaboração com o Laboratório de Virologia Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, visando à produção de uma vacina tetravalente para os vírus dengue. Estas vacinas são baseadas na expressão de proteínas estruturais destes vírus por DNA plasmidial com o intuito de desenvolver uma resposta imune específica para o controle desta enfermidade. Os plasmídeos recombinantes contendo os genes das proteínas estruturais dos vírus dengue serão inoculados em camundongos, intramuscularmente ou pela via intradérmica, e estes animais serão estudados quanto ao desenvolvimento de resposta imune específica para o vírus dengue.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Organismo receptor: *Escherichia coli*; Organismo parental: Dengue virus II; Construção genética utilizada: cDNA do gene da proteína E, Proteína prM, proteínas NS1 do vírus da Dengue (NC_001474.2); Vetor: pET22b(+).

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Imunovirologia Molecular.

Medidas de biossegurança adotadas: Acesso ao laboratório restrito ao pessoal credenciado junto ao Laboratório, controlado por cartão. Todas as manipulações envolvendo OGM são realizadas em câmara de fluxo laminar. O trabalho com o micro-organismo é feito em capela de fluxo vertical laminar. Todo material de trabalho utilizado como o micro-organismo, assim como, o micro-organismo são descartados após o procedimento de esterilização em autoclave, à temperatura de 121 °C por 20 minutos.

Equipe envolvida: Sergio Oliveira de Paula (Lider); Michelle Dias de Oliveira; Roberto Sousa Dias; Juliana Morais de Castro Monteiro.

Órgão financiador: FAPEMIG e CNPq.

Resultado Parcial: Publicação de 2 artigos científicos (doi: 10.1007/s00299-015-1753-5; doi: 10.1007/s00253-014-5963-5)

5.1.29. Desenvolvimento de protótipos de kits de diagnóstico rápido por imunocromatografia para Leishmaniose e Dengue para uso em grande escala e condições de campo.

Objetivos: O principal objetivo deste projeto é o desenvolvimento de protótipos de kits para diagnóstico rápido de Leishmaniose e Dengue, por imunocromatografia, para serem usados futuramente em testes de campo para agilização de diagnóstico em casos de suspeita destas infecções e uso em escala maior para inquéritos epidemiológicos. Abaixo seguem os objetivos específicos deste projeto. A) Desenvolver tecnologia nacional com perspectiva de exportação. B) Oferecer alternativas nacionais inovadoras para o diagnóstico de leishmaniose e dengue que sejam mais rápidos e práticos. C) Satisfazer a necessidade do mercado e atender demanda latente da área médica e veterinária (neste último caso exclusivamente no caso da leishmaniose por ser uma zoonose). D) Fortalecer a possível comercialização da patente sobre o uso da E-NTPDases recombinantes de Leishmania sp. E) Testar os protótipos de kits de diagnóstico em um estudo retrospectivo em soroteca humana e de cães.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: *Escherichia coli* BL21

Nível de contenção: NB-1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos 2.

Medidas de biossegurança adotadas: Em relação ao acesso, a área em regime de contenção será permitido somente a pesquisadores e funcionários diretamente envolvidos no trabalho, os quais serão informados previamente sobre as normas de biossegurança. A manipulação/descarte de material que entraram em contato com o microrganismo transformado será realizada seguindo os mais exigentes padrões de contenção, com recipientes destinados exclusivamente ao descarte destes materiais seguido de autoclavagem e por fim eliminação dos resíduos por incineração. A referida área de trabalho possuirá um livro de registro de informações sobre os experimentos em andamento e haverá uma sinalização na entrada do laboratório indicando a experimentação com OGMs. Todo e qualquer acidente, bem como as informações inerentes aos OGMs serão informados à CIBio da instituição.

Equipe envolvida: Juliana Lopes Rangel Fietto (Líder); Ronny Francisco de Souza; Sidimar Sossai; Marilane de Oliveira Fani Amaro; Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo; Sérgio Oliveira de Paula.

Órgão financiador: FAPEMIG

Resultado parcial: Tese de doutorado em andamento

5.1.30. Avaliação da resposta imunológica e prevenção da infecção congênita em camundongos BALB/c imunizados com os peptídeos recombinantes rsNcSAG4 e rsNcGRA1 derivados de *Neospora caninum*.

Objetivos: Este trabalho visa produzir candidatos vacinais, desenhados a partir de proteínas de grânulo denso (envolvidos na formação do complexo apical utilizado na fixação do parasito ao hospedeiro) e de superfície do parasito (envolvidos no reconhecimento e geração de resposta imune) expressos em leveduras Komagataella (Pichia) pastoris. Em seguida, testar estes candidatos quanto ao seu potencial de geração de resposta imune celular e humoral, potencial para limitar a infecção e eliminação do parasita em animais infectados e prevenção da infecção congênita. (Modelo experimental BALB/c) Os objetivos específicos são: Expressar em leveduras Komagataella (Pichia) pastoris, os minigenes sintéticos desenhados com base nas proteínas NcGRA1 e NcSAG4 de *Neospora caninum*; Purificar as proteínas expressadas em sistema de exclusão molecular para execução do ensaio vacinal. Purificar as proteínas expressadas em sistema de cromatografia de coluna de afinidade para avaliação do rendimento da produção da proteína específica. Imunizar camundongos fêmeas com os peptídeos isolados e simultaneamente e avaliar a capacidade de prevenção da infecção congênita, frente a diferentes doses. Avaliar a resposta imune humoral pela produção de IgGs no soro; Avaliar a resposta imune celular por quantificação de citocinas no sobrenadante da cultura de esplenócitos. Avaliar a capacidade de reconhecimento e apresentação dos candidatos vacinais por marcação em Imunohistoquímica de linfonodos. Avaliar a capacidade de limitar a disseminação do parasita pela detecção em amostras teciduais de animais vacinados; Avaliar o potencial para evitar a transmissão vertical pela detecção e quantificação de DNA do parasita em amostras teciduais dos filhotes.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Organismo receptor: Komagataella (Pichia) pastoris. Organismo parental: Neospora caninum; Construção

genética utilizada: minigenes sintéticos desenhados com base nas proteínas NcGRA1 e NcSAG4

Nível de contenção: NB-1. Os experimentos estão sendo realizados nas dependências do BIOAGRO.

Medidas de biossegurança adotadas: Acesso permitido somente a pesquisadores e funcionários. A manipulação/descarte de material que entraram em contato com o microrganismo transformado será realizada seguindo os padrões de contenção, com recipientes destinados ao descarte destes materiais seguido de autoclavagem. Todo e qualquer acidente, bem como as informações inerentes aos OGMs serão informados à CIBio da instituição.

Equipe envolvida: Marlene Isabel Vargas Viloria (Líder); Cíntia Fernandes Fidélis; Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo; Sirley Adriana Ortiz Bedoya; Andrés Maurício Ortega Orozco; Pablo Alencar Prates Patarroyo; Larissa de Cássia Basílio.

Órgão financiador: CAPES

Resultado Parcial: não há

5.1.31. Produção de hormônio recombinante bioativo glicosilado

Objetivos: Neste projeto propõe-se uma forma alternativa de expressão heteróloga de um hormônio utilizado em programas de inseminação artificial principalmente em fêmeas bovinas de corte devido a possibilidade de manipulação do ciclo estral e indução de superovulação. Este hormônio deve para isto estar em sua forma nativa e glicosilada. Sua produção atual pela indústria Veterinária é hoje baseada em purificação a partir de material advindo de aborto em éguas. Neste projeto propomos a produção do hormônio recombinante em um novo sistema de expressão heterólogo baseado em eucarioto unicelular, a fim de se ter um produto de mais fácil produção e controle e de origem nacional para suprir as necessidade do mercado.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Organismo receptor: *Leishmania tarentolae*. Organismo parental: *Bos taurus*; Construção genética utilizada: genes sintéticos desenhados com base na proteína específica do oviduto (pOSP).

Nível de contenção: NB-1. Realizado no Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos

Medidas de biossegurança adotadas: Em relação ao acesso, a área em regime de contenção será permitido somente a pesquisadores e funcionários diretamente envolvidos no trabalho, os quais serão informados previamente sobre as normas de biossegurança. A manipulação/descarte de material que entraram em contato com o microrganismo transformado será realizada seguindo os mais exigentes padrões de contenção, com recipientes destinados exclusivamente ao descarte destes materiais seguido de autoclavagem e por fim eliminação dos resíduos por incineração. A referida área de trabalho possuirá um livro de registro de informações sobre os experimentos em andamento e haverá uma sinalização na entrada do laboratório indicando a experimentação com OGMs. Todo e qualquer acidente, bem como as informações inerentes aos OGMs serão informados à CIBio da instituição.

Equipe envolvida: Juliana Lopes Rangel Fietto (Líder); Tatiana Aparecida de Oliveira; Abelardo Silva Júnior; Gustavo Costa Bressan; Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo; Bárbara Braga Ferreira.

Órgão financiador: CAPES

Resultado parcial: Tese de doutoramento em andamento

5.1.32. Desenho e produção de proteínas recombinantes para uso como agentes biossurfactantes

Objetivos: Analisar in silico a sequência primária da proteína PhaPaz quanto às suas características estruturais preditas e potencial emulsificante; - Propor adaptações na sequência original dessa proteína visando a otimização de seu potencial emulsificante; - Padronizar processos para a expressão e recuperação da PhaPaz e suas variantes a partir de sistema heterólogo bacteriano. - Avaliar as características físico-químicas de diferentes emulsões água-óleo formadas a partir das construções propostas; - Selecionar a construção que apresente melhor potencial surfactante e avaliar como a concentração da proteína, tratamentos térmicos, o pH e a concentração salina influenciam as propriedades das emulsões formadas por ela; - Avaliar o potencial antimicrobiano da proteína selecionada; - Avaliar o uso da proteína selecionada como adjuvante, na emulsificação de óleos derivados de petróleo e na solubilização de leite em pó.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Organismo receptor: *E. coli*. Organismo parental: *Azotobacter sp*; Construção genética utilizada: sequência primária da proteína PhaPaz.

Nível de contenção: NB-1. Realizado no Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos 2

Medidas de biossegurança adotadas: Em relação ao acesso, a área em regime de contenção será permitido somente a pesquisadores e funcionários diretamente envolvidos no trabalho, os quais serão informados previamente sobre as normas de biossegurança. A manipulação/descarte de material que entraram em contato com o microrganismo transformado será realizada seguindo os mais exigentes padrões de contenção, com recipientes destinados exclusivamente ao descarte destes materiais seguido de autoclavagem e por fim eliminação dos resíduos por incineração. A referida área de trabalho possuirá um livro de registro de informações sobre os experimentos em andamento e haverá uma sinalização na entrada do laboratório indicando a experimentação com OGMs. Todo e qualquer acidente, bem como as informações inerentes aos OGMs serão informados à CIBio da instituição.

Equipe envolvida: Gustavo Costa Bressan (Lider); Rafael Locatelli Salgado; Fernanda Gonçalves Barbosa; Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo; Juliana Lopes Rangel Fietto; Abelardo Silva Júnior.

Órgão financiador: Projeto Autônomo

Resultado parcial: Uma patente (BR 10 2015 030932 5)

5.1.33. Produção de kit de diagnóstico rápido para *Leishmaniose canina* usando antígeno recombinante e imunocromatografia por fluxo lateral

Objetivos: Este projeto tem como principal objetivo a produção de um protótipo de kit de diagnóstico pelo método de imunocromatografia por Fluxo Lateral (Lateral Flow Test) para Leishmaniose canina. Para isso o projeto prevê a produção heteróloga de um antígeno recombinante de agente *Leishmania infantum chagasi*, em sistema procarioto (*Escherichia coli*) e sua utilização no kit respectivo para uso em diagnóstico rápido de casos suspeitos e para uso a campo em inquéritos e vigilância epidemiológicos em população.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Organismo receptor: *E. coli*. Organismo parental: *Leishmania infantum chagasi*; Construção genética utilizada: sequência de peptídeos de superfície (sob sigilo).

Nível de contenção: NB-1. Realizado no Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos 2

Medidas de biossegurança adotadas: Em relação ao acesso, a área em regime de contenção será permitido somente a pesquisadores e funcionários diretamente envolvidos no trabalho, os quais serão informados previamente sobre as normas de biossegurança. A manipulação/descarte de material que entraram em contato com o microrganismo transformado será realizada seguindo os mais exigentes padrões de contenção, com recipientes destinados exclusivamente ao descarte destes materiais seguido de autoclavagem e por fim eliminação dos resíduos por incineração. A referida área de trabalho possuirá um livro de registro de informações sobre os experimentos em andamento e haverá uma sinalização na entrada do laboratório indicando a experimentação com OGMs. Todo e qualquer acidente, bem como as informações inerentes aos OGMs serão informados à CIBio da instituição.

Equipe envolvida: Juliana Lopes Rangel Fietto (Líder); Jean Carlos Heleno Campos; Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo; Ronny Francisco de Souza.

Órgão financiador: CNPq

Resultado parcial: tese de doutorado em andamento

5.1.34. Expressão, purificação e caracterização de endoxilanases GH11 termoestáveis e avaliação das enzimas recombinantes em processos industriais

Objetivos: A ampliação da utilização de enzimas em processos industriais e o mercado mundial dessas macromoléculas estão em rápida expansão, visto as vantagens que esses biocatalisadores conferem. Entretanto, para aplicação biotecnológica de enzimas, é necessário que estas apresentem alta atividade e estabilidade sob as condições dos processos industriais requeridos e que sejam produzidas em grande quantidade para viabilizar economicamente sua utilização. A engenharia de proteínas associada às técnicas de clonagem vem avançando rapidamente no sentido de otimizar a produção de enzimas visando aplicação industrial.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Organismo receptor: *E. coli*. Organismo parental: *Bacillus subtilis*; Construção genética utilizada: sequência de endoxilanases GH11.

Nível de contenção: NB-1 Realizado no Bioagro.

Medidas de biossegurança adotadas: Acesso permitido somente a pesquisadores e funcionários. A manipulação/descarte de material que entraram em contato com o microrganismo transformado será realizada seguindo os padrões de contenção, com recipientes destinados ao descarte destes materiais seguido de autoclavagem. Todo e qualquer acidente, bem como as informações inerentes aos OGMs serão informados à CIBio da instituição

Equipe envolvida: Valéria Monteze Guimarães (Líder); Sebastião Tavares de Rezende; Ronaldo Alves Pinto Nagem; Jorge Luiz Colodette; Larissa Mattos Trevizano; Rafaela Zandonade Ventorim; Daniel Luciano Falkoski.

Órgão financiador: CNPq

Resultado parcial: um artigo publicado (doi: 10.1002/jsfa.9242)

5.1.35. Desenvolvimento de uma vacina tetravalente de DNA recombinante utilizando o domínio III da proteína e do vírus da dengue

Objetivos: Desenvolvimento de uma vacina tetravalente de DNA recombinante utilizando o domínio III da proteína E dos vírus da dengue. OBJETIVOS ESPECÍFICOS: Extração do RNA e PCR; Clonagem em vetor de clonagem; Clonagem em vetor de expressão; Seleção dos plasmídeos recombinantes; Avaliação bioquímica dos plasmídeos recombinantes.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Organismo receptor: *Escherichia coli*; Organismo parental: *Dengue virus II*; Construção genética utilizada: cDNA do gene utilizando o domínio III da proteína E do vírus da Dengue; Vetor: pVax

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Imunovirologia Molecular

Medidas de biossegurança adotadas: Acesso ao laboratório restrito ao pessoal credenciado junto ao Laboratório, controlado por cartão. Todas as manipulações envolvendo OGM são realizadas em câmara de fluxo laminar. O trabalho com o micro-

organismo é feito em capela de fluxo vertical laminar. Todo material de trabalho utilizado como o micro-organismo, assim como, o micro-organismo são descartados após o procedimento de esterilização em autoclave, à temperatura de 121 °C por 20 minutos.

Equipe envolvida: Sérgio Oliveira de Paula (Líder); Luan Prados Calegari; Eduardo de Almeida Marques da Silva; Leandro Licursi de Oliveira; Michelle Dias de Oliveira

Órgão financiador: FAPEMIG

Resultado parcial: Defesa de uma dissertação de mestrado (Luan P. Calegari) e publicação de um artigo (doi: 10.1186/s12951-016-0196-7)

5.1.36. Produção de eCG recombinante bioativo glicosilado

Objetivos: Produzir em escala laboratorial o hormônio eCG recombinante bioativo glicosilado, usando o sistema comercial LEXSY baseado em expressão heteróloga constitutiva de proteínas glicosiladas em *Leishmania tarentolae*.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Organismo receptor: *Leishmania tarentolae*. Organismo parental: *Equus ferus* (cavalo); Construção genética utilizada: gene sintético expressando o hormônio eCG

Nível de contenção: NB-2. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos I.

Medidas de biossegurança adotadas: Em relação ao acesso, a área em regime de contenção será permitida somente a pesquisadores e funcionários diretamente envolvidos no trabalho, os quais serão informados previamente sobre as normas de biossegurança. A manipulação/descarte de material que entraram em contato com o microrganismo transformado será realizada seguindo os mais exigentes padrões de contenção, com recipientes destinados exclusivamente ao descarte destes materiais seguido de autoclavagem e por fim eliminação dos resíduos por incineração. A referida área de trabalho possuirá um livro de registro de informações sobre os experimentos em andamento e haverá uma sinalização na entrada do laboratório indicando a experimentação com OGMs. Todo e qualquer acidente, bem como as informações inerentes aos OGMs serão informados à CIBio da instituição.

Equipe envolvida: Juliana Lopes Rangel Fietto (Líder); Tiago Antonio de Oliveira Mendes; Abelardo Silva Júnior; Gustavo Costa Bressan; Lethícia Kelly Ramos Andrade; Tatiana Aparecida de Oliveira.

Órgão financiador: Ouro Fino Saúde Animal LTDA.

Resultado parcial: tese de Doutorado em desenvolvimento

5.1.37. ESTUDO DO PAPEL BIOLÓGICO DA ATP DIFOSFOHIDROLASE 2 (NTPDase 2) NA VIRULÊNCIA E INFECCIOSIDADE DAS CEPAS ET E NSL DE Leishmania (Viannia) Braziliensis

Objetivos: Leishmanioses são doenças parasitárias que acometem milhões de pessoas no mundo, associadas a pobreza, desnutrição e habitação precária. Apesar de todos os esforços no controle da doença, não existem vacinas eficazes e os tratamentos possuem alto preço e toxicidade. Sabe-se que parasitos do gênero Leishmania possuem uma grande plasticidade fenotípica, sendo capazes de evadir à resposta imune do hospedeiro o que torna complexa a busca por medidas de profilaxia e tratamento. Portanto, o conhecimento dos mecanismos moleculares que determinam a virulência e infecciosidade do parasito é de suma importância para o desenvolvimento racional de drogas e de alternativas de prevenção, diagnóstico e tratamento da doença. Este projeto tem como objetivos avaliar a influência de polimorfismos de base única (SNP%u2019s) na atividade enzimática e função biológica da proteína NTPDase 2, buscando elucidar o papel da enzima nos processos de virulência e infecciosidade das cepas ET e NSL de Leishmania (Viannia) braziliensis.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Organismo receptor: Leishmania (Viannia) braziliensis. Organismo parental: Leishmania (Viannia) braziliensis; Construção genética utilizada: gene sintético contendo polimorfismos de base única (SNP%u2019s) da NTPDase2

Nível de contenção: NB-2. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos I.

Medidas de biossegurança adotadas: Em relação ao acesso, a área em regime de contenção será permitido somente a pesquisadores e funcionários diretamente envolvidos no trabalho, os quais serão informados previamente sobre as normas de biossegurança. A manipulação/descarte de material que entraram em contato com o microrganismo transformado será realizada seguindo os mais exigentes padrões de contenção, com recipientes destinados exclusivamente ao descarte destes materiais seguido de autoclavagem e por fim eliminação dos resíduos por incineração. A referida área de trabalho possuirá um livro de registro de informações sobre os experimentos em andamento e haverá

uma sinalização na entrada do laboratório indicando a experimentação com OGMs. Todo e qualquer acidente, bem como as informações inerentes aos OGMs serão informados à CIBio da instituição.

Equipe envolvida: Juliana Lopes Rangel Fietto (Líder); Nancy da Rocha Torres; João Victor Badaró de Moraes; Victor Hugo Ferraz da Silva; Gustavo Costa Bressan.

Órgão financiador: CAPES

Resultado parcial: tese de Doutorado em desenvolvimento

5.2. Projetos Finalizados

5.2.1. Identificação e Caracterização de Proteínas Envolvidas na Resposta de Plantas a Infecção por Geminivírus

Objetivos: NIK1 (At5g16000), NIK2 (At3g25560) e NIK3 (At1g60800) são receptores transmembranas do tipo serina/treonina cinase de *A. thaliana* que estão inseridos no grupo formado por proteínas de defesa. As proteínas NIKs (NSP-interacting kinase) foram identificadas pela sua capacidade de interagir com a proteina NSP de geminivírus. A proteína viral NSP atua inibindo as atividades de autofosforilação e de fosforilação de substratos exógenos de NIK e, portanto, acredita-se, que interfere nas vias de defesa a patógenos mediadas por esse receptor. Dessa forma, a investigação de propriedades bioquímicas de NIK se faz necessária, como a determinação de seus parâmetros cinéticos, bem como a identificação de sítios adicionais de fosforilação na proteína NIK1, bem como da interação de NIK com seus possíveis substratos e a relevância dessa interação na via de defesa antiviral mediada por NIK com utilização potencial como ferramenta de resistência de plantas a infecção viral.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: O cDNA (gene AT5G16000.1) de NIK1-1(*Arabdopsis thaliana* NSP-Interacting Kinase), sob o controle do promotor 35S e fusionado a proteína GFP (green fluorescent protein) foi clonado no vetor binário de transformação de plantas pK7FWG2.

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (BIOAGRO).

Medidas de biossegurança adotadas: 1. Acesso ao laboratório restrito ao pessoal credenciado junto ao BIOAGRO, controlado pelo pesquisador principal. 2. Todas as manipulações envolvendo PGM são realizadas em câmara de fluxo laminar ou câmara-de-

crescimento predeterminadas para esta finalidade. 3. Toda PGM mantida em casa-de-vegetação tem acesso controlado por meio de chave, e todas as flores são eliminadas na fase de botão (antes da primeira antese) a fim de impedir a disseminação de pólen. Material vegetal com finalidade de multiplicação de sementes é mantido em ambiente de contenção a fim de impedir a liberação de sementes ao meio ambiente. 4. Toda PGM é autoclavada antes do descarte, bem como o solo.

Equipe envolvida: Elizabeth Pacheco Batista Fontes (Líder); Francisco Murilo Zerbini; Wagner Campos Otoni; Francisco J. L. Aragão; Anésia Aparecida dos Santos; Elisa C. S. Carvalho; Daniela Côco.

Órgão financiador: FAPEMIG

Artigos publicados:

Gouveia-Mageste, B.C., Martins, L.G.C., Dal-Bianco, M., Machado, J.P.B., Da Silva, J C.F., Kim, A.Y., Yazaki, J., Dos Santos, A.A., Ecker, J.R., Fontes, E.P.B. A plant-specific syntaxin-6 protein contributes to the intracytoplasmic route for the begomovirus CabLCV. Plant Physiology, 2021. 252, online first, https://doi.org/10.1093/plphys/kiab252.

Fontes, Elizabeth Pacheco Batista; Teixeira, Ruan Maloni; Lozano-Durán, Rosa. Plant virus-interactions: unraveling novel defense mechanisms under immune-suppressing pressure. Current Opinion In Biotechnology, v. 70, p. 108-114, 2021. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.03.007

Melo, B. P.; Lourenço-Tessutti, I. T.; Fraga, O. T.; Pinheiro, L. B.; de Jesus Lins, C. B.; Morgante, C. V.; Engler, J. A.; Reis, P. A. B.; Grossi-de-Sá, M. F.; Fontes, E. P. B. Contrasting roles of GmNAC065 and GmNAC085 in natural senescence, plant development, multiple stresses and cell death responses. Sci. Rep. 2021, 11, 11178, doi:10.1038/s41598-021-90767-6.

Ferreira, Marco Aurélio ; Teixeira, Ruan M. ; Fontes, Elizabeth P. B. . Geminivirus-Host Interactions: Action and Reaction in Receptor-Mediated Antiviral Immunity. Viruses-Basel, v. 13, p. 840, 2021. ; https://doi.org/10.3390/v13050840

Teixeira, Ruan M. ; Ferreira, Marco Aurélio ; Raimundo, Gabriel A. S. ; Fontes, Elizabeth P. B. . Geminiviral Triggers and Suppressors of Plant Antiviral Immunity. Microorganisms, v. 9, p. 775, 2021. https://doi.org/10.3390/microorganisms9040775

Ferreira, D. O.; Fraga, O. T.; Pimenta, M. R.; Caetano, H. D. N.; Machado, J. P. B.; Carpinetti, P. A.; Brustolini, O. J. B.; Quadros, I. P. S.; Reis, P. A. B.; Fontes, E. P. B. GmNAC81 inversely modulates leaf senescence and drought tolerance. Front. Genet. 2020, 11, 601876, doi:10.3389/fgene.2020.601876

Martins, Laura G. C. ; Raimundo, Gabriel A. S. ; Ribeiro, Nathalia G. A. ; Silva, Jose Cleydson F. ; Euclydes, Nívea C. ; Loriato, Virgilio A. P. ; Duarte, Christiane E. M. ; Fontes, Elizabeth P. B. . A Begomovirus Nuclear Shuttle Protein-Interacting Immune Hub: Hijacking Host Transport Activities and Suppressing Incompatible Functions. Frontiers in Plant Science, v. 11, p. 398, 2020. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00398

Loriato, Virgílio A.P. ; Martins, Laura G.C. ; Euclydes, Nívea C. ; Reis, Pedro A.B. ; Duarte, Christiane E.M. ; Fontes, Elizabeth P.B. . Engineering resistance against geminiviruses: A review of suppressed natural defenses and the use of RNAi and the CRISPR/Cas system. Plant Science, v. 292, p. 110410, 2020. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110410

Li, B., Ferreira, M.A., Huang, M. et al. The receptor-like kinase NIK1 targets FLS2/BAK1 immune complex and inversely modulates antiviral and antibacterial immunity. Nat Commun 2019, 10, 4996. https://doi.org/10.1038/s41467-019-12847-6

Teixeira, R. M., Ferreira, M. A., Raimundo, G. A. S., Loriato, V. A. P., Reis, P. A. B., and Fontes, E. P. B.. Virus perception at the cell surface: revisiting the roles of receptor-like kinases as viral pattern recognition receptors. Mol. Plant Pathol. 2019, 20, 1196–1202. doi:10.1111/mpp.12816

de Camargos, L. F.; Fraga, O. T.; Oliveira, C. C.; da Silva, J. C. F.; Fontes, E. P. B.; Reis, P. A. B. Development and cell death domain-containing asparagine-rich protein (DCD/NRP): an essential protein in plant development and stress responses. Theor. Exp. Plant Physiol 2019, 31, 59–70, doi:10.1007/s40626-018-0128-z

Calil, I. P., Quadros, I. P. S., Araújo, T. C., Duarte, C. E. M., Gouveia-Mageste, B. C., Silva, J. C. F., et al. A WW domain-containing protein forms immune nuclear bodies against begomoviruses. Mol. Plant. 2018, 11, 1449–1465. doi:10.1016/j.molp.2018.09.009

Melo, B. P.; Fraga, O. T.; Silva, J. C. F.; Ferreira, D. O.; Brustolini, O. J. B.; Carpinetti, P. A.; Machado, J. P. B.; Reis, P. A. B.; Fontes, E. P. B. Revisiting the soybean GmNAC superfamily. Front. Plant Sci. 2018, 9, 1864, doi:10.3389/fpls.2018.01864

Calil, I. P., and Fontes, E. P. B. Plant immunity against viruses: antiviral immune receptors in focus. Ann. Bot. 2017, 119, 711–723. doi:10.1093/aob/mcw200

Gouveia, B. C., Calil, I. P., Machado, J. P. B., Santos, A. A., and Fontes, E. P. B. Immune receptors and co-receptors in antiviral innate immunity in plants. Front. Microbiol. 2017, 7, 2139. doi:10.3389/fmicb.2016.02139

Machado, J. P. B., Calil, I. P., Santos, A. A., and Fontes, E. P. B. Translational control in plant antiviral immunity. Genet. Mol. Biol. 2017, 40, 292–304. doi:10.1590/1678-4685-gmb-2016-0092

Pimenta, M. R.; Silva, P. A.; Mendes, G. C.; Alves, J. R.; Caetano, H. D. N.; Machado, J. P. B.; Brustolini, O. J. B.; Carpinetti, P. A.; Melo, B. P.; Silva, J. C. F.; Rosado, G. L.; Ferreira, M. F. S.; Dal-Bianco, M.; Picoli, E. A. de T.; Aragao, F. J. L.; Ramos, H. J. O.; Fontes, E. P. B. The Stress-Induced Soybean NAC Transcription Factor GmNAC81 Plays a Positive Role in Developmentally Programmed Leaf Senescence. Plant Cell Physiol. 2016, 57, 1098–1114, doi:10.1093/pcp/pcw059

Reis, P. A. B.; Carpinetti, P. A.; Freitas, P. P. J.; Santos, E. G. D.; Camargos, L. F.; Oliveira, I. H. T.; Silva, J. C. F.; Carvalho, H. H.; Dal-Bianco, M.; Soares-Ramos, J. R. L.; Fontes, E. P. B. Functional and regulatory conservation of the soybean ER stress-induced DCD/NRP-mediated cell death signaling in plants. BMC Plant Biol. 2016, 16, 156, doi:10.1186/s12870-016-0843-z.

Brustolini, OJB, Machado, JBP, Condori-Apfata, JA, Coco, D, Deguch, M, Loriato, VAP, Pereira, WA, Alfenas-Zerbini, P, Zerbini, FM, Inoue-Nagata, AK, Santos, AA, Chory, J, Silva, FF, Fontes, EP.B. Sustained NIK-mediated antiviral signalling confers broad-spectrum tolerance to begomoviruses in cultivated plants. Plant Biotechnology Journal (Print), v. 13, p. 1300-1311, 2015. doi:10.1111/pbi.12349

Machado, J. P. B., Brustolini, O. J. B., Mendes, G. C., Santos, A. A., and Fontes, E. P. B. (2015). NIK1, a host factor specialized in antiviral defense or a novel general regulator of plant immunity? Bioessays. 37, 1236–1242. doi:10.1002/bies.201500066

Silva, PA, Silva, JCF, Caetano, HDN, Machado, JPB, Mendes, GC, Reis, PAB, Brustolini, OJB, Dal-Bianco, M, Fontes EPB. Comprehensive analysis of the endoplasmic reticulum stress response in the soybean genome: conserved and plant-specific features. BMC Genomics, 2015, 16, 783. doi:10.1186/s12864-015-1952-z

Capítulos de livros

Teixeira Fraga, O.; Paes de Melo, B.; Fernando de Camargos, L.; Pellanda Fagundes, D.; Cabral Oliveira, C.; Bassi Simoni, E.; Augusto Braga dos Reis, P.; Pacheco Batista Fontes, E. A Regulatory Circuit Integrating Stress-Induced with Natural Leaf Senescence. In *Plant Science - Structure, Anatomy and Physiology in Plants Cultured in Vivo and in Vitro*; Gonzalez, A., Rodriguez, M., Gören Sağlam, N., Eds.; IntechOpen, 2020.

Brustolini, Otávio J. B. ; Silva, José Cleydson F. ; Sakamoto, Tetsu ; Fontes, Elizabeth P. B. . Bioinformatics Analysis of the Receptor-Like Kinase (RLK) Superfamily. In: Libo Sahn, Ping he. (Org.). Methods in Molecular Biology. 1ed.: Springer New York, 2017, v. 1578, p. 123-132.

Dissertações de mestrado concluídas

Cláudia de Souza Lima Pontes. Comunicação cruzada entre o receptor antiviral NIK1 e imunidade antibacteriana em plantas. 2017. Dissertação (Mestrado em Bioquimica Agricola) - Universidade Federal de Viçosa, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

Larissa Gabriela Morais de Ávila. Reconstituição da via de sinalização antiviral mediada por NIK1 de Arabidopsis em tomateiro. 2017. Dissertação (Mestrado em Genetica e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

Ruan Maloni Teixeira. Panorama transcricional sob controle da proteína LIMYB, um componente da via de defesa antiviral mediada por NIK1. 2017. Dissertação (Mestrado em

Bioquimica Agricola) - Universidade Federal de Viçosa, . Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

Dalton de O. Ferreira. GmNAC081: elemento de convergência para comunicação cruzada entre senescência e tolerância à seca. 2017. Dissertação (Mestrado em Genetica e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Bruno Paes de Melo. The soybean NAC superfamily revisited: characterization of novel members. 2016. Dissertação (Mestrado em Bioquimica Agricola) - Universidade Federal de Viçosa, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

José Cleydson Ferreira da Silva. Data warehouse enriquecido com métodos de aprendizado de máquina para a família Geminiviridae. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência da Computação) - Universidade Federal de Viçosa, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Coorientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

Teses de doutorado concluídas

Virgilio Adriano Pereira Loriato. Mecanismos de resistência contra geminiviruses e o potencial do mutante duplo de NIK1, NIK1-T469A/T474D, em conferir resistência em tomateiros.. 2019. Tese (Doutorado em Genetica e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, . Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

Bianca Castro Gouveia. Begomovirus-host protein-protein interaction network: identifying an intracytoplasmic route for viral DNA intracellular transport. 2019. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

Iara Pinheiro Calil. Characterization Of Transcriptionally Active Atwwp1-Nuclear Bodies That Confer Partial Immunity Against Begomoviruses. 2017. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

João Paulo Batista Machado. Insights into regulatory mechanisms of the NIK-mediated antiviral defense: new components and the molecular bases of the defense. Tese DS (Bioquímica Aplicada). UFV 2015

Priscila Alves da Silva. Vetor de Silenciamento Gênico e Análise Compreensiva da Resposta ao Estresse No Retículo Endoplasmático Em Soja. Tese DS (Genética e Melhoramento). UFV 2015

Maiana Reis Pimenta. Functional Characterization and Regulation of Abiotic Stress-Responsive Genes (GmNAC081 and SbMATE) IN PLANTS. Tese DS (Fisiologia Vegetal). UFV 2015

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

Gabriel Angelo Saraiva Raimundo. 2019. Ácido Salicílio no Tráfego Núcleo-Citoplasmático da Proteína Proviral NIG: Uma Contrapartida Antiviral. Monografia defendida para término de curso de Agronomia. Orientador: Joao Paulo Batista Machado

Igor Hiroshi Terayama de Oliveira. Conservação funcional da via de morte celular mediada por NRPs em plantas. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Bioquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais. Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

Hanna Durso Neves Caetano. Análise funcional do gene GmNAC81 durante o processo de senescência natural. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Bioquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

Valdeir Junio Vaz Moreira. Análise funcional da via de morte celular programada mediada por NAC81/NAC30-VPE durante infecção por Phakopsora pachyrhizi em soja. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Bioquímica) - Universidade Federal de Viçosa. Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

6. Descrição sobre quaisquer acidentes ou agravos à saúde possivelmente relacionados a trabalhos com OGM e seus derivados e medidas de contingenciamento, controle e prevenção.

Não houve relatos de acidentes ou agravos à saúde relacionados a trabalhos com OGM no decorrer do ano de 2021.

7. Descrição sobre atividades de capacitação em biossegurança de OGM e seus derivados.

No ano de 2021, devido a pandemia, não foram oferecidos cursos de capacitação.

8. Descrição das medidas de biossegurança que vêm sendo adotadas e sua possível eficiência para evitar danos.

O acesso aos laboratórios é restrito ao pessoal credenciado controlado pelo pesquisador principal. A área de trabalho possui um livro de registro de informações sobre os experimentos em andamento e há uma sinalização na entrada dos laboratórios indicando a experimentação com OGMs. Todo e qualquer acidente, bem como as informações inerentes aos OGMs são informados à CIBio.

Todo o trabalho com OGM é realizado em laboratórios, devidamente equipados com câmara de fluxo laminar para manuseio de material bacteriano e vegetal ou câmara de crescimento. Todos os procedimentos são realizados com luvas descartáveis. O local de trabalho deve estar sempre limpo e descontaminado. Os reagentes tóxicos utilizados para extração de DNA, como fenol, são descartados separadamente e coletados pela Gerência de Resíduos e Rejeitos Tóxicos da UFV.

A manipulação e/ou descarte de material que entraram em contato com o micro-organismos transformado, incluindo microtubos, ponteiras de micropipetas, vidrarias e placas com meios de cultura são autoclavados antes de serem descartados. Todo OGM é autoclavado antes do descarte.

Em relação ao acesso a casa-de-vegetação, a área em regime de contenção é permitida somente a pesquisadores e funcionários diretamente envolvidos no trabalho com acesso controlado por meio de chave. Todas as flores são eliminadas na fase de botão (antes da primeira antese) a fim de impedir a disseminação de pólen. Todos os envolvidos no trabalho com OGM são informados previamente sobre as normas de biossegurança segundo estabelecidas pela CTNBio.

9. Citar as liberações ambientais na(s) Unidade(s) com os respectivos números dos Processos na CTNBio:

a. Concluídas: Nada consta

b. Em andamento: Nada consta

c. Suspensas: Nada consta

d. Canceladas: Nada consta

10. Relacionar os relatórios de conclusão dos experimentos de liberação planejada de OGM e seus derivados no meio ambiente que obtiveram decisão técnica e parecer favorável da CTNBio.

Nada consta no ano de 2021.

11. Anexar cópia das atas das reuniões realizadas pela CIBio.

No ano de 2021 foi realizada 01 reunião, e a ata consta como anexo 01.

12. Descrever as dificuldades institucionais para o bom funcionamento das atividades da CIBio.

A CIBio/UFV está devidamente alocada junto as comissões de ética animal e humana, e conta com uma secretária e espaço físico para realização de reuniões. Adequações necessárias estão sendo realizadas pela UFV.

13. Relacionar o material importado (OGM e derivados), relacionando a quantidade importada ao projeto de pesquisa. (Nova redação dada pela Resolução Normativa 14 de 05 de fevereiro 2015).

Não houve pedido de importação (OGM e derivados) no ano de 2021.

14. Informar se houve fiscalização por parte dos órgãos e entidades de registro e fiscalização. Caso afirmativo, indicar a data, equipe fiscalizadora e N.º do Termo de Fiscalização e, se houver, o N.º do Auto de Infração.

Nada consta no ano de 2021.

15. Informar demais ocorrências que a CIBio julgar necessário relatar à CTNBio.

Nenhuma discordância as normas vigentes foram observadas em 2021.

16. Informar eventuais alterações na descrição das instalações, anexando a nova planta baixa.

Não houve alterações nas instalações.

17. Informar todas as exportações e transportes no período coberto pelo relatório.

No ano de 2021 houveram duas transferências de Material OGM da Embrapa-Soja em 06/09/21 (formulário transferência TG-OGM 04/21; Células de *A. tumefaciens* linhagem GV3101 ou GV2102 transformadas com plasmídeo modificado, 30 amostras) e 15/10/21 (formulário transferência TG-OGM ??/21; Células de *A. tumefaciens* linhagem GV3101 transformadas com plasmídeo modificado, 15 amostras) para o Laboratório de Biotecnologia Molecular (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFV).

Data: 31/03/2022

Adriano Nunes Nesi
Presidente da CIBio/UFV