



Universidade de Brasília
Departamento de Biologia Celular
Pós Graduação em Biologia Molecular

Expressão recombinante e caracterização molecular e funcional da pró-insulina humana, do hormônio de crescimento humano e do fator IX de coagulação sangüínea em plantas transgênicas de soja [*Glycine max* L. (Merril)].

Tese de Doutorado apresentada à banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular da Universidade Brasília.

Nicolau Brito da Cunha

Orientador: Elíbio Leopoldo Rech Filho, PhD.

Brasília

2012

Dedico este trabalho aos meus pais, Elza e Eduardo.

AGRADECIMENTOS

Maurice Druon escreveu que “... a natureza é avarenta na fabricação dos grandes homens”. Estranhamente, ela foi generosa comigo, pois me deu pais que me ensinaram o valor do trabalho, do estudo e da amizade. Agradeço a eles especialmente por terem me dado afeto, oportunidade de aperfeiçoamento e autonomia. Vocês são as figuras mais importantes na minha trajetória.

Gostaria de agradecer também à minha amada esposa Bárbara, que deveria ser indicada ao Nobel da Paz por me agüentar tanto tempo. Seu amor e carinho são absolutamente essenciais na minha vida.

Agradeço ao meu avô, Antônio Brito da Cunha, um grande amigo e uma referência afetiva e intelectual formidável. Um homem notável, cuja trajetória é minha maior fonte de inspiração. Também sou muito grato aos meus avôs já falecidos; Erna, Ettore e Lygia, referências de uma infância e juventude muito felizes.

Meus irmãos, Eduardo e Lorena – figuras muito importantes - também merecem todo o reconhecimento pela amizade e paciência que tiveram comigo por todos esses anos.

Agradeço aos meus sogros: Uyara e José Glauco, e às minhas cunhadas, Camila e Eduarda, por serem carinhosos incentivadores e amigos generosos. Seu apoio tem um valor enorme para mim.

Agradeço, especialmente, ao meu orientador - Dr. Elíbio Leopoldo Rech Filho - um cientista brilhante e grande amigo. Sua orientação transcendeu o ambiente de laboratório e atingiu aspectos muito abrangentes da minha atuação profissional.

Gostaria de agradecer também aos meus grandes amigos Giovanni, Júlio e Cristiano, figuras fundamentais para o meu aperfeiçoamento profissional e ótimas companhias para conversar e refletir sobre ciência e outros temas diversos. Também devo agradecer e mencionar os valiosos amigos Francisco Aragão, Elsa Nogueira, Ana Cláudia Guerra e Maria Laine Tinoco, pessoas brilhantes e que foram importantes durante o desenrolar dos experimentos.

Muito obrigado aos amigos Luis, Pedro e Ana Cristina, que me ajudaram enormemente nos experimentos de transformação genética, cultivo de plantas transgênicas e imunocitoquímica. Sem vocês três provavelmente nada do que está relatado aqui teria sido realizado.

Também devo agradecer aos membros que aceitaram participar das bancas de qualificação e de defesa, especialmente os que ainda não foram mencionados: os

doutores Luciano Paulino e Thales Rocha Lima (grandes amigos), e o Dr. Marcelo Brígido.

Agradeço a todos os amigos, antigos e novos, que fiz nos Laboratórios de Transferência de Genes I e II (LTGI e II) e no Laboratório de Apomixia, especialmente os amigos: Emanuel, Sharon, Gustavo, Wel, Andréa Rachel, Paula, Luísa, Larissa, Ana, André Melro, Thaís e muitos outros. Tive a sorte de ter tantos bons amigos durante os anos no Cenargen que não posso citá-los nominalmente num espaço tão pequeno, mas certamente me lembro de cada um de vocês com admiração e carinho.

Agradeço à Embrapa e ao CNPQ por custearem meus estudos durante o doutorado no Cenargen.

Gostaria também de agradecer a quatro grandes professores e amigos que eu tive na Universidade de Brasília e no Cenargen: os doutores Jean Kleber e Wenceslau Goedert, e Carlos Bloch e Luiz A.B.C.

Agradeço aos meus grandes amigos de longa data, pessoas muito importantes e cuja companhia vem de tempos ainda mais remotos ao meu ingresso no LTG II: Waldir, Thiago, Felipe, Mário, Gabriel, Paulinho, João Bernardo, Leonardo, Mariana, Débora, Ester e Kátia.

“As idéias são, na realidade, força. É preciso muitíssima história para forjar uma pequena tradição”.

**Henry James
(1843 – 1916)**

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1: Seqüência do promotor tecido-específico da γ -kafirina de sorgo. As caixas coloridas indicam os sítios de ancoramento dos elementos genéticos envolvidos com o início da atividade transcricional relacionada ao promotor.

Figura 2: Seqüência do promotor tecido-específico da subunidade α ' da β -conglucina de soja. As caixas coloridas indicam os sítios de ancoramento dos elementos genéticos envolvidos com o início da atividade transcricional relacionada ao promotor.

Figura 3: **(A)** Cultivo de eixos embrionários de soja em meio com o herbicida Imazapyr[®] (Arsenal) (500 nM), uma semana após o bombardeamento com os plasmídeos p β cong3hGH (4.732 pb) e pAC 321[®] de 8.672 pb (Cyanamid). **(B)** Plântulas transgênicas de soja contendo o gene *hgh*, dez dias após a germinação. **(C)** Plantas transgênicas adultas após quatro meses de cultivo sob fotoperíodo de 24 hs de iluminação diária.

Capítulo 2

Figura 1: Representação esquemática da construção do plasmídeo pRT-GK-PSC-PIh (4.528 pb).

Figura 2: Representação esquemática dos *cassetes* de expressão do plasmídeo pRT-GK-PSC-PIh e do fragmento *ahas* utilizados nos experimentos de bombardeamento de embriões de soja. A seqüência codificadora da pró-insulina fusionada ao peptídeo-sinal da α -coixina está sob controle do promotor da γ -kafirina e da região 3' do terminador CaMV. A expressão do gene *ahas* é modulada pelo promotor e pelo terminador *ahas* de *Arabidopsis thaliana*.

Figura 3: Reação de PCR demonstrando a amplificação de fragmentos internos do gene da pró-insulina humana (aproximadamente 701 pb) em sementes R₁ de soja. As linhas 1 e 2 correspondem a sementes transgênicas das linhagens 194 e 195 respectivamente; a linha 3 a uma semente não-transgênica; a linha 4 ao controle interno com água e ausência de DNA genômico, e a linha 5 ao plasmídeo pRT-GK-PSC-PIh.

Figura 4: Western blot de sementes de soja R₁ demonstrando a expressão da pró-insulina recombinante. A linha 1 corresponde a 40 ng da proteína recombinante purificada de *Escherichia coli*; as linhas 2, 3 e 4 correspondem, respectivamente, a extratos protéicos totais (100 μ g) de sementes das linhagens 194, 195 e de uma semente não-transgênica. Todos os pesos moleculares foram estimados utilizando o marcador de peso molecular Low Range[®] (Sigma, USA).

Figura 5: Secções cotiledonares ultrafinas de sementes de soja demonstrando o acúmulo subcelular da pró-insulina recombinante em sementes transgênicas R1 de soja. PSV = “Protein storage vacuoles” –vacúolos de estocagem de proteínas; OB =”Oil bodies” – corpos de óleo. As imagens A e B correspondem a sementes transgênicas da linhagem 194; C a uma semente da linhagem 195 e D a uma semente não-transgênica.

Capítulo 3

Figura 1: Representação esquemática da construção do plasmídeo p β cong3hGH (4.732 pb).

Figura 2: Representação esquemática dos cassetes de expressão dos plasmídeos p β cong3hGH e pAC 321 utilizados nos experimentos de transformação genética de embriões de soja via biobalística. O gene do hGH (*hgh*) foi fusionado ao peptídeo-sinal da α -coixina (SP) sob o controle do promotor e do terminador da subunidade α da β -conglucina. O cassette de expressão do pAC 321 contém o gene marcador de seleção *ahas* de *A. thaliana* sob o controle promotor e do terminador *ahas*.

Figura 3: (A) Análise da integração do gene *hgh* no genoma de plântulas transgênicas regeneradas por PCR. As linhas 1 a 5 mostram resultados da amplificação de preparações de DNA de folhas de 5 linhagens transgênicas de soja demonstrando a presença do fragmento de 308 pb correspondente a uma região interna do gene *hgh*. As linhas 6 e 7 correspondem respectivamente aos controle negativos: uma amostra contendo o DNA de uma semente não-transgênica e outra contendo água ao invés de DNA. A linha 8 corresponde à amplificação de um segmento interno de 308 pb do gene *hgh*, presente no plasmídeo p β cong3hGH (100 ng) utilizado como controle positivo. O marcador de peso molecular a 1-kb DNA ladder (Invitrogen, USA) foi utilizado para estimar o perfil de migração eletroforética de todas as amostras (linha 9). **(B)** Análise de *Southern blot* de plantas transgênicas R₁ demonstrando múltiplas cópias do gene *hgh* inseridas no genoma de todas as linhagens analisadas. As linhas 1 a 3 mostram amostras de DNA genômico de plantas provenientes das linhagens 3, 9 e 19 que foram submetidos à hibridização específica com uma sonda interna homóloga ao gene *hgh*. A linha 4 mostra que não houve hibridização da sonda com o DNA genômico de uma planta não-transgênica. Na linha 5 pode-se notar uma banda correspondente à hibridização da sonda com o plasmídeo p β cong3hGH (4,7-kb) (100 pg), indicando que a sonda reconhece especificamente um segmento interno do gene *hgh*. Os pesos moleculares foram estimados usando o marcador de peso molecular 1-kb DNA ladder (Invitrogen, USA). **(C)** Análise de RT-PCR de sementes R₂ imaturas das linhagens 3, 9 e 19 demonstrando a expressão do gene *hgh* ao nível transcricional. As linhas de 1 a 3 mostram a amplificação de cDNAs referentes aos transcritos primários do gene de interesse em amostras de cDNA de sementes das respectivas linhagens. As linhas 4 e 5 correspondem aos controles negativos respectivamente com cDNAs de uma semente não-transgênica e água ao invés de DNA *template*. A linha 6 mostra a reação de amplificação de um segmento interno do cassette de expressão (308 pb) presente no plasmídeo

p β cong3hGH. Os pesos moleculares foram estimados usando o marcador de peso molecular 1-kb DNA ladder (Invitrogen, USA).

Figura 4: **(A)** O acúmulo do hGH recombinante em sementes transgênicas de soja foi avaliado por western blot. As linhas 1 a 3 correspondem à análise de extratos protéicos totais (100 μ g) de sementes R₁ das linhagens 3, 9 e 19, e demonstram o reconhecimento do hormônio recombinante por moléculas de anticorpos primários anti-hGH. A linha 4 corresponde à reação do extrato de semente não-transgênica, onde não foi possível detectar a presença do hGH. A linha 5 mostra o aparecimento de uma banda de aproximadamente 22 kDa associada à presença do hGH recombinante purificado de *E. coli*, que foi utilizado como controle positivo para demonstrar a especificidade do anticorpo primário e como referência do padrão de migração eletroforética das proteínas recombinantes de sementes sob condições desnaturantes. As massas moleculares das amostras e do controle foram estimadas utilizando o marcador de massa molecular Precision Plus Protein Standards All Blue™ (Bio-Rad, USA). **(B)** A eficiência do promotor da subunidade α' da β -conglucina em restringir a expressão do transgene nas sementes foi avaliada por análise órgão-específica de western blot. Na linha 1, aproximadamente 100 ng de hGH recombinante purificados de *E. coli* foram detectados pelo anticorpo primário. As linhas 2 a 6 mostram a análise de PSTs (100 μ g) respectivamente de sementes folhas, flores, caules e raízes de uma planta transgênica da linhagem 19. A presença do hGH recombinante foi detectada apenas nas sementes. As massas moleculares das amostras e do controle foram estimadas utilizando o marcador de massa molecular Precision Plus Protein Standards All Blue™ (Bio-Rad, USA). **(C)** a) A cinética de expressão do hGH em diferentes estágios fenológicos de sementes R₁ (linhagem 19) foi determinada a partir de 2, 4, 6 e 8 semanas após a polinização das flores. b) As análises de western blot mostraram o acúmulo do hGH em cada estágio de desenvolvimento fisiológico das sementes. c) A eletroforese em gel de poliacrilamida com sódio-dodecil-sulfato (SDS-PAGE) dos extratos protéicos (~100 μ g) demonstrou a aplicação homogênea das amostras a fim de permitir a análise comparativa blots correspondentes.

Figura 5: Avaliação por imunocitoquímica do endereçamento subcelular do hGH para os PSVs de sementes R₁ transgênicas. O acúmulo do hormônio foi detectado principalmente nos PSVs de diferentes sementes das linhagens 9 e 19, conforme mostrado respectivamente em **(A)** e **(B)**. Houve acúmulo pontual do hGH na parede celular - cell wall (CW) – em semente da linhagem 19 **(C)**. A presença da proteína recombinante não foi detectada em sementes não-transgênicas ou associada claramente aos corpos de óleo – oil bodies (OB) **(D)**.

Figura 6. (A) Esquema analítico da seqüência completa do hGH expresso em soja. As barras pretas correspondem aos sítios de digestão da enzima tripsina. Os trechos em cinza-claro indicam as seqüências de peptídeos confirmadas por espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS). Os trechos cinza-escuro indicam as seqüências peptídicas com a modificação do tipo carbamidometila+C. Os números acima dos trechos identificados mostram as massas monoisotópicas dos peptídeos correspondentes. **(B)** Espectro de ionização do peptídeo marcado em (A), com as respectivas séries b e y, indicando as massas seqüenciais dos aminoácidos cobertos no fragmento.

Figura 7: Curvas de proliferação de células BaF/B03-B2B2 expressando o receptor selvagem hGHR em função da dosagem de hGH presente no meio de cultura. Os hormônios presentes em sementes R₁ das linhagens transgênicas 3, 9 e 19 apresentaram diferentes níveis de indução de atividade somatogênica em células pró-B murinas. Não houve atividade significativa quando testadas as amostras de sementes não-transgênicas, bem como a linhagem de soja transgênica 3.

Capítulo 4

Figura 1: Representação esquemática da construção do vetor de expressão pβcong3FIX (5.440 pb).

Figura 2: Representação esquemática dos *cassetes* de expressão dos plasmídeos pβcong3hFIX e pAC 321 utilizados nos experimentos de transformação genética de embriões de soja via biobalística. O gene do FIX (*fix*) foi fusionado ao peptídeo-sinal da α-coixina (SP) sob o controle do promotor e do terminador da subunidade α da β-conglicina. O *cassete* de expressão do pAC 321 contém o gene marcador de seleção *ahas* de *A. thaliana* sob o controle do promotor e o do terminador *ahas*.

Figura 3: Identificação de 11 linhagens transgênicas por PCR demonstrando a amplificação de um segmento interno do gene *fix* de 495 pb. As linhas de 1 a 11 indicam as linhagens transgênicas obtidas. As linhas 12 e 13 correspondem aos controles negativos, respectivamente com o DNA genômico de uma planta não-transgênica e com água. A linha 14 corresponde a uma reação com plasmídeo pβcong3FIX.

Figura 4: (A) Análise de *Southern blot* de plantas transgênicas R₁. As linhas 1 e 2 correspondem a plantas transgênicas das linhagens 1 e 7; C- a uma planta não-transgênica e C+ ao plasmídeo pβcong3FIX (100 pg). (B) Resultado de RT-PCR de sementes imaturas R₂ das linhagens transgênicas 1 e 7 (representadas respectivamente nas linhas 1 e 2). A linha 3 corresponde a uma semente não-transgênica; a linha 4 a uma amostra sem DNA *template* e a linha 5 a uma reação com o plasmídeo pβcong3FIX. O marcador de peso molecular a 1-kb DNA ladder (Invitrogen, USA) foi utilizado para estimar o perfil de migração eletroforética de todas as amostras.

Figura 5: (A) Análise de western blot de sementes transgênicas expressando o FIX recombinante. O reconhecimento imunológico dos extratos protéicos totais (100 µg) de sementes R₁ das linhagens 1 e 7 é mostrado nas linhas 1 e 2. A linha 3 corresponde a uma amostra de semente não-transgênica e a linha 4 a 40 ng de FIX comercial (Sigma, USA). (B) Western blot demonstrando a expressão tecido-específica do FIX nas sementes da linhagem 1. A linha 1 representa a detecção de 40 ng de FIX comercial (controle positivo). As linhas 2, 3, 4, 5 e 6 mostram a análise de 100 µg TSP respectivamente de sementes, flores, folhas, caules e raízes. (C) Experimento de western blot mostrando o acúmulo da proteína recombinante em diferentes estágios de maturação das sementes: (1) sementes colhidas com 2, 4, 6 e 8 semanas após a polinização; (2) o acúmulo de FIX em cada estágio de desenvolvimento fisiológico; (3) controles de carregamento de gel SDS-PAGE com ~80 µg de cada extrato protéico. As massas moleculares das amostras e do controle foram estimadas utilizando o marcador de massa molecular Precision Plus Protein Standards All Blue™ (Bio-Rad, USA).

Figura 6: Avaliação do endereçamento subcelular do FIX recombinante em secções ultrafinas de cotilédones de soja. (A) Acúmulo subcelular do FIX recombinante nos PSVs de semente transgênica da linhagem 1. (B) Imunocitoquímica de semente não-transgênica. OB = oil bodies.

Figura 7: Quantificação do FIX recombinante presente nas sementes transgênicas linhagens 1 e 7.

Figura 8. (A) Esquema analítico da seqüência completa do FIX expresso em soja. As barras pretas correspondem aos sítios de digestão da enzima tripsina. Os trechos em cinza-claro indicam as seqüências de peptídeos confirmadas por espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS). Os trechos cinza-escuros indicam as seqüências peptídicas com a modificação do tipo carbamidometila+C. Os números acima dos trechos identificados mostram as massas monoisotópicas dos peptídeos correspondentes. (B) Espectro de ionização do peptídeo marcado em (A), com as respectivas séries b e y, indicando as massas seqüenciais dos aminoácidos cobertos no fragmento.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1: Comparação entre os diferentes sistemas de produção de proteínas recombinantes de interesse farmacêutico.

Tabela 2: Importantes proteínas farmacêuticas produzidas em plantas transgênicas.

Tabela 3: Fármacos produzidos em plantas transgênicas aprovados para comercialização.

Tabela 4: Plantas utilizadas como veículos de expressão de biofármacos.

Tabela 5: Propriedades agronômicas de diferentes vegetais produtores de sementes com potencial para funcionarem como plataformas de produção de proteínas recombinantes.

Capítulo 4

Tabela 1: Atividade coagulante do FIX expresso nas sementes transgênicas.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm: Micrometro

µmoles; Micromoles

µg: Micrograma

µL: Microlitro

µM: Micromolar

A. thaliana: *Arabidopsis thaliana*

A. tumefaciens: *Agrobacterium tumefaciens*

Arg 32: Arginina 32

Arg 65: Arginina 65

BAP: 6-Benzilaminopurina

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

C. jobi: *Coix Lacyima jobi*

CaMV: *Cauliflower mosaic virus*

CBMEG: Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética

cDNA: DNA complementar

Cenargem: Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia

Ci/mol: Curie por mol

CNA: Confederação Nacional da Agricultura

CNPSO: Centro Nacional de Pesquisa de Soja

CO: Corpo de Óleo

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento

CP: Corpo Protéico

CTAB: (brometo de cetil-trimetil-amônio)

C-terminal: Carboxi terminal

cv: Cultivar

dm³: Decímetro cúbico

DNA: Ácido desoxirribonucléico

dNTP: Desoxinucleotídeos 5'-trifosfato

E. coli: *Escherichia coli*

Embrapa: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EPSPS: 5-enol-piruvil-shiquimato-3-fosfato sintase

EPAMIG; Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais

ETEC: enterotoxigenic *E. coli*

FDA: *Food and Drug Administration*

FIX: Fator IX de coagulação sangüínea
FVII: Fator VII de coagulação sangüínea
FVIII: Fator VIII de coagulação sangüínea
FX: Fator X de coagulação sangüínea
FXI: Fator XI de coagulação sangüínea
FXIII: Fator XIII de coagulação sangüínea
GenBank: *NIH genetic sequence database*
Gly₄: *Glycine 4*
GUS: Glucuronidase
ha: Hectare
HBV: *Hepatitis B virus*
HCl: Ácido clorídrico
HCMV: *Human cytomegalovirus*
hGH: *human growth hormone*
HMGR2: hidroxí-3-metilglutaril-Coa-redutase de tomate
Kb: Kilobases
KCl: Cloreto de potássio
kDa: Kilodalton
Kg: Kilograma
KH₂PO₄: Dihidrogenofosfato de potássio
LT-B: subunidade B da toxina termolábil
LTG: Laboratório de Transferência de Genes
M: Molar
Ma: miliampere
mg/L: miligrama por litro
Mg: Miligrama
MgCl₂: Cloreto de magnésio
mM: Milimolar
MP: Membrana Plasmática
mRNA: RNA mensageiro
MS: Murashige & Skoog
Na₂HPO₄: Fosfato de sódio dibásico
NaCl: Cloreto de sódio
NBT: *Nitro blue tetrazolium*
ND: Não Determinado
ng/μL: Nanograma por microlitro
ng: Nanograma

N-terminal: Amino terminal
°C: Graus Celsius
Pb: Pares de bases
PC: Parede Celular
PCR: Reação em cadeia da polimerase
PDB: *Protein Data Bank*
pH: Potencial hidrogeniônico
PIB: Produto Interno Bruto
PST: Proteínas Solúveis Totais
PSTF: Proteínas Solúveis Totais de Folhas
RE: Retículo Endoplasmático
RER: Retículo Endoplasmático Rugoso
RNA: Ácido ribonucléico
scFv: *single-chain fragment variable*
Ser₁: *Serine 1*
sp.: *specie*
TBSV: *Tomato bushy stunt virus*
T-DNA: DNA de transferência
U: Unidade enzimática
UCB: Universidade Católica de Brasília
UnB: Universidade de Brasília
Unicamp: Universidade Estadual de Campinas
US\$: Dólar
UV: Ultra Violeta
V: Volts

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	1
Capítulo 1.....	3
1) INTRODUÇÃO GERAL.....	3
1.1) A planta de soja.....	3
1.2) A composição nutricional do grão.....	3
1.3) A importância econômica da cultura da soja.....	4
1.4) Melhoramento genético.....	5
1.5) A transformação genética de plantas superiores.....	6
1.6) A transformação genética de plantas de soja.....	8
1.7) A expressão de fármacos recombinantes em plantas - “Molecular Farming”.....	11
1.8) Expressão de biofármacos recombinantes nas sementes de plantas transgênicas.....	20
1.9) O promotor tecido-específico da γ -kafirina de sorgo.....	26
1.10) O promotor tecido-específico e o peptídeo sinal da β -conglucina de soja.....	27
1.11) Sementes de soja como reatores de fármacos recombinantes.....	29
1.12) ‘Protein targeting’: o endereçamento subcelular de moléculas para os vacúolos de estocagem de proteínas.....	32
1.13) O peptídeo-sinal de α -coixina.....	33
2) HIPÓTESE.....	35
3) JUSTIFICATIVAS.....	35
4) OBJETIVOS.....	36
4.1) Objetivo geral.....	36
4.2) Objetivos específicos.....	36
Capítulo 2.....	37
O endereçamento subcelular da pró-insulina humana para os vacúolos de estocagem de proteínas de sementes de soja.....	37
1) INTRODUÇÃO.....	37
2) MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
2.1) Construção do vetor pRT-GK-PSC-PIh e obtenção do fragmento contendo o gene <i>ahas</i>	40
2.2) Transformação de soja.....	42
2.3) Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	43
2.4) Extração de proteínas solúveis totais e análise por western blot.....	44
2.5) Análises de imunocitoquímica.....	44
3) RESULTADOS.....	45
4) DISCUSSÃO.....	48
Capítulo 3.....	50
Expressão recombinante do hormônio do crescimento humano (hGH) funcional em sementes transgênicas de soja.....	50
1) INTRODUÇÃO.....	50
2) MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
2.1) Construção do vetor plasmidial de expressão em sementes p β cong3hGH.....	53
2.2) Transformação genética de soja.....	55
2.3) Extração de DNA e reação em cadeia da DNA Polimerase (PCR).....	55
2.4) Análise de plantas por <i>Southern blot</i>	56
2.5) Análise por RT-PCR.....	56
2.6) Análises por western blot.....	56

2.7) Análises de imunocitoquímica.	57
2.8) Quantificação do hGH recombinante e determinação de sua atividade biológica.	57
2.9) Preparo de amostras para análise por espectrometria de massa.	58
2.10) Análise de amostras protéicas por NanoLC-MS ^E	59
2.11) Análise de dados e identificação de proteínas.....	60
3) RESULTADOS	61
3.1) Obtenção e caracterização molecular das linhagens transgênicas e da expressão a nível transcricional do gene <i>hgh</i> nas sementes.	61
3.2) Caracterização da expressão do gene <i>hgh</i> a nível traducional nas linhagens transgênicas	63
3.3) Identificação subcelular do hGH em sementes de soja transgênicas.	65
3.4) Identificação de peptídeos trípticos do hGH por espectrometria de massa....	67
3.5) Quantificação e avaliação funcional do hGH recombinante.	68
4) DISCUSSÃO.....	69
Capítulo 4.....	73
Acúmulo do fator de coagulação IX (FIX) funcional em sementes transgênicas de soja	73
1) INTRODUÇÃO	73
2) MATERIAIS E MÉTODOS	76
2.1) Amplificação do cDNA do FIX e construção do vetor pβcong3FIX.	76
2.2) Transformação genética de soja.	78
2.3) Extração de DNA e reação em cadeia da DNA Polimerase (PCR).	78
2.4) Análise de plantas por <i>Southern blot</i>	79
2.5) Análise por RT-PCR.	79
2.6) Obtenção de extratos protéicos totais de sementes transgênicas de soja.	79
2.7) Análises por western blot.	80
2.8) Quantificação do FIX humano nas sementes de soja.	80
2.9) Análises de imunocitoquímica.	80
2.10) Preparo de amostras e análise por NanoLC-MS ^E	81
2.11) Análise de dados e identificação de proteínas.....	81
2.12) Avaliação funcional do FIX por ensaio de coagulação <i>in vitro</i>	81
3) RESULTADOS	82
3.1) Caracterização molecular das linhagens transgênicas obtidas e análise da expressão transcricional do gene <i>fix</i>	82
3.2) Expressão e localização do FIX recombinante em sementes transgênicas.	83
3.3) Quantificação do FIX nas sementes transgênicas de soja.	86
3.4) Resultados de NanoLC-MS ^E	86
3.5) Avaliação da atividade biológica do FIX acumulado nas sementes de soja. ..	88
4) DISCUSSÃO.....	89
5) CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	92
5) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
PUBLICAÇÕES	114

RESUMO

Palavras chave: Soja transgênica. Transformação genética. Proteínas recombinantes. Biorreatores vegetais. Pró-insulina humana. Hormônio de crescimento humano. Fator de coagulação sangüínea.

As plantas superiores apresentam diversas vantagens para a produção de biomoléculas recombinantes quando comparadas com os demais sistemas de expressão heteróloga, incluindo baixo risco de contaminação com oncogenes, príons, vírus e outros patógenos humanos, além de alta capacidade de escalonamento, baixos custos de produção e sistemas de cultivo e produção agrônômica em larga escala. Plantas transgênicas também permitem a exploração de diversos órgãos vegetais com alto conteúdo protéico, tais como sementes e tubérculos, para a expressão de diferentes proteínas recombinantes. Dentre os vegetais comumente cultivados, as plantas de soja são excelentes acumuladoras naturais de proteínas e se constituem em uma fonte de biomassa abundante e barata. Sob condições controladas de cultivo em casa de vegetação, o ciclo agrônômico de plantas de soja pode ser manipulado para maximizar a produção de sementes em larga escala em áreas relativamente pequenas. No presente trabalho foram obtidas diferentes linhagens transgênicas de soja contendo os genes da pró-insulina humana, do hormônio do crescimento humano e do fator IX de coagulação sangüínea, sob o controle de seqüências regulatórias específicas para o direcionamento do acúmulo para os vacúolos das sementes. As linhagens obtidas foram caracterizadas do ponto de vista molecular e a expressão recombinante foi caracterizada nos níveis transcricional e traducional. Sementes contendo o hGH e o FIX apresentaram níveis de acúmulo da ordem de 2,9 e 0,23% PST respectivamente, o que reflete um potencial de produção de até 9 e 0,8 g de proteína recombinante por Kg de sementes. O seqüenciamento N-terminal de frações das duas proteínas por nanoLC-MS^E demonstrou que os peptídeos trípticos de ambas apresentaram as seqüências de aminoácidos e as massas moleculares esperadas. Ensaio de função biológica com o hGH e o FIX demonstraram diferentes níveis de atividade detectável e que o acúmulo dessas proteínas nos PSVs, mesmo por um período de tempo prolongado (até sete anos), é uma alternativa interessante para garantir a estabilidade protéica pós-traducional. Essa estratégia molecular de expressão pode constituir uma alternativa interessante para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos mais baratos e eficientes para sua utilização como reagentes terapêuticos e diagnósticos.

ABSTRACT

Key words: Transgenic soybean. Recombinant proteins. Vegetable bioreactors. Human proinsulin. Human growth hormone (hGH). Human coagulation factor IX (FIX).

Plants present various advantages for the production of biomolecules, including low risk of contamination with prions, viruses and other pathogens, scalability, low production costs, and available agronomical systems. Plants are also versatile vehicles for the production of recombinant molecules because they allow protein expression in various organs, such as tubers and seeds, which naturally accumulate large amounts of protein. Among crop plants, soybean is an excellent protein producer. Soybean plants are also a good source of abundant and cheap biomass and can be cultivated under controlled greenhouse conditions. Under containment, the plant cycle can be manipulated and the final seed yield can be maximized for large-scale protein production within a small and controlled area. In this study we obtained different transgenic soybean lines containing the genes that codify the human proinsulin, the human growth hormone (hGH) and the human coagulation factor IX (FIX), under control of tissue-specific regulatory sequences that target the expression to the PSVs.

The transgenic lines were characterized on the transcriptional and translational levels, and the recombinant expression of the hGH and the FIX reached 2.9 and 0.23% TSP respectively, which indicate a potential to produce up to 9 and 0.8 g of recombinant protein/Kg seeds. The N-terminal sequencing with nanoLC-MS^E demonstrated that all the tryptic fragments analyzed showed the expected sequences and the molecular masses. The biological activities of the recombinant hGH and the FIX were also determined, and demonstrated that targeting to the PSVs was an interesting expression tool to elevate the post-translational stability. This strategy for the improved molecular expression can constitute an important alternative for the development of cheaper and safer biotechnological products that can be used as therapeutic tools and diagnose reagents in the future.

Capítulo 1

1) INTRODUÇÃO GERAL

1.1) A planta de soja.

A soja [*Glycine max* L. (Merril)] é uma leguminosa herbácea diplóide ($2n = 40$) (Vernetti, 1983), essencialmente autógama, com flores perfeitas e cujos órgãos masculino e feminino são protegidos pela corola, o que minimiza a possibilidade de ocorrência de polinização cruzada entre flores de plantas distintas (Kar & Sen, 1991). Exatamente por esse motivo, o fluxo gênico entre diferentes plantas de soja é bastante restrito, e a ocorrência de polinização cruzada, realizada por insetos — principalmente abelhas, é inferior a 1% (Abud et al., 2007; Cunha, 2008).

O centro de origem primário e o de domesticação da planta são respectivamente as regiões centro-sul e extremo nordeste da China (conhecida como Manchúria), locais onde se encontram as únicas populações naturais de ancestrais silvestres capazes de cruzar com a soja (Xu et al., 1989).

A planta de soja é capaz de associar seu sistema radicular com bactérias do solo (*Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp.) fixadoras de nitrogênio atmosférico, o qual é utilizado para a biossíntese de moléculas aminadas, como bases nitrogenadas, aminoácidos e co-enzimas. Essa propriedade resulta num sensível decréscimo no custo de produção da lavoura, uma vez que elimina a necessidade de utilização de fertilizantes nitrogenados durante o cultivo da soja. (Castro et al., 1993; Cunha, 2008).

Outra característica importante dessa leguminosa é a sua sensibilidade ao fotoperíodo, que pode ser expandido para prolongar o ciclo vegetativo da planta. Períodos superiores há 20 horas diárias de luz incidente resultam em aumento de emissão de ramos, folhas e, conseqüentemente, de vagens. Dessa maneira, o rendimento agrônômico - produção de sementes por planta - pode ser aumentado consideravelmente (até 10 vezes) sob condições controladas em casa de vegetação (Kantolic & Slafer, 2007; Cunha, 2008; Cunha et al., 2011a; Cunha et al., 2011b; Cunha et al., 2011c; Vianna et al., 2011a; Vianna et al., 2011b).

1.2) A composição nutricional do grão.

A composição nutricional da semente de soja corresponde a 38% de proteínas, 19% de lipídios, 23% de carboidratos e 15% de fibras alimentares (Centro Nacional de Pesquisa de Soja - CNPSo, 2011 - www.cnpso.embrapa.br).

A soja é caracterizada como uma acumuladora natural de proteínas de reserva utilizadas para a nutrição do embrião ainda no estágio de plântula, durante a fase de germinação. Em função do alto conteúdo protéico estocado na semente, esse grão constitui uma das mais importantes fontes de nutrientes para a população da Ásia, estimada em 3.8 bilhões de pessoas (56% da população mundial), e é largamente empregado no arraçamento de bovinos, suínos e aves no Brasil.

Além de importante fonte protéica, a soja é classificada agronomicamente como uma oleaginosa, status compartilhado com outras plantas cultivadas de destacada importância econômica, como o milho, a colza e o girassol. O óleo extraído das sementes de soja contém um perfil lipídico composto principalmente de ácido palmítico 16:0 (13%), ácido esteárico 18:0 (4%), ácido oléico 18:1(Δ^9) (18%), ácido linoléico 18:2($\Delta^{9,12}$) (55%) e ácido linolênico 18:3($\Delta^{9,12,15}$) (10%). A alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados (linoléico e linolênico) no óleo de soja é uma característica desejável não apenas para o consumo humano, mas também para o cozimento eficiente de alimentos e para o seu emprego em larga escala na indústria alimentícia (Graef et al., 2009).

1.3) A importância econômica da cultura da soja.

Com base em dados do último levantamento anual completo do IBGE (Instituto Brasileiro de geografia e Estatística), o agronegócio brasileiro movimentou mais de 180 bilhões de reais, valor correspondente a aproximadamente 5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional. O complexo-soja (grão, farelo e óleo) é o segmento mais importante do setor e um dos principais componentes estabilizadores da balança comercial do país (CNA, 2008 - <http://www.cna.org.br/cna/index.wsp>).

Apenas no último ano, a área cultivada com o grão no Brasil atingiu 24,18 milhões de hectares — 2,0% maior que no ano anterior — e a produtividade média do grão alcançou 3,1 kg/ha cultivado (CONAB, 2011 - http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/estudo_safra.pdf).

Em função da grande versatilidade de utilização do grão, a demanda mundial da soja e de seus derivados industriais supera 180 milhões de toneladas/ano, o que justifica sua posição como uma das principais *commodities* mundiais. Por essa razão, o preço de comercialização do grão é determinado pela negociação nas principais bolsas internacionais de mercadorias antes mesmo do plantio da safra de sucessão (Cunha, 2008).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, com 75,3 milhões de toneladas produzidas na safra 2010/2011, o que representa cerca de 30% da produção mundial.

A partir da primeira metade da década de 1990, o país se tornou o líder nas exportações mundiais do grão. Apenas na última safra, foram exportadas 41,45 milhões de toneladas, o que gerou divisas da ordem de US\$ 15,7 bilhões para o país, quantia que reflete claramente a competitividade do produto brasileiro no mercado internacional (CNA, 2011; Cunha, 2008)

1.4) Melhoramento genético.

Um fenômeno bastante particular foi experimentado pelo Brasil nas últimas três décadas: a expansão significativa de suas fronteiras agrícolas. Uma das principais causas desse aumento foi a obtenção de uma ampla gama de cultivares de soja adaptadas às baixas latitudes e a condições edafo-climáticas das mais diversas regiões do país, o que possibilitou o cultivo extensivo da planta, especialmente na região Centro-Oeste (Cunha; 2008).

O melhoramento genético de soja praticado na maior parte da década de 1970 explorava a variabilidade genética para a obtenção de adaptação às condições edafo-climáticas brasileiras. A partir da década seguinte, o aumento da produtividade e do desempenho agrícola, com a obtenção de maiores níveis de tolerância a diferentes pragas e doenças, passou a ser o principal objetivo dos programas de melhoramento genético da cultura (Cunha; 2008). Nesse contexto, o direcionamento dos esforços dos melhoristas de soja, nos últimos vinte anos, se concentrou na redução de custos de produção e numa maior agregação de valor ao produto, visando ao aumento da lucratividade da cultura.

Seguindo esses critérios, os programas de melhoramento genético conduzidos na Embrapa desenvolveram diversas cultivares adaptadas para a região Centro-Oeste, dentre as quais se destaca a de ciclo médio (completo em até 130 dias após a semeadura) Conquista, que possui características voltadas para a manutenção da estabilidade do rendimento agrônômico — como maior resistência a fitopatógenos que causam sérios prejuízos ao produtor e perdas na cultura, principalmente os causadores de doenças fúngicas como o Oídio (*Sphaerotheca fugilinea*), a Mancha “olho-de-rã” (*Cercospora sojina*) e o Cancro da haste (*Phomopsis phaseoli f. sp.*; *Diaporthe phaseolorum f. sp. meridionalis*) e também doenças bacterianas como a Pústula bacteriana (*Xanthomonas campestris*) (CNPSO, 2004).

Outro exemplo importante é a cultivar de ciclo precoce (até 120 dias após a semeadura) da Embrapa, BR-16, a qual foi escolhida para receber o gene marcador de seleção *ahas* durante o processo de obtenção de plantas transgênicas tolerantes à herbicida (Rech et al., 2008). Essa cultivar apresenta boa capacidade de transformação genética segundo o protocolo desenvolvido pelo grupo de Laboratório de Transferência de Genes II (LTG II) do Cenargen (Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia), além do seu cultivo ser amplamente difundido na região Centro-Oeste, com índices de produtividade compatíveis com a média nacional (CNPSo, 2004).

1.5) A transformação genética de plantas superiores.

Uma planta transgênica é aquela que contém um ou mais genes oriundos de outros organismos — ou de cópias extras de genes da própria planta — que foram inseridos no seu genoma por meios que não o da via sexual. Dessa maneira, a transformação genética de plantas pode ser compreendida como a introdução de genes oriundos de diferentes espécies animais, vegetais ou de microorganismos em um genoma vegetal receptor, independentemente da fecundação (Brasileiro & Carneiro, 1998).

Diferentes transgenes e seqüências regulatórias da expressão gênica inseridos no genoma da espécie receptora podem ser inclusive, originárias de um organismo que não possua compatibilidade sexual ou que tenha divergido evolutivamente da planta-alvo há bastante tempo.

A obtenção de plantas transgênicas *in vitro* baseia-se em três conjuntos amplos de técnicas de manipulação molecular e celular: a engenharia genética; as técnicas de transferência de transgenes para a planta-alvo e as técnicas de cultura de tecidos, como a organogênese e a morfogênese *in vitro* (Brasileiro & Carneiro, 1998).

As técnicas de engenharia genética permitem a manipulação *in vitro* e a clonagem de genes, resultando na obtenção de vetores plasmidiais bacterianos completos ou fragmentados. Essas moléculas híbridas contêm seqüências codificadoras de RNAs — que podem ou não ser traduzidos em proteínas — associadas aos elementos genéticos de controle de expressão gênica, tais como promotores, peptídeos-sinais e terminadores. O conjunto de elementos genéticos que formam a unidade exógena de expressão gênica constitui o *cassete* de expressão, o qual pode ser estavelmente integrado ao genoma vegetal.

Os plasmídeos, ou apenas os fragmentos contendo o *cassete* de expressão, podem ser introduzidos no núcleo ou no interior de organelas de plantas que

contenham o seu próprio genoma, como mitocôndrias e cloroplastos (Russo, 2003; Berg & Mertz, 2010).

Dois métodos de transformação genética têm sido convencionalmente empregados para essa finalidade: a infecção dos tecidos-alvos por células transgênicas de *Agrobacterium tumefaciens* — método corriqueiramente utilizado para a transformação genética da maioria das plantas dicotiledôneas — ou pela chamada “introdução direta”, através do bombardeamento dos explantes com micropartículas contendo os genes de interesse adsorvidos superficialmente (método biobalístico) (Vasil, 2008).

Este último método foi o empregado no presente trabalho exatamente por demonstrar menor dependência genotípica, além de ser o mais utilizado para a transformação genética de leguminosas, como a soja e a alfafa. Plantas que estejam fora do espectro de infecção da *Agrobacterium tumefaciens*, notadamente os cereais, como o arroz, o trigo e o milho, também podem ser geneticamente transformadas de maneira eficiente pelo método biobalístico, ainda que o aperfeiçoamento dos protocolos de transformação de gramíneas por *Agrobacterium* já permita a transformação genética de algumas monocotiledôneas por esse método.

A técnica de biobalística utiliza um acelerador de partículas — também chamado de *gene gun* — para bombardear explantes ou células em suspensão com microprojéteis de ouro ou tungstênio (de 0,2 a 4 μm de diâmetro) recobertos com fragmentos de DNA exógeno (Sanford et al., 1987). Esses microprojéteis são acelerados a uma velocidade final de 1.500 km/h sobre os explantes e penetram de maneira não-letal a parede celular e a membrana citoplasmática de células vegetais, alojando-se aleatoriamente nas organelas celulares. Após a penetração, ocorre a dissociação do DNA exógeno pela ação citosólica, seguida da sua integração ao genoma vegetal por recombinação homóloga (Cunha, 2008).

O sistema que utiliza gás hélio sob alta pressão é o que apresenta maior eficiência na obtenção de altas frequências de transformação, além de ser amplamente utilizado para a transformação genética de uma grande variedade de espécies vegetais e de reduzir o tempo de cultivo dos explantes *in vitro*, permitindo maior precocidade na realização de ensaios de caracterização molecular de potenciais eventos transformantes (Rech et al., 1997; Aragão et al., 2000; Rech et al., 2008; Cunha et al., 2011a; Cunha et al., 2011b; Vianna, 2002; Vianna et al., 2011a; Vianna et al., 2011b).

A terceira premissa para a obtenção de plantas transgênicas é a regeneração de indivíduos completos a partir dos explantes transformados mediante o emprego de técnicas de cultura de tecidos. Notadamente, o cultivo dos explantes bombardeados

se dá em meios de cultura nutritivos associados a reguladores de crescimento e a agentes seletivos, como herbicidas e antibióticos (Cunha, 2008).

Um método eficiente para a indução de organogênese direta da parte aérea dos explantes é o cultivo de embriões de sementes com a sua região meristemática apical preservada ou simplesmente dos próprios meristemas apicais ou axilares em meio de cultura contendo agentes estimulantes de brotação, como citocininas.

Esse método é capaz de regenerar plantas transgênicas de soja sem a necessidade de passagem do tecido por fases intermediárias de desdiferenciação — como calo, por exemplo, — o que minimiza a possibilidade de ocorrência de variação somaclonal (Sairam et al., 2003; Sharma et al., 2004).

1.6) A transformação genética de plantas de soja.

Os grupos de Hinchee e Christou, ambos em 1988, foram os primeiros a publicar trabalhos a sobre transformação genética de soja. O primeiro utilizou o sistema *Agrobacterium* para obter plantas regeneradas a partir de nós cotiledonares resistentes à canamicina e o segundo utilizou o sistema de biobalística para obter plantas quiméricas expressando a enzima β -glucuronidase. Nesse trabalho, células intactas de embriões foram bombardeadas com um plasmídeo contendo o gene *nptII* (cuja expressão confere tolerância à canamicina) sob controle do promotor constitutivo CaMV 35S, a partir das quais foram selecionados protoplastos transgênicos na presença do antibiótico. A posterior conversão dos protoplastos selecionados em calos embriogênicos totipotentes possibilitou a obtenção *in vitro* de plantas adultas completas (Christou et al., 1988).

Desde o início da década de 1990, diversos grupos de pesquisa têm buscado ativamente o aperfeiçoamento dos sistemas de transformação genética de soja. A principal limitação dos protocolos de então eram a baixa eficiência de transformação e a sua restrição a apenas algumas poucas variedades de soja (Kaufman et al., 1986; Finer & McMullen, 1991; Hooykaas & Schilperoort, 1992; Hansen et al., 1994).

Apesar dessas limitações, o protocolo de Christou e colaboradores (1988) foi o escolhido para a obtenção de uma linhagem-elite de soja transgênica contendo o gene mutante codificador da enzima 5-enol-piruvil-shiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) de *A. tumefaciens*. As plantas transgênicas homozigotas para o gene foram capazes de tolerar doses de até 1,68 kg do herbicida Glifosato (N-fosfometil-glicina) (Round up[®]) por hectare pulverizado no campo, considerada superior à dosagem comercial normalmente empregada na lavoura (Padgett, 1995).

O produto, desenvolvido e patenteado pela empresa norte-americana Monsanto (<http://www.monsanto.com/>) sob o nome de Round up Ready[®], e liberado para o plantio comercial nos EUA e no Canadá em 1995, representa um marco para a biotecnologia vegetal e para as relações de aceitação da nova tecnologia tanto por pesquisadores quanto por produtores agrícolas, uma vez que seu cultivo ultrapassa largamente os 60 milhões de hectares em todo o mundo (Cunha, 2008; James, 2010).

Apenas três anos depois da liberação comercial da soja Round up Ready[®], uma fitase de *Aspergillus* sp. foi expressa com sucesso em sementes transgênicas de soja (Denbow et al., 1998). No mesmo ano, o primeiro biofármaco produzido em soja - um anticorpo monoclonal humanizado anti-*herpes simplex vírus* (HSV) - foi expresso de maneira constitutiva em sementes da planta (Zeitlin et al., 1998).

A mesma estratégia foi empregada para acumular a proteína β -caseína bovina, sob o controle de um promotor de uma lecitina de soja, nas sementes transgênicas (Philip et al., 2001).

Em 2000, o grupo de pesquisadores do Laboratório de Transferência de Genes (LTG) do Cenargen desenvolveu um protocolo eficiente de transformação genética de soja independente da cultivar escolhida, capaz de levar à obtenção de plantas transgênicas com uma frequência de transformação de até 20,1% (Aragão et al., 2000). O sistema preconiza a utilização do sistema biobalístico para a introdução de transgenes no genoma de células do meristema apical de embriões maduros de soja. Um dos genes utilizados no co-bombardeamento dos meristemas apicais é o marcador de seleção mutante *ahas*, previamente isolado de *Arabidopsis thaliana*, que confere tolerância ao herbicida Imazapyr[®] (Arsenal).

O princípio ativo do herbicida é uma molécula da classe das imidazolinonas, capaz de translocar sistemicamente ao longo da planta e se acumular na região meristemática do embrião. O mecanismo bioquímico de ação do Imazapyr[®] (Arsenal) consiste na inibição da atividade catalítica da enzima ácido-aceto-hidroxi-sintase (AHAS; EC 4.1.3.18) — fundamental na via de biossíntese de aminoácidos essenciais como valina, isoleucina e leucina em plantas superiores (Aragão et al., 2000).

O gene *ahas* mutante contém uma alteração na posição 653 pb de sua cadeia nucleotídica, capaz de resultar na substituição de um resíduo de serina por um de asparagina na cadeia polipeptídica da enzima AHAS. Essa alteração permite que o princípio ativo do herbicida, o qual atua exatamente nas células da região meristemática apical da planta, não reconheça seu sítio de acoplamento na estrutura terciária da proteína mutada, permanecendo praticamente inócuo para a planta transgênica em concentrações não-letais (até 500 nM).

Eventos transformantes *in vitro*, ainda em estágio de plântula, que possuam uma ou mais cópias funcionais do gene mutante (em adição aos alelos nativos) geralmente apresentam tolerância moderada à presença do Imazapyr[®] (Arsenal) no meio de cultura de seleção. Já plantas transgênicas adultas podem apresentar tolerância moderada ou alta a concentrações do herbicida usualmente empregadas no campo, assim como a todos os outros herbicidas da classe das Imidazolinonas (Aragão et al., 2000; Rech et al., 2008).

Associado ao Imazapyr[®] (Arsenal) no meio de cultivo há ainda o emprego de um agente de aceleração do ciclo celular vegetal, a citocinina 6-benzilaminopurina (BAP), um hormônio vegetal capaz de estimular a multiplicação de células do meristema apical de eixos embrionários de soja, dentre as quais aquelas portadoras de cópias mutantes do gene *ahas*.

A utilização desse sistema na seleção de eventos transformantes — mediada pela expressão do gene *ahas* mutante — e no estímulo à proliferação de células transgênicas totipotentes do meristema apical, possibilitou um significativo aumento na regeneração *in vitro* de plantas transgênicas adultas férteis, capazes de transmitir cópias funcionais dos transgenes de interesse para a progênie de maneira estável (Rech et al., 2008; Vianna et al., 2011a; Rech, 2012).

Uma alternativa nacional à soja Round up Ready[®] americana foi desenvolvida, a partir de 1997, pelo grupo do LTG em parceria com a multinacional alemã BASF, utilizando o protocolo de transformação/seleção/regeneração previamente mencionado (Rech et al., 1997; Rech et al., 2008; Rech et al., 2010).

As plantas-élites de soja (*G. max*) transgênicas desenvolvidas pela Embrapa demonstraram tolerância a doses comerciais de Imazapyr[®] (Arsenal) em experimentos sob contenção e também em ensaios de campo. Essas mesmas plantas foram introduzidas no programa de melhoramento genético do CNPSo e a nova cultivar obtida, denominada 127 (cujo nome comercial é Cultivance[®]) foi avaliada quanto a sua eficiência agrônômica e a sua segurança alimentar e ambiental. O plantio comercial da soja Cultivance[®] no Brasil foi aprovado, em 2009, pela CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - vinculada ao Ministério de Ciência e Tecnologia) – tornando-se assim o primeiro produto agrônômico obtido pela tecnologia do DNA recombinante a atingir o campo em caráter comercial no Brasil. Um ano depois, foi aprovada a licença para a importação da soja transgênica da Embrapa para as Filipinas e a sua utilização na alimentação humana e animal naquele país (Rech et al., 2010).

Esse sistema de transformação genética de plantas de soja foi utilizado para a obtenção de diferentes linhagens transgênicas capazes de acumular diversas

proteínas recombinantes de interesse farmacológico nas sementes (Vianna et al., 2011a; Vianna et al., 2011b; Cunha et al., 2011a; Cunha et al., 2011b; Cunha et al., 2011c).

1.7) A expressão de fármacos recombinantes em plantas - “Molecular Farming”.

As proteínas são sintetizadas como parte do metabolismo de todas as formas de vida e desempenham um papel central em inúmeros processos celulares. Essas funções podem ser tão diversas quanto a sinalização celular via transdução de sinais químicos, a catálise de reações enzimáticas, a mediação de respostas autoimunes e o transporte de biomoléculas contra gradientes de concentração. Proteínas nativas e recombinantes são largamente utilizadas como reagentes na pesquisa científica, como ferramentas sofisticadas de diagnóstico de doenças e no tratamento de moléstias, bem como em processos industriais mediados por enzimas. Além disso, polipeptídeos recombinantes também possuem importância fundamental em setores da agricultura moderna e da indústria farmacêutica (Ma et al., 2003; Lau & Sun, 2009; Desai et al., 2010; Paul & Ma, 2011; Xu et al., 2011; Egelkrout et al., 2012).

A produção comercial de proteínas nativas a partir de seus organismos de origem sejam eles procaríotos, plantas ou mamíferos, freqüentemente requer processos de extração caros e trabalhosos, que podem influenciar decisivamente nos custos de produção e limitar a capacidade de escalonamento de síntese da proteína em questão. As principais razões dessas limitações são as usualmente baixas concentrações das proteínas-alvo em tecidos que possuem alta instabilidade protéica e/ou sua associação endógena a moléculas contaminantes presentes em altas concentrações (Stöger et al., 2005).

Outra limitação recorrente é a natureza do organismo produtor da proteína de interesse. A utilização de proteínas nativas, extraídas de microorganismos e de mamíferos, pode incorrer em risco de contaminação do usuário com patógenos e também na transmissão de doenças graves caso a sua purificação não tenha sido conduzida corretamente (Obembe et al., 2011).

Desde o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, no início da década de 1970, a produção recombinante de proteínas de interesse farmacológico e industrial tem se baseado em sistemas de fermentação microbiana (procaríótica e eucariótica) e em cultura de células transgênicas de mamíferos. Apesar de esses sistemas serem altamente eficientes em termos de rendimento de produção, eles apresentam algumas desvantagens em termos de autenticidade (identidade de

seqüência de aminoácidos e de modificações pós-traducionais), de biossegurança e de custos de produção, apesar do desenvolvimento recente de estratégias de expressão para minimizá-las ou saná-las.

Essas importantes limitações têm levado ao desenvolvimento, nas últimas duas décadas, de plataformas alternativas de biossíntese de fármacos recombinantes, baseadas em maior eficiência de escalonamento, menor custo de produção, alta qualidade do produto e em baixos riscos de contaminação com patógenos (Daniell et al., 2001; Twyman et al., 2003).

Uma das mais promissoras alternativas de substituição das plataformas recombinantes já estabelecidas é a utilização de sistemas vegetais como veículos para a produção de proteínas utilizadas como reagentes diagnósticos, vacinas e drogas, também denominados “plant-made pharmaceuticals” (PMPs) ou “fármacos produzidos em plantas” (Ma et al., 2003).

Essa aplicação representa uma vertente relativamente recente da biotecnologia, denominada “Plant Molecular Farming”, cujo escopo é a síntese de polipeptídeos recombinantes de interesse farmacêutico utilizando a maquinaria de reatores vegetais. (Fischer et al., 2004).

Alguns aspectos econômicos e qualitativos associados à síntese de “PMPs” converteram as plantas superiores em sistemas atraentes para a obtenção massal de fármacos. Reatores vegetais ou “biofábricas vegetais” são potencialmente um dos sistemas mais econômicos para a produção em larga escala dessa classe de biomoléculas.

O custo médio de produção de “PMPs” representa cerca de 10% do total apresentado por sistemas baseados em células de levedura, podendo ser até 50 vezes menor que àquele de sistemas bacterianos. Quando comparados com plataformas sofisticadas e relativamente caras, como cultura de células de mamíferos, essa diferença pode ser ainda maior. Estima-se que o custo de produção de um dado fármaco recombinante expresso de maneira equivalente em sementes de tabaco e suspensão celular de mamíferos pode ser até 1000 vezes menor no primeiro que no segundo (Kusnadi et al., 1997; Daniell et al., 2001; Twyman et al., 2003).

O principal fato que explica essas diferenças econômicas remonta à natureza fisiológica dos reatores vegetais. As plantas representam um dos tipos de biomassa de menor custo de produção na natureza, necessitando apenas de solo, água e luz para a produção de grande quantidade de biomassa, representada principalmente pelas folhas e sementes. Em oposição, o cultivo de células de microorganismos e de mamíferos exige a adoção de fermentadores caros e sua manipulação sob condições

estéreis, algo que onera consideravelmente o processo produtivo (Obembe et al., 2011).

Além disso, plantas comumente cultivadas como a soja, o milho e o tabaco possuem alta capacidade de escalonamento de produção e, como consequência de sua importância econômica, as práticas agrônômicas e a infraestrutura necessárias para a colheita, o transporte, o armazenamento e o processamento pós-colheita dessas culturas já se encontram plenamente estabelecidos na cadeia produtiva (Ma et al., 2005).

Outra vantagem importante é a presença, em algumas plantas, de órgãos naturais especializados no armazenamento de proteínas — como sementes, tubérculos e rizomas, capazes de serem explorados na estratégia molecular de expressão gênica para incrementar o acúmulo de proteínas recombinantes. A biossíntese de fármacos nas sementes, por exemplo, permite não apenas a compartimentalização das proteínas em organelas de estocagem de grandes volumes protéicos como também a modulação e o escalonamento da produção de acordo com a demanda pela molécula (Boothe et al., 2010).

Outro aspecto interessante é que o tempo de produção de folhas e sementes, embora mais longo que o de microorganismos, é consideravelmente mais curto que o de mamíferos de grande porte secretores da proteína no leite — e por isso mesmo restrito às fêmeas em fase de lactação.

Além disso, a etapa mais onerosa na produção recombinante de fármacos é a purificação da molécula de interesse farmacológico, que pode responder por até 80% do custo total de produção (Hood & Jilka, 1999). Dessa maneira, moléculas pequenas e estáveis, como antígenos de imunização humana e veterinária, produzidos em folhas, frutos, tubérculos e sementes consumidas *in natura* podem ser espessos sem a necessidade de purificação, o que reduz drasticamente os custos de produção (Ma et al., 1995; Ma et al., 1997; Ma et al., 1998; Ma et al., 2003; Obembe et al., 2011).

A ausência de patógenos comuns aos seres humanos e às plantas representa não apenas uma vantagem qualitativa como também econômica. Isso é particularmente relevante quando se leva em conta o fato de que determinadas etapas dos protocolos de purificação são restritas à eliminação de potenciais fontes carregadoras de toxinas e de diversos outros contaminantes — notadamente vinculados a células de mamíferos e de microorganismos.

Plantas possuem ainda a capacidade de acumular proteínas grandes e complexas, como anticorpos completos, além de promover modificações pós-traducionais sofisticadas que contribuem para a obtenção de fármacos com alto grau de qualidade. Isso se deve, basicamente, ao alto grau de conservação entre sistemas

vegetais e animais das etapas de síntese, secreção e processamento protéico, como o enovelamento, a oligomerização, a glicosilação no Retículo Endoplasmático (RE) e o processamento no Complexo de Golgi. Essas semelhanças aproximam o modo como essas proteínas são sintetizadas e processadas em plantas e no organismo humano, havendo diferenças mais freqüentes apenas quanto ao padrão de glicosilação vegetal típico (Daniell et al., 2001).

Essas diferenças se devem, primordialmente, à síntese de cadeias de glicanos ocorridas principalmente no aparelho de Golgi. As projeções de glicanos — cataliticamente adicionadas às proteínas após a tradução — diferem entre animais e plantas apenas nos últimos estágios de maturação. Peculiaridades como essas se devem ao tipo de maquinaria enzimática de processamento empregada nas etapas derradeiras de glicosilação. Nesses estágios, glicosiltransferases específicas de mamíferos e de plantas são as responsáveis pela catálise das reações de adição de glicanos N-ligados à seqüência polipeptídica enovelada (Gomord et al., 2004).

A principal consequência dessas diferenças é a incapacidade das plantas em adicionar resíduos terminais de galactose e de ácido siálico às proteínas nascentes e, em contrapartida, a adição de grupos de carboidratos como xilose- β (1 \rightarrow 2) e fucose- α (1 \rightarrow 3), os quais são ausentes em mamíferos (Ma et al., 2003).

Modificações dessa natureza podem, potencialmente, alterar a atividade, a biodistribuição e a estabilidade de proteínas recombinantes expressas em plantas, além de induzir respostas alérgicas no consumidor e resultar em baixa aceitação da tecnologia pela opinião pública. Entretanto, epitopos ligados a glicanos ubíquos de plantas são encontrados em glicoproteínas presentes na dieta humana há séculos, e diferentes estratégias moleculares de expressão dos transgenes podem ser utilizadas para a remoção ou o impedimento da adição desses carboidratos indesejáveis.

Camundongos alimentados com um anticorpo que continha resíduos de glicanos específicos de plantas, por exemplo, não apresentaram qualquer evidência de reação imune anti-glicano (Chargelegue et al., 2000).

A retenção dos polipeptídeos no Retículo Endoplasmático, por meio da adição de peptídeos-sinais C terminais como o KDEL, é o mecanismo mais difundido para evitar a sua passagem ao longo da via secretória e minimizar a N-glicosilação indesejável em plantas superiores (Gomord et al., 2004; Gomord et al., 2010).

Diferentes estratégias para a humanização do padrão de glicosilação de proteínas recombinantes em plantas também já foram elaboradas e aplicadas com sucesso. Uma das mais recentes diz respeito ao decréscimo da N-glicosilação típica de plantas a partir da inativação das glicosiltransferases do complexo de Golgi (Gomord et al., 2004; Saint-Jore-Dupas et al., 2007; Gomord et al., 2010).

Os diversos aspectos econômicos, qualitativos e relacionados à biossegurança, apresentados pelos diversos sistemas de expressão de proteínas recombinantes já desenvolvidos, podem ser comparados conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1: Comparação entre os diferentes sistemas de produção de proteínas recombinantes de interesse farmacêutico.

Sistema	Custo total	Tempo de produção	Capacidade de escalonamento	Qualidade do produto	Glicosilação	Riscos de contaminação	Custo de armazenamento
Bactéria	Baixo	Curto	Alta	Baixa	Nenhuma	Endotoxinas	Moderado
Levedura	Médio	Médio	Alta	Média	Incorreta	Baixos	Moderado
Cultura de células de mamíferos	Alto	Longo	Muito baixa	Muito alta	Correta	Vírus, príons e oncogenes	Alto
Animais transgênicos	Alto	Muito longo	Baixa	Muito alta	Correta	Vírus, príons e oncogenes	Alto
Cultura de células de plantas	Médio	Médio	Média	Alta	Diferente	Baixos	Moderado
Plantas transgênicas	Muito baixo	Longo	Muito alta	Alta	Diferente	Baixos	Inexpressivo

Adaptado de Ma et al., 2003.

Desde 1986, quando o primeiro fármaco recombinante relevante foi sintetizado em plantas transgênicas de tabaco – o hormônio do crescimento humano (hGH) – mais de cem diferentes proteínas recombinantes, dentre elas anticorpos, antígenos, hormônios, transportadores moleculares, peptídeos anticoagulantes e enzimas já foram expressas em diferentes sistemas vegetais (Cunha, 2008; Cunha et al., 2011a).

As plataformas comumente utilizadas para a produção de todas essas classes de moléculas são a suspensão de células de tabaco; as sementes de cereais e de leguminosas, como o milho e a soja; as sementes de oleaginosas, como a canola; os tubérculos de batata; as diferentes espécies de folhosas, como a alface e o espinafre, além de frutas como o tomate e a banana (Spök & Karner, 2008) (tabela 2).

Tabela 2: Importantes proteínas farmacêuticas produzidas em plantas transgênicas.

Proteína	Planta hospedeira	Características	Referências
Biofármacos			
hGH	Tabaco e Girassol	Primeira proteína humana expressa em plantas Primeira proteína humana expressa em cloroplastos (7% PSTF)	(Barta et al., 1986) (Staub et al., 2000)
Albumina sérica humana	Tabaco e batata	Primeira proteína nativa completa expressa em plantas (0.1% PST). Altos níveis de expressão em cloroplastos (11% PSTF) Tratamento de cirrose hepática, queimaduras e aplicações cirúrgicas	(Fernández-San Millán et al., 2003) (Sijmons et al., 1990)
α -interferon humano	Arroz e nabo	Primeira proteína humana produzida em arroz Tratamento de hepatite C	(Zhu et al., 1994)
β -interferon humano	Tabaco	Tratamento de hepatite B (< 0,01% peso seco)	(Kusnadi et al., 1997)
Eritropoetina	Tabaco	Primeira proteína humana produzida em suspensão de células Combate a anemia	(Matsumoto et al., 1995)
Fosfatase alcalina	Tabaco	Secretada por folhas e raízes	(Borisjuk et al., 1999) (Komarnytsky et al., 2000)
Aprotinina	Milho	Inibidor de tripsina para cirurgias de transplante Primeira proteína humana produzida em milho	(Delaney, 2002)
Antitripsina α 1	Arroz	Tratamento de fibrose cística, doenças hepáticas e hemorragias Primeira utilização de células de arroz em suspensão como biorreatores	(Terashima et al., 1999)
Proteína C humana	Tabaco	Anticoagulante (< 0,01% PST)	(Cramer et al., 1999)
Hirudina	Canola	Inibidor de Trombina (0,30% do conteúdo protéico de sementes)	(Cramer et al., 1999)
Estimulador de colônias de macrófagos/granulócitos	Tabaco	Combate à neutropenia	(Giddings et al., 2000)
Encefalina humana	Arabidopsis.	Hiperanalgésico com atividade opiácea (0,10% do conteúdo protéico de sementes)	(Kusnadi et al., 1997)
Fator de crescimento de epiderme	Tabaco	Reparo de lesões e controle de proliferação celular (0,01% PST)	(Cramer et al., 1999)
Hemoglobinas	Tabaco	Substituto sanguíneo (0,05% do conteúdo	(Cramer et al., 1999)

α e β		protéico de sementes)	
Colágeno	Tabaco	(< 0,01% do peso seco)	(Ruggiero et al., 2000)
Lactoferrina humana	Batata	Proteína antimicrobiana (0,10% PST)	(Chong & Langridge, 2000)
Enzima conversora de angiotensina	Tabaco e tomate	Tratamento de hipertensão	(Giddings et al., 2000)
α - Tricosantina	Tabaco	Proteína da capa protéica do vírus TMV-U1 Terapia anti-HIV (2% PST)	(Giddings et al., 2000)
Glicocerebrosidase	Tabaco	Tratamento da doença de Gaucher (1,0 -10,0 % PST)	(Cramer et al., 1999)
Anticorpos recombinantes (<i>plantibodies</i>) terapêuticos e diagnósticos			
IgG1	Tabaco	Primeiro anticorpo produzido em plantas; IgG sérico obtido pelo cruzamento de plantas que expressavam as cadeias leves e pesadas individualmente	(Hiatt et al., 1989)
IgM	Tabaco	Primeiro IgM expresso em plantas e endereçado para os cloroplastos	(Düring et al., 1990)
SIgA/G (anti-adesina <i>S. mutans</i>)	Tabaco	Primeiro anticorpo secretório produzido em plantas; obtido pelo cruzamento seqüencial de quatro linhagens portadoras dos componentes individuais; o mais avançado fármaco derivado de plantas até o momento	Ma et al., 1998
scFv-briodina 1 (anti-CD 40)	Tabaco	Primeiro scFv farmacêutico produzido em sistema vegetal (suspensão de células)	(Francisco et al., 1997)
IgG (HSV)	Soja	Inibidor do Herpes simplex virus 2 Primeira proteína farmacêutica produzida em soja	(Zeitlin et al., 1998)
LSC (HSV)	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Primeiro exemplo de fármaco produzido em alga	(Mayfield et al., 2003)
Guy's 13 (SIgA)a	Tabaco	Prevenção de cáries dentárias (500 μ g/g peso seco de folhas)	Ma et al., 1995 Ma et al., 1998
C5-1 (IgG)	Alfalfa	Reagente diagnóstico (1.0%) PST	(Khoudi et al., 1999)
ScFvT84.66 (ScFv)	Trigo	Tratamento de câncer, antígeno carcinoembrionário	(Stöger et al., 2000)

		(900.0 ng/g folhas; 1.5 µg/g sementes)	
ScFvT84.66 (ScFv)	Arroz	Tratamento de câncer, antígeno carcinoembrionário (29.0 µg/g folhas; 32.0 µg/g sementes; 3.8 µg/g calo)	(Torres et al., 1999) (Stöger et al., 2000)
ScFvT84.66 (ScFv)	Arroz	Tratamento de câncer, antígeno carcinoembrionário (27.0 µg/g folhas)	(Stöger et al., 2000)
T84.66 (IgG)	Tabaco agroinfiltrado	Tratamento de câncer, antígeno carcinoembrionário (1.0 µg/g folhas)	(Vaquero et al., 1999)
38C13 (scFv)	Tabaco	Tratamento de linfoma de células β; vacina de anticorpo (30.0 µg/g folhas)	(McCormick et al., 1999)
CO17-1A (IgG)	Tabaco	Tratamento de câncer de cólon, antígeno de superfície celular	(Verch et al., 1998)
Subunidades de vacinas			
Proteína de envelope Vírus hepatite B	Tabaco, batata e Tremoço	Primeira candidata à vacina produzida em vegetais; terceira vacina derivada de plantas a atingir estágio de testes clínicos < 0,01% PST (tabaco), < 0,01% Peso seco (batata e Tremoço)	(Mason et al., 1992)
Glicoproteína do vírus da raiva	Tomate	Primeiro exemplo de vacina "comestível" expressa em planta também comestível 1% PST	(McGarvey et al., 1995)
Enterotoxina termolábil de <i>E. coli</i>	Tabaco batata e milho	Primeira vacina produzida em plantas a atingir estágio de testes clínicos Níveis de produção: < 0,01% PST (tabaco) e 0,19% PST (batata)	(Tacket et al., 2000)
Proteína do capsídeo de <i>Norwalk vírus</i>	Tabaco e Batata	Segunda vacina produzida em planta a atingir estágio de testes clínicos 0,23% PST (tabaco) e 0,37% PST (batata)	(Tacket et al., 2000)
Autoantígeno do Diabetes	Tabaco e batata	Primeira vacina originária de planta para uma doença auto-imune	Ma et al., 1997
Subunidade B da toxina da Cólera	Tabaco	Primeira vacina expressa em cloroplastos 0,30% PST	(Daniell et al., 2001)

Subunidades B e A2 da toxina da Cólera,	Batata	Primeiro antígeno recombinante multivalente derivado de planta, sintetizado para a proteção simultânea contra várias doenças entéricas	(Yu & Langridge, 2001)
Glicoproteína S do vírus da gastroenterite	Tabaco e milho	Primeiro exemplo de proteção induzida via alimentação em um animal	(Lamphear et al., 2002)
Glicoproteína B do Citomegalovírus humano	Tabaco	Proteína imunológica <0,02% PST	(Tackaberry et al., 1999)
Proteína VP60 do vírus da doença hemorrágica de coelhos (aplicação veterinária)	Batata	Imunogênica e protetora quando injetada 0,30% PST	(Ma et al., 2003)
Proteína VP1 do vírus da doença de pata e boca (animais domésticos)	Arabidopsis, e alfafa	Imunogênica e protetora quando injetada	(Carrillo et al., 1998) (Wigdorovitz et al., 1999)
Glicoproteína S do vírus da gastroenterite coronariana transmissível (porcos)	Arabidopsis, tabaco e milho	Imunogênica e protetora quando injetada (A. e tabaco) e por via oral (Milho) 0.06% PST (A.) 0.20% PST (tabaco) e <0.01% Peso seco (milho)	(Ma et al., 2003)

Adaptado de Daniell et al., 2001 e Ma et al., 2003. HSV, *herpes simplex vírus*; IgG, imunoglobulina G; IgM, imunoglobulina M; LSC, long single chain; scFv, single-chain FV fragment; SIgA, secretory immunoglobulin A; PSTF, proteínas solúveis totais de folhas.

A aprovação comercial de alguns dos primeiros produtos recombinantes produzidos em plantas transgênicas e o avançado estágio de desenvolvimento de muitos outros confirmam o potencial desses sistemas de expressão para a produção em larga escala de produtos veterinários, reagentes e drogas eficientes e mais baratas.

Em 2010, aproximadamente trinta “PMPs”, incluindo vacinas, anticorpos e proteínas terapêuticas alcançaram os estágios finais dos protocolos e testes internacionais anteriores à comercialização. Recentemente, quatro fármacos derivados de plantas foram lançados no mercado, em adição às três moléculas previamente

sintetizadas em sementes transgênicas de milho: a tripsina bovina, a avidina e a β -glucuronidase. Esses produtos comerciais pioneiros já eram utilizados rotineiramente em laboratórios de pesquisa e fazendas em todo o mundo desde 1998 (Ma et al., 2003; Obembe et al., 2011) (tabela 3).

Tabela 3: Fármacos produzidos em plantas transgênicas aprovados para comercialização.

Produto	Nome comercial	Planta	Organismo de origem	Finalidade comercial	Companhia
Aprotinina	AproliZean	Milho	Bovino	Pesquisa	ProdiGene (www.prodigene.com/)
Aprotinina	Apronexin	Tabaco	Bovino	Pesquisa	Kentucky BioProcessing, LLC (inicialmente produzido pela Large Scale Biology) (www.kbpllc.com/)
Avidina	Avidina recombinante	Milho	Galinha	Pesquisa e diagnóstico	ProdiGene (www.prodigene.com/)
β -glucuronidase	NA	Milho	Bactéria	Pesquisa e diagnóstico	ProdiGene (www.prodigene.com/)
Tripsina	TrypZean	Milho	Bovino	Pesquisa	ProdiGene (www.prodigene.com/)
Lactoferrina	NA	Arroz	Humano	Pesquisa	Ventria Bioscience (www.ventria.com/)
Lisozima	NA	Arroz	Humano	Pesquisa	Ventria Bioscience (www.ventria.com/)

Adaptado de Spök & Karner, 2008.

1.8) Expressão de biofármacos recombinantes nas sementes de plantas transgênicas.

Há basicamente três estratégias para a produção de proteínas recombinantes em sistemas vegetais: 1) a utilização de cultura de células vegetais equivalentes às suspensões de células de mamíferos, insetos e microbianas; 2) a expressão transiente de transgenes em tecidos de plantas cujas células somáticas tenham sido temporariamente transformadas por agroinjeção ou infecção viral, e 3) a obtenção de plantas transgênicas completas cujo genoma nuclear, mitocondrial ou cloroplasmático tenha sido geneticamente transformado (Kawakatsu & Takaiwa, 2010).

A transformação estável do genoma nuclear de plantas completas é a estratégia mais utilizada para a produção de fármacos recombinantes, além de ser aplicável a uma grande variedade de espécies vegetais: de cereais a leguminosas, incluindo folhosas, oleaginosas e fruteiras. Esse método preconiza a integração

estável de transgenes no genoma da planta hospedeira e permite a síntese contínua da proteína recombinante como uma característica fenotípica herdável, seja ela de maneira generalizada ou localizada em um órgão vegetal específico (Vianna et al., 2011a).

Apesar da baixa ocorrência de plantas quiméricas (indivíduos que compartilham tecidos transgênicos e não transgênicos originados da regeneração de ramos independentes a partir de células germinativas transformadas e não-transformadas), obtidas via escapes na seleção *in vitro*, as plantas cujo genoma foi estavelmente transformado podem ser cultivadas repetidamente em casa de vegetação ou no campo, a fim de gerar linhagens homocigotas a serem cruzadas com outras cultivares em programas de melhoramento genético (Lee & Natesan, 2006).

Independentemente da classe do biorreator escolhido, os maiores desafios enfrentados pela produção de fármacos em sistemas vegetais são os usualmente baixos níveis de expressão de proteínas recombinantes nas células transgênicas, os quais normalmente variam de 0,001 a 1% em relação às proteínas solúveis totais (PSTs) presentes nesse ambiente. Esses índices estão geralmente relacionados a baixos níveis de transcrição dos transgenes e/ou à alta instabilidade pós-traducional das proteínas recombinantes no citosol de células transgênicas (Tremblay et al., 2010).

A escolha da espécie vegetal destinada à produção de fármacos e proteínas industriais representa um dos mais importantes critérios visando ao sucesso da estratégia molecular de expressão gênica adotada. Particularidades genômicas, bioquímicas, fisiológicas e até mesmo morfológicas, inerentes a cada espécie, exercem influência crucial em inúmeros fatores, tais como o rendimento de obtenção de proteínas recombinantes, a capacidade de promoção de modificações pós-traducionais em proteínas complexas, a estabilidade protéica a nível estrutural e o custo final de produção.

A tabela 4 ilustra as propriedades e peculiaridades das principais espécies vegetais utilizadas como biorreatores de proteínas recombinantes para os setores farmacêutico e industrial.

Tabela 4: Plantas utilizadas como veículos de expressão de biofármacos.

Espécie	Vantagens	Desvantagens
Plantas modelo		
Arabidopsis	Alta disponibilidade de mutantes, acessibilidade genética e facilidade de transformação	Inútil para produção comercial (baixa biomassa)
Plantas simples		
<i>Physcomitrella patens</i> (Hedw.) Bruch & Schimp., <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Lemna	Facilidade de cultivo sob contenção, propagação clonal facilitada, permite a secreção em meio de cultura, apresenta capacidade de recombinação homóloga em <i>Physcomitrella</i>	Dificuldades de escalonamento de produção
Folhosas		
Tabaco	Alta produção de biomassa, tecnologia de transformação e expressão estabelecida, rápido escalonamento, não utilizado para alimentação humana e de outros animais	Baixa estabilidade protéica pós-colheita, presença de alcaloides
Alfafa e trevo	Alta produção de biomassa, úteis para vacinação animal, propagação clonal, adição de N-glicanos homogênea (alfafa)	Baixa estabilidade protéica pós-colheita, presença de ácido oxálico
Alface	Alta produção de biomassa, comestível, útil para a vacinação humana	Baixa estabilidade protéica pós-colheita
Cereais		
Milho e arroz	Alta estabilidade protéica durante o armazenamento, alta produção de biomassa, facilidade de transformação e de manipulação	
Trigo e cevada	Alta estabilidade protéica durante o armazenamento	Baixos níveis de produção, dificuldades de transformação e manipulação
Legumes		
Soja	Biomassa abundante, possibilidade de expressão no tegumento das sementes Alta concentração protéica nas sementes - alta relação biomassa de sementes/custo de produção	Baixos níveis de expressão

Ervilha e guandú	Alta concentração protéica nas sementes	Baixos níveis de expressão
Frutas e Tubérculos		
Batata e cenoura	Comestíveis, alta estabilidade protéica em tecidos de armazenamento	Necessidade de cocção
Tomate	Comestível, passível de contenção em casas de vegetação	Cultivo caro, necessita ser refrigerado após a colheita
Oleaginosas		
Canola e camelina	Plataforma de fusão à proteína Oleosina, sistema de brotação desenvolvido	Baixos níveis de produção

Adaptado de Fischer et al., 2004.

Como a obtenção de custos de produção competitivos e a capacidade de biossíntese em larga escala são as características mais importantes relacionadas ao desenvolvimento de produtos biotecnológicos vegetais, o aumento do nível de expressão recombinante em plantas transgênicas é a estratégia mais empregada para se atingir níveis comerciais de produção (Streatfield, 2007; Desai et al., 2010).

Os níveis de expressão de transgenes integrados aos cromossomos das plantas estão diretamente relacionados, dentre outros fatores, à eficiência transcricional modulada por seqüências regulatórias presentes no *cassete* de expressão plasmidial (Vianna et al., 2011a).

Promotores eucarióticos eficientes são aqueles que proporcionam altos níveis de produção de mRNAs em função de sua seqüência nucleotídica ser portadora de sítios específicos de fácil acoplamento de sinais e fatores de transcrição e do complexo da RNA polimerase II. Além desses elementos genéticos, os promotores “fortes” apresentam a modulação facilitada de elementos repressores próximos dos sítios de início de transcrição, os quais podem ser desligados da cromatina para facilitar a ativação transcricional (Ow et al., 1987; Desai et al., 2010; Tremblay et al., 2010).

Dentre os promotores “fortes”, os constitutivos são aqueles que permitem a expressão generalizada de transgenes em todos os tecidos das plantas transgênicas e são rotineiramente empregados em estratégias de produção de fármacos recombinantes, principalmente quando os alvos são as folhas.

Os promotores constitutivos fortes mais amplamente utilizados para a expressão heteróloga em dicotiledôneas são o CaMV 19S e 35S, derivados dos transcritos 19S e 35S do *cauliflower mosaic virus* (CaMV). Em monocotiledôneas o

promotor da ubiquitina 1 de milho (*ubi-1*) também é bastante popular e eficiente para a expressão de proteínas heterólogas em folhas de cereais (Twyman et al., 2003).

Os terminadores amplamente utilizados incluem o 35S CaMV e o dos genes *nos* e *ssu*, respectivamente de *Agrobacterium tumefaciens* e de ervilha (*Pisum sativum*) (Ma et al., 2003).

Apesar de as espécies folhosas apresentarem valores de biomassa consideravelmente altos, proteínas recombinantes acumuladas nas folhas são mais suscetíveis à degradação mediada pela atividade proteolítica endógena de hidrolases e pelo ambiente foliar instável, relacionado à presença de compostos fenólicos naturalmente encontrados nos tecidos verdes. Esses fatores podem reduzir drasticamente os níveis finais de acúmulo de fármacos recombinantes e prejudicar sua purificação durante o processamento do material cru (Stöger et al., 2005).

A fim de minimizar o problema de degradação, as folhas de plantas transgênicas, nessas circunstâncias, devem ser congeladas ou rapidamente desidratadas imediatamente após a colheita e antes de sofrer qualquer processamento padrão. Além disso, a expressão recombinante constitutiva em plantas inclui a presença de proteínas recombinantes no pólen e nas raízes, o que pode levar a questionamentos relacionados à biossegurança, especialmente se a planta for alógama (de polinização aberta) e cultivada no campo (Commandeur et al., 2003; Stöger et al., 2005; Lee & Natesan, 2006).

Uma das maiores vantagens da expressão recombinante em plantas transgênicas é o fato de que, em contraste com as folhas, a produção de fármacos pode ser restrita a órgãos vegetais que naturalmente acumulam grandes quantidades de proteínas nativas, tais como tubérculos e, em especial, as sementes.

A expressão de proteínas heterólogas especificamente em sementes implica em uma série de particularidades naturalmente proporcionadas por esses órgãos, notadamente no que diz respeito ao aumento da estabilidade pós-traducional.

As sementes proporcionam não apenas um ambiente bioquímico apropriado, desprovido de compostos fenólicos e com baixa concentração de hidrolases, como também apresentam tecidos especializados para o acúmulo protéico altamente estável — mesmo à temperatura ambiente — o que reduz a necessidade de condições especiais de armazenamento (Leite et al., 2000).

Além disso, como os custos de processamento e purificação são inversamente proporcionais à concentração do produto no tecido de armazenamento, o acúmulo de altos níveis de proteínas recombinantes em um volume reduzido propicia uma diminuição significativa dos custos de produção de biofármacos recombinantes (Stöger et al., 2002). Como consequência dessas duas características, a produção agronômica

de sementes transgênicas e o processo de purificação de fármacos recombinantes podem ser descontínuos e o produto final ser disponibilizado para a comercialização em função da demanda da indústria (Gleba et al., 2005).

O acúmulo de proteínas heterólogas apenas nas sementes ajuda também a reduzir a possibilidade de toxidez potencial do polipeptídeo à planta (Kusnadi et al., 1997).

Para restringir a expressão de transgenes às sementes é necessário o emprego de promotores tecido-específicos bem caracterizados e que possibilitem altos níveis de atividade transcricional. A adoção dessa estratégia pode refletir em aumentos reais na concentração final de proteínas recombinantes acumuladas nas sementes.

Diversos promotores tecido-específicos já foram extensamente caracterizados tanto do ponto de vista estrutural quanto funcional. Alguns bastante utilizados em estratégias moleculares de expressão gênica são os que controlam a expressão de uma zeína de sementes de milho, da glutenina de trigo, da glutelina de arroz e de proteínas de semente de ervilhas (Ma et al., 2003).

A restrição da expressão de anticorpos nas sementes de cereais, por exemplo, proporcionou o acúmulo estável dessas imunoglobulinas, sem perda de função, mesmo sob condições adversas de armazenamento por pelo menos três anos (Stöger et al., 2000).

As sementes de outros cereais, como a cevada, também se mostraram bons candidatos para acumular altos níveis de proteínas recombinantes, como a enzima (1,3-1,4)- β -glucanase (Horvath et al., 2000).

Diversas dicotiledôneas já foram testadas quanto à sua capacidade de acumular fármacos complexos nas sementes. Um anticorpo modificado e um antígeno do *Human cytomegalovirus* (HCMV), por exemplo, já foram abundantemente expressos em sementes de plantas transgênicas de tabaco (Fiedler & Conrad, 1995; Tackaberry et al., 1999).

Um caso interessante que ilustra a possibilidade de incremento dos níveis de acúmulo de fármacos recombinantes mediante o aumento da estabilidade pós-traducional proporcionado pelas sementes foi experimentado por Jaeger e colaboradores (2002), que acumularam 36 vezes mais um fragmento de anticorpo monoclonal em sementes de *Arabidopsis thaliana* (quando da utilização de um promotor tecido-específico de sementes de feijão) do que sob controle do promotor constitutivo 35S do CaMV.

1.9) O promotor tecido-específico da γ -kafirina de sorgo.

A γ -kafirina é uma proteína de reserva de 212 aminoácidos (22 kDa) abundantemente expressa em sementes de sorgo (*Sorghum bicolor*). Esse polipeptídeo possui um alto grau de conservação de domínios de aminoácidos quando comparado com outras proteínas de reserva de monocotiledôneas, como as γ -prolaminas de milho e de Coix (*Coix lacrima-jobi* L.) (de Freitas et al., 1994), além de compartilhar a função e o padrão de expressão espacial e temporal com essas mesmas proteínas. Isso sugere que os genes homólogos codificadores dessas proteínas sofreram desenvolvimento ortólogo quando da especiação dessas gramíneas, sendo originados por diferenciação vertical de um gene oriundo de um ancestral comum.

O promotor do gene que codifica a γ -kafirina possui 494 pares de base (pb) e foi estruturalmente caracterizado por de Freitas e colaboradores (1994). Ele apresenta diversas seqüências regulatórias putativas presentes na extremidade proximal 5' e 2 motivos do tipo TGATC nas posições -192 e -476 pb em relação ao sítio de início da transcrição. Essas regiões são sítios de reconhecimento e acoplamento de fatores de transcrição do tipo GCN4, recrutados como reguladores primários da resposta transcricional à privação de aminoácidos, fenômeno comum em plântulas sem atividade fotossintética que precisam mobilizar proteínas de reserva para a nutrição do embrião (Mishra et al., 2008).

Além dos fatores de transcrição GCN4, possíveis outros elementos que atuam em *cis* em relação ao promotor, dentre eles uma "prolamine box" e os conhecidos TATA e CATC boxes localizados a partir da região proximal -285 pb, estão relacionados à modulação da expressão espacial do gene da γ -kafirina e do gene reporter *gus* em sementes de milho, Coix e sorgo, enquanto elementos responsáveis pela intensidade da expressão se espalham ao longo do restante do promotor (de Freitas et al., 1994) (figura 1).

```

ccgtgtacaacgaagtgtgagtcagccatggtgatctgatatacatagcacacacgacatcacg
aacaagtcatactacattacagagttagtttcaactttcaagtaaaaacaaagtaggccggagagaggac
aataatccttgacgtgtaaagtgaatttacaagccatataatggtatataatcgtttcagtga
gatatcaacaacctgtaaaaggcaacaattgagccacgcaaaattacaagtgagtcctaaataaacctc
acatgctacataaaagtgaatgatgagtcaggtatatactggcaagaactgtagaagctacagtcacgg
tagcaaagaaacacaagaaaatgtgctaataaaagctataaaataaccctcgtacgctatgcacatctcc
atcaccaccactggtcttcattcagcctattaacttatatctactcaagagcagacaagaactcga
cacc

```

GenBank: AJ629151.1 *Sorghum bicolor*.

— GCN4 — BOX Prolamina — TATA BOX — Sinal CAAT

Figura 1: Seqüência do promotor tecido-específico da γ -kafirina de sorgo. As caixas coloridas indicam os sítios de ancoramento dos elementos genéticos envolvidos com o início da atividade transcricional relacionada ao promotor.

A expressão gênica regulada pelo promotor da γ -kafirina não foi detectável no caule e nas folhas de sorgo e de plantas transgênicas de tabaco expressando o gene *gus*, mas foi perceptível no embrião e no endosperma de sementes em formação, especialmente na região do mesocótilo dessas duas plantas, entre 10 e 20 dias após a polinização (DeRose et al., 1996; Mishra et al., 2008).

Um anticorpo marcador de tumores de mama foi estavelmente expresso em sementes de tabaco transgênico a partir da integração de um cassete de expressão contendo sua seqüência codante de 746 pb, correspondente à seqüência codante da porção variável das cadeias leve e pesada da imunoglobulina fusionada ao promotor da γ -kafirina.

Uma estratégia molecular envolvendo a utilização do promotor da γ -kafirina também foi eficiente para expressar o hGH e a pró-insulina humana em sementes transgênicas de tabaco e de milho respectivamente (Leite et al., 2000; de Lucca, 2003). O nível de expressão do hGH recombinante chegou a atingir 0,16% PST nas sementes, e a proteína apresentou a mesma seqüência primária e função de ligação a sítios de receptores celulares quando comparada à molécula nativa (Leite et al., 2000).

1.10) O promotor tecido-específico e o peptídeo sinal da β -conglucina de soja.

A proteína β -conglucina, juntamente com as glicininas, é a globulina mais abundante dentre as proteínas presentes nas sementes de soja (correspondendo entre 24,7 e 45,3% de todo o conteúdo protéico do grão). Essa proteína de reserva pertence à família das globulinas 7S e compartilha domínios estruturais e processamento pós-traducional aos das glutelinas de arroz (Katsube et al., 1999). Sua

função fisiológica primordial é nutrir o embrião nos estágios iniciais de germinação da semente, quando a atividade fotossintética ainda não foi propriamente estabelecida.

A β -conglucina é uma proteína oligomérica de aproximadamente 156 kDa, dotada de três subunidades distintas: as porções α e α' (cada uma com 57 kDa) e β (com 42 kDa). Ela é montada e dobrada na forma de trímeros no Retículo Endoplasmático, e acumulada nos vacúolos de estocagem de proteínas presentes nos cotilédones das sementes (Wadahama et al., 2012).

O estabelecimento de diferentes pontes de hidrogênio e de interações hidrofóbicas entre as subunidades podem levar à formação de trímeros com até seis combinações de subunidades diferentes. Além disso, uma ligação de dissulfeto normalmente é estabelecida entre as subunidades α e α' de diferentes trímeros, algo que ocorre em aproximadamente metade das moléculas da população de β -conglucinas nos vacúolos. Desse processo resultam imensos agregados com massa superior a 720 kDa (Jung et al., 1998).

O tamanho dos complexos das β -conglucinas depende da força iônica e do estado de oxi-redução do ambiente em que se encontram ambas as subunidades (Jung et al., 1998; Wadahama et al., 2012).

Todas as subunidades são sintetizadas como pró-peptídeos nos ribossomos do Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) a partir de mRNAs independentes, codificados cada um pelo seu respectivo gene. Apesar disso, todas as subunidades compartilham os mesmos peptídeos-sinais N-terminais para o endereçamento para os vacúolos. Esses sinalizadores intracelulares são clivados de maneira co-traducional no lúmen do RE e, uma vez maduros e montados, os oligômeros são transportados no interior de vesículas secretadas pelo Golgi para os PSVs (Hofte & Chrispeels, 1992; Wadahama et al., 2012).

A expressão dos genes que codificam cada subunidade segue um padrão tecido-específico e se encontra estritamente regulada temporalmente durante a embriogênese da soja (Chen et al., 1986).

A atividade transcricional associada à expressão da subunidade α' nas sementes de soja é regulada por um promotor de 1156 pb e tende a ser mais rápida do que a das demais subunidades (em geral começa 12 dias após a polinização), embora não sejam detectadas diferenças significativas nos níveis de acúmulo dentre elas (Yamada et al., 2008; Wadahama et al., 2012).

O promotor, por sua vez, é regulado por interações complexas entre seqüências ativadoras ricas em GC localizadas aproximadamente -270 pb a montante do sítio de início de transcrição, além de *trans* ativadores sintetizados durante a maturação dos cotilédones (Chen et al., 1986; Doyle et al., 1986; Yamada et al., 2008).

Pela mesma razão, a presença de quatro repetições do tipo A(A ou G)CCCA entre os nucleotídeos -143 pb e -257 pb também parece estar relacionada à restrição da expressão apenas nas sementes de soja (Chen et al., 1986) (figura 2).

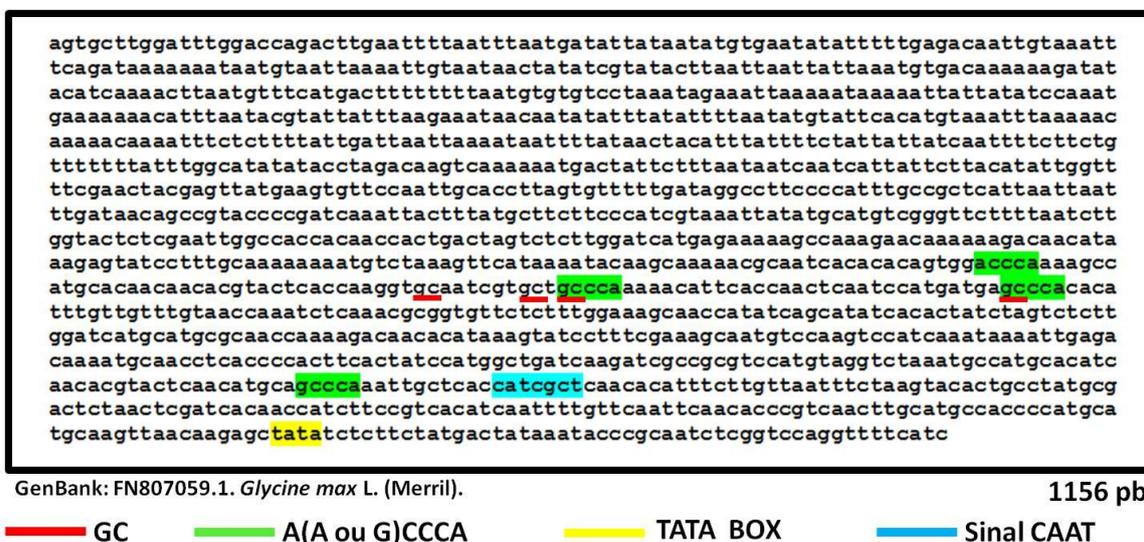


Figura 2: Seqüência do promotor tecido-específico da subunidade α ' da β -conglucina de soja. As caixas coloridas indicam os sítios de ancoramento dos elementos genéticos envolvidos com o início da atividade transcricional relacionada ao promotor.

A eficiência do promotor da subunidade α ' da β -conglucina já foi previamente demonstrada pelo acúmulo de uma delta-zeína de milho, rica em metionina, e de um eficiente anti-hipertensivo, denominado novoquinina, ambos em sementes de soja (Kim & Krishnan, 2004; Yamada et al., 2008).

1.11) Sementes de soja como reatores de fármacos recombinantes.

De maneira geral, plantas cujas sementes encerram altos níveis de proteínas endógenas tendem a apresentar uma melhor relação custo/benefício para a produção de fármacos recombinantes nesses órgãos.

Dentre todos os biorreatores vegetais que utilizam sementes como veículos para o acúmulo estável de proteínas recombinantes, as plantas de soja, juntamente com as plantas de ervilha, apresentam sementes com o maior conteúdo protéico endógeno, capaz de atingir até 40% do seu peso seco. Esse valor é bastante superior quando comparado aos apresentados por outras plantas importantes, como o milho e o arroz (8 e 10%), e excepcionalmente alto em relação ao de folhas de tabaco (1 a 2%) (Stöger et al., 2005; Vianna et al., 2011a).

Aspectos agronômicos, econômicos e de biossegurança envolvendo a produção de sementes em diferentes plantas cultivadas podem ser ilustradas na tabela 5.

Tabela 5: Propriedades agronômicas de diferentes vegetais produtores de sementes com potencial para funcionarem como plataformas de produção de proteínas recombinantes.

Espécie	Biomassa aproximada de sementes (kg/ha)	Conteúdo protéico de sementes (%)	Tipo de polinização	Custo médio de produção (US\$ dólares/ha)	Plataforma comercial
Milho	8670	10	Polinização cruzada	75	Large Scale Biology Corp., Meristem Therapeutics, Maxygen Inc., ProdiGene Inc.
Arroz	7270	8	Auto-polinização	112	Ventria Biosystems Inc.
Cevada	3100	13	Auto-polinização	98	Ventria Biosystems Inc., ORF Genetics, Maltagen
Trigo	2700	12	Auto-polinização	104	
Soja	2600	40	Auto-polinização	163	-
Ervilha	2500	40	Auto-polinização	128	-
Canola	1500	22	Polinização cruzada	238	SemBioSys Genetics Inc.
Cártamo	1500	25	Polinização cruzada	240	SemBioSys Genetics Inc.
Camelina	1100	25	Polinização cruzada	Não comercializada	UniCrop Ltd

Adaptado de Stöger et al., 2005.

Plantas de soja não apenas são uma excelente fonte de proteínas para a alimentação humana e a de gado como também apresentam óleo abundante para a indústria de alimentos e de biodiesel, o que confere à cultura uma posição de destaque dentre todas as leguminosas com potencial para a exploração biotecnológica.

Grandes quantidades de biomassa de soja (incluindo folhas e sementes) podem ser obtidas em menos de quatro meses e a custos relativamente menores do

que os observados para outras espécies leguminosas, como a ervilha, o feijão e o amendoim (Vianna et al., 2011a).

Além disso, conforme mencionado anteriormente, o rendimento agrônômico de plantas de soja cultivadas em casa de vegetação, sob o regime de aumento de fotoperíodo, pode chegar a 1000 sementes por planta, um significativo incremento na escala de produção que pode ser explorado pela indústria farmacêutica (Kantolic & Slafer, 2007; Vianna et al., 2011a) (figura 3).



Figura 3: (A) Cultivo de eixos embrionários de soja em meio com o herbicida Imazapyr[®] (Arsenal) (500 nM), uma semana após o bombardeamento com os plasmídeos p β cong3hGH (4.732 pb) e pAC 321[®] de 8.672 pb (Cyanamid). (B) Plântulas transgênicas de soja contendo o gene *hgh*, dez dias após a germinação. (C) Plantas transgênicas adultas após quatro meses de cultivo sob fotoperíodo de 24 hs de iluminação diária.

1.12) ‘Protein targeting’’: o endereçamento subcelular de moléculas para os vacúolos de estocagem de proteínas.

A quantidade total de uma dada proteína recombinante acumulada em sistema vegetal é um reflexo não apenas da eficiência de sua biossíntese, mas também de seu nível de degradação. Desse modo, a estabilidade protéica após a tradução é um dos elementos cruciais para o sucesso da estratégia molecular de expressão recombinante (Gleba et al., 2005).

O endereçamento para diferentes compartimentos subcelulares é uma etapa essencial quando se trata da obtenção de altos níveis de acúmulo de proteínas recombinantes. Essa prática exerce uma influência direta nas etapas de processamento pós-traducional das proteínas recombinantes, especialmente no que diz respeito ao tipo de glicosilação (Ma et al., 2003).

As células de plantas superiores dispõem de diferentes organelas e compartimentos para o endereçamento subcelular, tais como o núcleo, as mitocôndrias, os plastídeos, os corpos de óleo e os diferentes tipos de vacúolos, além de contarem com o lúmem do RE ou a possibilidade de secreção para o apoplasto.

O mecanismo molecular de endereçamento subcelular mais conhecido envolve o reconhecimento de peptídeos-sinais — fragmentos de 20 a 30 aminoácidos presentes na extremidade N ou C-terminal da proteína-alvo — por complexos específicos de RNA e proteínas, chamados “partículas de reconhecimento de sinal”, ou SRPs. Esses complexos híbridos se ligam temporária e especificamente a um ou mais aminoácidos positivamente carregados que flanqueiam o núcleo apolar do peptídeo-sinal à medida que a proteína nascente é processada no ribossomo. Após a ligação entre a proteína e o SRP, este último transporta a proteína inteira até a superfície de organelas membranosas, onde uma segunda proteína intermediária associada a poros seletivos na membrana — denominada complexo de translocação ou translocon, — reconhece a ambos, o peptídeo-sinal e o seu SRP específico, e abre o poro para internalizar a proteína-alvo. Cumprida essa etapa, o SRP se desprende do complexo e o peptídeo-sinal é clivado, deixando a proteína-alvo no seu destino intracelular (Bohnsack & Schleiff, 2010).

Na ausência de peptídeos-sinais, a proteína sintetizada nos ribossomos livres se acumula no citoplasma, um ambiente geralmente instável e com alta atividade proteolítica, o que não é desejável para grande parte das proteínas (Obembe et al., 2011).

A via secretória é outro destino comum para o acúmulo efetivo de proteínas que requerem glicosilação para a sua atividade bioquímica. A grande maioria dos

processos de modificação pós-traducional ocorre no sistema endomembranar, incluindo o dobramento mediado por chaperonas no RE e a adição de glicanos no Golgi. Se nenhum peptídeo-sinal for adicionado às proteínas que são sintetizadas no RER elas são secretadas para o apoplasto, um espaço intermembranar que possibilita seu acúmulo estável por longos períodos de tempo (Ma et al., 2003; Ma et al., 2005; Paul et al., 2011).

Uma estratégia rotineiramente empregada é a retenção das proteínas no interior do RE, capaz de aumentar sobremaneira as quantidades finais de proteínas recombinantes expressas em plantas. O tetrapeptídeo C-terminal H/KDEL, conforme mencionado anteriormente, é o mais popular sinalizador intracelular para direcionar as proteínas para a via secretória, causando o seu retorno ao RE a partir do Complexo de Golgi. O lúmen de RE é um ambiente praticamente livre de proteases e rico em chaperonas, o que não apenas permite altos níveis de acúmulo de proteínas como também previne a adição da maioria de N-glicanos indesejáveis (Obembe et al., 2011).

As principais organelas envolvidas com o acúmulo de proteínas em células de sementes são os vacúolos, os sítios que representam o ponto final da via secretória nas plantas. Eles podem ser divididos em duas categorias principais: 1) os vacúolos líticos, compartimentos acídicos ricos em hidrolases, cuja função é similar a dos lisossomos de células de mamíferos – a degradação protéica; e 2) os vacúolos de estocagem de proteínas (“protein storage vacuoles” – PSVs), organelas derivadas do RE especializadas na estocagem de grandes quantidades de proteínas de reserva usadas na germinação das sementes (Jolliffe et al., 2005).

Quando o objetivo da estratégia de expressão recombinante é a maximização da quantidade final da proteína de interesse em função da estabilidade após a tradução, os PSVs cotiledonares são os locais preferenciais para o endereçamento subcelular. Essas cisternas ocupam um grande volume celular e propiciam um ambiente pouco oxidativo, que abriga uma alta concentração de inibidores de proteases e, ao mesmo tempo, é pobre em aminopeptidases (Jolliffe et al., 2005; Cunha et al., 2011a; Cunha et al., 2011b; Vianna et al., 2011a).

1.13) O peptídeo-sinal de α -coixina.

A α -coixina (22 kDa) é uma das proteínas de reserva mais abundantes de sementes da poácea *Coix (lacrima-jobi)*. Ela é endereçada para os PSVs de sementes dessa planta mediante a modulação de seu peptídeo-sinal N-terminal característico, codificado por uma seqüência de 62 pb (Ottoboni et al., 1993).

A produção restrita de proteínas recombinantes nos PSVs de sementes de cereais e de dicotiledôneas com o peptídeo-sinal de *C. jobi* vem sendo avaliada, desde a década de 1990, pelo Laboratório de Genética de Plantas do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

Diferentes cassetes de expressão contendo o peptídeo-sinal foram testados para expressar proteínas como o hormônio de crescimento e a pró-insulina humanos – acumulados em sementes transgênicas de tabaco e de milho (Leite et al., 2000; De Lucca, 2003) – além de um fragmento simples de anticorpo anti-câncer de mama e a enzima β -glucuronidase, também expressos em sementes de tabaco (Cançado, 2002; DeRose et al., 1996).

Assim como o peptídeo-sinal da β -conglícinina de soja, o da α -coixina de Coix também é um sinal de endereçamento molecular promissor para a obtenção do acúmulo prolongado e estável de fármacos nos PSVs de sementes.

Nos últimos dez anos, diversas proteínas com variadas estruturas e pesos moleculares foram acumuladas estavelmente nos PSVs de sementes de soja pelo grupo do LTG II. Os promotores tecido-específicos da γ -kafirina e da subunidade α ' da β -conglícinina, em associação com o peptídeo-sinal da α -coixina, possibilitaram níveis de expressão da ordem de 2,9% PST para o hormônio do crescimento humano (hGH). Além dele, essa estratégia possibilitou a expressão da proinsulina humana (Cunha et al., 2011a); do fator de coagulação IX humano – FIX – (0,23% PST) (Cunha et al., 2011b); dos fragmentos de anticorpos monoclonais scFvDIR83D4 e anti-CD18, respectivamente contra câncer de mama (0,93% PST) e anti-reperfusão pós-isquêmica; dos microbicidas anti-HIV Cyanovirin-N (CV-N) (nas suas formas nativa e mutada), Grifithsin (GRFT) e Scitovirin (SV-N), e também dos antígenos para imunoterapia contra diversos tipos de câncer: CTAG, GAGE e PLAC (Vianna et al., 2011a).

Alguns desses fármacos recombinantes foram localizados nos PSVs de sementes transgênicas após sete anos de estocagem à temperatura ambiente, um período de tempo até então inédito, e demonstraram pouca ou nenhuma degradação estrutural, além da função biológica de alguns deles - notadamente o hGH, o FIX e o microbicida CV-N – ter sido detectada (Cunha et al., 2011a; Cunha et al., 2011b; Cunha et al., 2011c).

2) HIPÓTESE

Plantas de soja podem vir a funcionar como veículos eficientes para a expressão e o acúmulo estável de fármacos de importância econômica e social nas sementes?

3) JUSTIFICATIVAS

A importância da estratégia empregada é justificada quando se avalia o papel terapêutico e o potencial econômico encerrados nos biofármacos recombinantes estudados nos próximos capítulos. Doenças como o *diabetes mellitus*, o nanismo e a hemofilia B exercem impactos econômicos e sociais de grande magnitude em todos os setores da sociedade brasileira.

A possibilidade do desenvolvimento, no longo prazo, de linhagens-elite inseridas num contexto de funcionamento como plataformas de produção comercial dessas moléculas — utilizando as mais variadas combinações de promotores tecido-específicos e peptídeos-sinais — necessita primeiramente de estudos preliminares que atestem a viabilidade de diferentes seqüências regulatórias e de estratégias que permitam a expressão estável de fármacos funcionais, além de protocolos eficientes para a purificação e caracterização estrutural de cada uma das proteínas mencionadas em nano escala.

Além disso, o desenvolvimento de alternativas terapêuticas eficientes e de custo mais reduzido serão cruciais para o aumento da sobrevivência e da qualidade de vida dos pacientes num futuro próximo.

O grupo do LTG II do Cenargen possui larga experiência no desenvolvimento e no aperfeiçoamento de processos e produtos biotecnológicos envolvendo a tecnologia do DNA recombinante, notadamente na esfera agrícola. Seus pesquisadores foram pioneiros na elaboração e no aprimoramento de protocolos de transformação genética de diferentes espécies de relevância agrícola, além do desenvolvimento dos primeiros produtos comerciais da biotecnologia vegetal no Brasil.

Nos últimos dez anos, o grupo vem ocupando lugar de destaque na área de “Molecular Farming”, publicando resultados relevantes acerca da obtenção de linhagens transgênicas de soja produtoras de fármacos recombinantes e no aperfeiçoamento da estratégia de direcionamento da expressão gênica para as sementes.

Outro foco de pesquisa recente do grupo é o aperfeiçoamento de protocolos para a análise proteômica em nano escala de sementes transgênicas e convencionais,

em que o perfil de expressão de transgenes e sua influência na expressão gênica global, em uma única semente, podem ser caracterizados a partir de apenas um pedaço do cotilédono, preservando o embrião.

Esses avanços mencionados já estão sendo empregados - os exemplos a seguir atestam essa afirmação - e serão fundamentais para a obtenção de PMPs eficientes, seguros e mais baratos.

4) OBJETIVOS

4.1) Objetivo geral.

O objetivo principal do presente trabalho foi expressar a pró-insulina humana, o hGH e o FIX da coagulação sanguínea humana em sementes de plantas transgênicas de soja.

4.2) Objetivos específicos.

Os objetivos específicos podem ser listados como:

Avaliar os níveis de expressão dessas proteínas nas sementes, proporcionados pelos cassetes de expressão contendo o promotor da γ -kafirina e da subunidade α' da β -conglucina.

Estudar a modulação temporal e avaliar a estabilidade das proteínas recombinantes nas sementes após o armazenamento.

Caracterizar, do ponto de vista subcelular, a compartimentalização dos polipeptídeos nos PSVs e avaliar a eficiência da estratégia de direcionamento subcelular proporcionada pelos peptídeo-sinais de α -coixina e da subunidade α' da β -conglucina.

Caracterizar a estrutura primária N-terminal dos fármacos citados e avaliar as proteínas recombinantes em função de sua atividade biológica.

Capítulo 2

O endereçamento subcelular da pró-insulina humana para os vacúolos de estocagem de proteínas de sementes de soja

1) INTRODUÇÃO

A insulina humana é a proteína responsável pela mediação da absorção de glicose através da ativação de receptores do açúcar presentes na membrana plasmática de hepatócitos e de células musculares. Essas células são capazes de captar moléculas de glicose excedentes na corrente sanguínea para serem estocadas como uma molécula maior e mais complexa, o glicogênio (Goldman et al., 1979).

O hormônio é pequeno, composto por apenas 51 aminoácidos e com um peso molecular de 5,8 kDa, e é secretado como um precursor de 86 aminoácidos pelas células Beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas.

A pró-insulina humana — como o pró-hormônio é chamado — possui uma cadeia polipeptídica simples de 8 kDa e ponto isoelétrico de 5,8. A estrutura completa é estabilizada por três ligações de dissulfeto e organizada em três segmentos distintos: o peptídeo C e as cadeias A e B. O (Cunha, 2008).

O processamento pós-traducional que resulta na liberação do hormônio ativo é catalizado por duas endoproteases, PC1 e PC2, que promovem clivagens nas terminações carboxila dos aminoácidos Arg 32 e Arg 65 da cadeia polipeptídica. O resultado final dessa fragmentação é a separação do hormônio maduro do seu peptídeo conector (Steiner et al., 1996).

A remoção expõe dois pares de aminoácidos básicos nas novas extremidades das cadeias A e B, os quais são posteriormente removidos pela ação de carboxipeptidases adicionais, resultando na produção da insulina madura (Kaufmann et al., 1997)

A insulina humana possui enorme importância médica, uma vez que é utilizada para o tratamento do *diabetes mellitus*, uma doença metabólica causada pela deficiência de secreção de insulina, da ação ineficiente do hormônio na corrente sanguínea, ou de ambos. A consequência direta da doença é a hiperglicemia — excesso de glicose no sangue — que pode comprometer o sistema circulatório, causar deficiência renal, retinopatia e, em casos mais agudos, levar à cegueira e a lesões ulceronas nos pés e mãos entre outras complicações (International Diabetes Federation- IDF, 2011, <http://www.diabetesatlas.org/2011>).

O *diabetes mellitus* possui duas variantes crônicas. O tipo 1 é causado pelo ataque auto-imune das células T do sistema imunológico sobre as células Beta do pâncreas, levando à sua inativação. A consequência direta desse ataque é a deficiência da síntese e da secreção de insulina (Rother, 2007).

O tipo 2 ocorre em função de disfunções dos receptores presentes na membrana celular das células-alvo nos músculos e no fígado, as quais podem resultar em redução da sensibilidade celular à ação da insulina ou ao desenvolvimento gradual de resistência à ação do hormônio (Zimmet et al., 2001).

Apenas pacientes com o segundo tipo de *diabetes mellitus* podem ser curados, através de intervenção cirúrgica. Desse modo, o tratamento e o acompanhamento médico da doença são fundamentais para controlar os níveis de glicose no sangue e aumentar a qualidade de vida dos pacientes. O tipo 1 pode ser tratado com a administração de insulina exógena complementada com uma série de recomendações, tais como dieta controlada, suplementação de drogas orais que diminuam a mobilização de glicose a partir de glicogênio hepático, a prática de exercícios físicos regulares e a injeção de insulina quando a eficácia de medicação oral é reduzida (Adler & Turner, 1999; Cunha, 2008).

Essa patologia é de grande importância social e econômica, uma vez que afeta cerca de 151 milhões de pessoas adultas em todo o mundo (4,6% da população mundial), 13,3 milhões só na América Latina, com a previsão de aumento de incidência da ordem de 148% até 2030 na mesma região (International Diabetes Federation- IDF, 2011, <http://www.diabetesatlas.org/2011>).

Sintomaticamente, apenas a partir da primeira metade da década de 20 do século passado, a insulina destinada ao tratamento do diabetes começou a ser purificada a partir do pâncreas de suínos e bovinos. A proteína apresentava baixa estabilidade, razoável similaridade com a molécula humana e era um carreador em potencial de contaminantes patogênicos, principalmente vírus de mamíferos (Patlak, 2002).

Somente em 1979, portanto quase sessenta anos depois das primeiras tentativas de purificação, numerosos esforços para a produção da insulina humana recombinante em sistemas heterólogos surtiram efeito quando, em 1978, um grupo de cientistas liderado por David Goeddel, da empresa de biotecnologia Genentech (fundada por dois dos três “pais” da engenharia genética: Herb Boyer e Stanley Cohen) e do City of Hope National Medical Center na Califórnia, conseguiu obter quantidades razoáveis da molécula recombinante, produzida em células transgênicas de *E.coli* contendo a seqüência nucleotídica codificadora do hormônio humano integrada ao seu genoma (Goeddel et al., 1979).

Em 1982, foi concedida a liberação da insulina humana recombinante – chamada Humulin[®] - pelo FDA (Food and Drug Administration, <http://www.fda.gov/>), visando sua administração regular em pacientes diabéticos americanos.

Desde então, se intensificaram as pesquisas para o desenvolvimento de drogas recombinantes mais potentes e eficazes, o que levou ao desenvolvimento de diversos produtos alternativos altamente eficientes, como a Humalog[®] (Lilly), a Lantus[®] (Aventis) e a Levemir[®] (Novo Nordisk); além de outros sistemas de administração complementares às injeções subcutâneas, tais como as bombas de hormônio e as insulinas inaláveis Exubera[®] (Pfizer) e AERx iDMS[®] (Novo Nordisk).

Com a ampla concorrência estabelecida dentro e fora dos EUA, e o aumento significativo da oferta de insulina recombinante no mercado, os preços pagos pelos consumidores, nos vinte anos subsequentes ao feito da Genentech, caíram drasticamente em todo o mundo (Kusnadi et al., 1997; Demain & Vaishnav, 2009).

Diversos artigos relatando a produção recombinante aperfeiçoada dessa proteína em bactéria e em outros organismos transgênicos já foram publicados. O problema relacionado à formação de corpúsculos de inclusão bacterianos – agregados protéicos pouco solúveis – quando da expressão maciça de fármacos nessas células, por exemplo, foi contornado com a utilização de um sistema de expressão da pró-insulina fusionada a uma cauda “his-tag” N-terminal, a qual auxiliou o processo de purificação do hormônio (Nilsson et al., 1996; Shi et al., 2006).

O primeiro exemplo de expressão recombinante da pró-insulina humana em sistemas eucarióticos foi realizado por Kjeldsen e colaboradores (1999), os quais utilizaram células de *Pichia pastoris* e *Saccharomyces cerevisiae* para secretar o hormônio ativo em meio de cultura.

A pró-insulina humana também já foi expressa em plantas superiores. Sementes transgênicas de tabaco e milho foram utilizadas para acumular o pró-hormônio em níveis compatíveis com os habitualmente observados por biorreatores vegetais (De Lucca, 2003). O pró-hormônio ativo também foi expresso como uma proteína de fusão com a proteína oleosina em sementes transgênicas de *Arabidopsis thaliana*, num mecanismo engenhoso para a purificação facilitada de frações bioativas da molécula recombinante (Nykiforuk et al., 2006).

Animais transgênicos, como carpas (*Cirrhinus molitorella*) (Zhang et al., 2006) e o salmão (*Salmo salar*) (Wilkinson et al., 2004), também já foram utilizados como reatores eficientes do pró-hormônio (Pennisi et al., 2006).

O desenvolvimento de uma plataforma eficiente para a produção da pró-insulina humana, baseada na compartimentalização do hormônio nos PSVs de sementes transgênicas, possui um grande potencial para reduzir os riscos de

contaminação de pacientes diabéticos com príons e patógenos, além de potencialmente reduzir os custos de produção do fármaco.

Neste trabalho foi utilizado um *cassete* de expressão contendo a seqüência codificadora da pró-insulina humana sob o controle de expressão do promotor tecido-específico da γ -kafirina de sorgo e do peptídeo-sinal da α -coixina de Coix. O plasmídeo pRT-GK-PSC-PIh (4.528 pb), que contém o *cassete* de expressão mencionado, foi introduzido no genoma de plantas de soja via biobalística com o objetivo de levar ao acúmulo estável do pró-hormônio nos PSVs de sementes transgênicas.

2) MATERIAIS E MÉTODOS

2.1) Construção do vetor pRT-GK-PSC-PIh e obtenção do fragmento contendo o gene *ahas*.

Para a construção do vetor de expressão da pró-insulina humana, um fragmento de 483 pb contendo a seqüência codante da proteína e do peptídeo-sinal de α -coixina foi retirado do vetor pRT- PSC-próINS (4.732 pb), com as enzimas *NcoI* e *BamHI*, e inserido no vetor pRT-GK (4.045 pb) previamente digerido com as mesmas enzimas, nos sítios presentes no múltiplo sítio de clonagem, entre o promotor tecido-específico da γ -kafirina e o terminador 35S do vírus do mosaico da couve-flor (35SCaMV), gerando o vetor pRT-GK-PSC-PIh de 4.528 pb (figura 1).

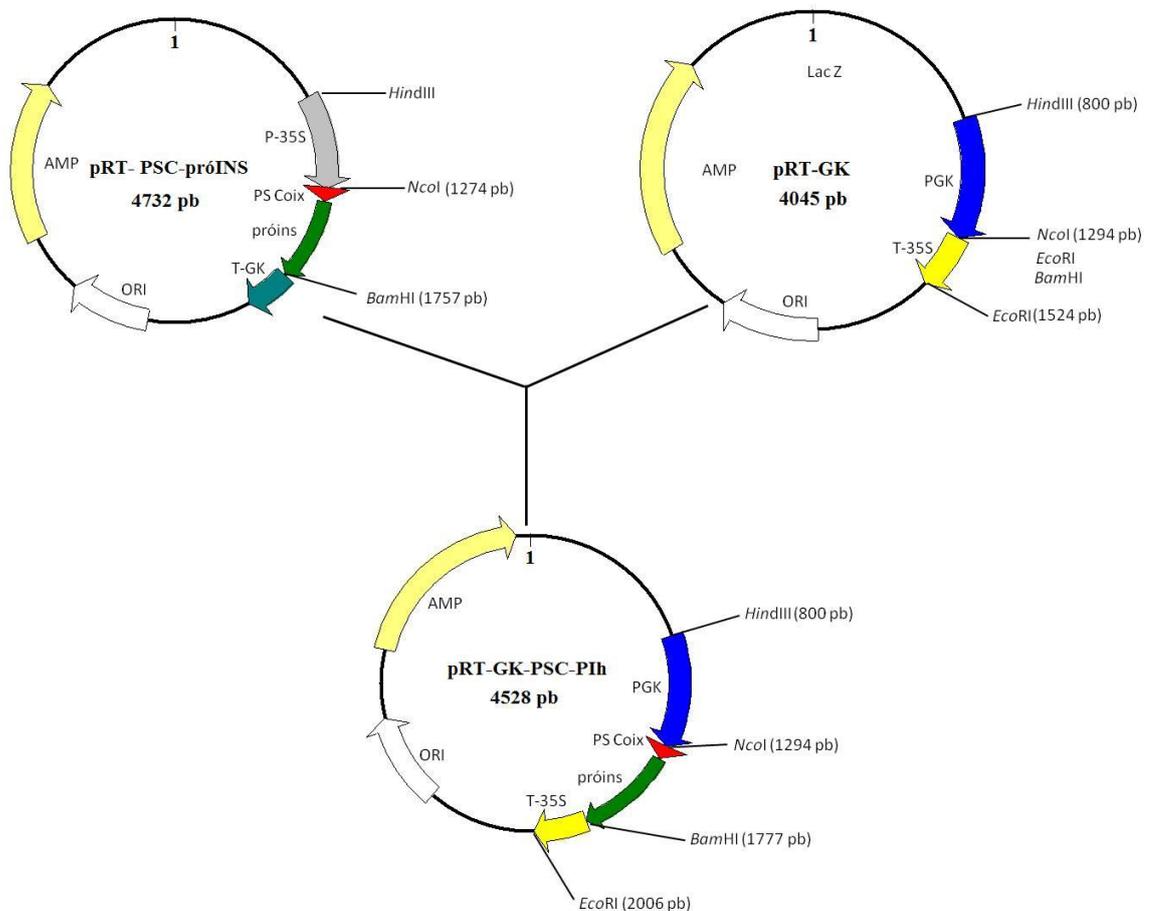


Figura 1: Representação esquemática da construção do plasmídeo pRT-GK-PSC-PIh (4.528 pb).

Com o objetivo de ser utilizado como gene marcador de seleção, o fragmento *ahas* (6159 pb) foi retirado do vetor pAC 321[®] de 8.672 pb (Cyanamid) pela digestão com *PvuII* nas posições 530 e 6.689 pb, liberando o *cassete* contendo o promotor *ahas*, o gene *ahas* e o terminador *ahas*, o qual foi utilizado num sistema de co-transformação com o plasmídeo pRT-GK-PSC-PIh numa frequência de 1:1 (figura 2).

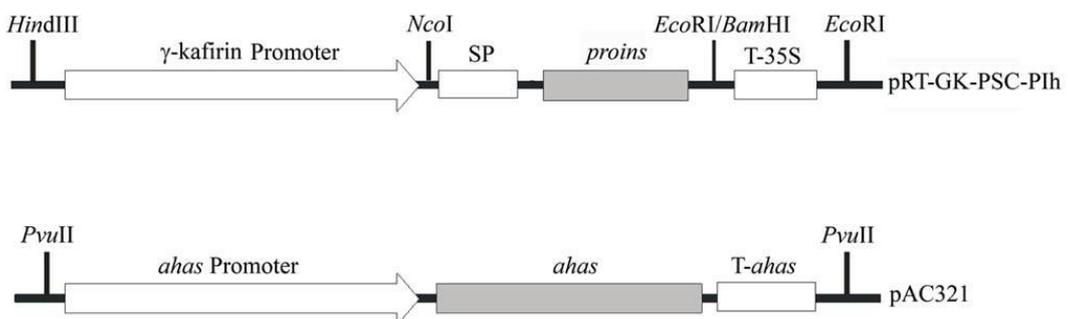


Figura 2: Representação esquemática dos *cassetes* de expressão do plasmídeo pRT-GK-PSC-PIh e do fragmento *ahas* utilizados nos experimentos de bombardeamento de embriões

de soja. A seqüência codificadora da pró-insulina fusionada ao peptídeo-sinal da α -coixina está sob controle do promotor da γ -kafirina e da região 3' do terminador CaMV. A expressão do gene *ahas* é modulada pelo promotor e pelo terminador *ahas* de *Arabidopsis thaliana*.

2.2) Transformação de soja.

2.2.1) Desinfestação de sementes e preparo do material vegetal.

Sementes maduras da cultivar Conquista foram superficialmente desinfestadas em etanol 70% por 1 minuto, seguidas por imersão em 1% de hipoclorito de sódio por 20 minutos e lavadas três vezes em água destilada estéril, permanecendo nessas condições por 16 a 18 horas.

Os eixos embrionários foram removidos das sementes e seus meristemas apicais expostos pela remoção dos primórdios foliares. Os eixos embrionários foram então posicionados em placas de cultura de 5 cm de diâmetro contendo 12 mL de meio de bombardeamento [meio basal de sais MS (Murashige & Skoog, 1962), 3% de sacarose e 0,8% fitagel Sigma, pH 5,7], com a região apical direcionada para cima.

2.2.2) Bombardeamento.

O bombardeamento dos eixos embrionários com o vetor plasmidial pRT-GK-PSC-PIh e o fragmento *ahas* foi conduzido como previamente descrito por Rech e colaboradores (2008).

2.2.3) Indução de multibrotação.

A multibrotação dos meristemas apicais dos eixos embrionário bombardeados foi induzida pela transferência e completa imersão dos mesmos em placa de vidro de 10 cm de diâmetro contendo 15 mL de meio de indução [meio basal de sais MS, suplementado com 10,0 mg/L benzilaminopurina (BAP), 3% de sacarose e 0,6% ágar Sigma, pH 5,7], imediatamente após o bombardeamento.

Após a transferência, os embriões foram acondicionados no escuro, a 28°C, por 16 horas.

2.2.4) Seleção dos explantes.

Após o período de indução, os explantes foram transferidos para um frasco de vidro do tipo "baby food" contendo 20 mL do meio de seleção (MS meio basal de sais,

3% de sacarose, 500 nM do herbicida Imazapyr[®] (Arsenal) e 0,7% de ágar Sigma, pH 5,7) e cultivados a 28°C sob um fotoperíodo de 16 horas (50 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

A partir do momento em que o sistema radicular dos explantes encontrou-se plenamente desenvolvido (depois de cerca de 30 dias), os mesmos foram individualizados em copos plásticos de 7 cm de diâmetro, contendo 0,2 dm³ de solo fertilizado e transferidos para casa de vegetação sob condições de 25°C, umidade relativa de 80% e intensidade luminosa de 350 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, onde permaneceram protegidos por um envoltório plástico transparente na primeira semana de aclimação.

Após a identificação por PCR das plantas efetivamente transformadas, as mesmas foram transferidas para vasos plásticos contendo 5 dm³ de solo fertilizado e isoladas das plantas não transformadas em outra casa de vegetação, sob condições propícias para a produção de sementes.

2.3) Reação em cadeia da polimerase (PCR).

Para a análise de PCR dos eventos potencialmente transformados (R₀) e das progênies, o DNA das plantas selecionadas com o herbicida Imazapyr[®] (Arsenal) foi isolado de discos foliares de acordo com a metodologia de Doyle & Doye (1987), utilizando a solução tamponante CTAB 2X(brometo de cetil-trimetil-amônio).

Cada reação de PCR foi realizada em volume de 25 μL , contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 160 μM de cada dNTP, 200 nM de cada primer (pCons5 senso CCCTCGTACGCCTATGCAC e pCons3 antisenso CTTATCTGGGAAGTACTCACAC – que anelam respectivamente no promotor da γ -kafirina e no terminador 35S e resultam num “amplicon” de 701 pb), 2U de *Taq* polimerase (GIBCO BRL) e cerca de 20 ng de DNA plasmidial.

O “mix” foi coberto com óleo mineral, desnaturado por 5 minutos a 95°C em um termociclador (MJ thermal cycler-USA), e o DNA amplificado por 35 ciclos (95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 73°C por 1 minuto) com um ciclo final de extensão de 7 minutos a 72°C, num termociclador DNA Termocycler (MJ Peltier, MJ Research).

A reação foi aplicada em gel de agarose 1% e visualizada em luz ultra-violeta (UV) por coloração com brometo de etídio 0,5 $\mu\text{g/mL}$.

2.4) Extração de proteínas solúveis totais e análise por western blot.

As plantas R₀ transgênicas foram cultivadas em casa de vegetação e suas sementes foram colhidas, estocadas à temperatura ambiente e analisadas, após sete anos, para se avaliar a expressão da pró-insulina recombinante.

Proteínas solúveis totais (PST) de sementes R₁ foram isoladas através da maceração das sementes em nitrogênio líquido e a adição de 300 µL de tampão PBS 1X (Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,7 mM, NaCl 140 mM e KCl 2,7 mM) para cada mg de tecido fresco. A concentração de PST foi determinada utilizando-se o protocolo do kit Bio-Rad protein assay kit[®] (Bio-Rad, USA).

As amostras (20 µL) foram incubadas a 95°C por 10 minutos em tampão de eletroforese (SDS 20%, Tris-HCl 0,5 M, β-mercaptoetanol 10%, glicerol 20% e azul de bromofenol 0,04%) numa relação 1:1 e resolvidas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, “stacking gel” 5% e “resolving gel” 15%). As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose C Extra[®] (Hybond) utilizando o transblot SD-eletrotransfer[®] (Bio-Rad) sob 100 mA constantes e 15 V por 50 minutos.

As membranas foram bloqueada com 50 mL de solução de leite em pó 5% em TBS 1X (Tris base 0,02 M e NaCl 0,137 M, pH 7,6) por 16 horas a 4°C e incubadas por 4 hs à temperatura ambiente com o anticorpo policlonal anti-pró-insulina produzido em coelho, numa diluição de 1:3000 (4 ng/ µL) em 10 mL de solução de bloqueio.

Após lavagem com PBS 1X (Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,7 mM, NaCl 140 mM e KCl 2,7 mM), os blots foram incubados em solução anti-soro anti-IgG de coelho (produzido em cabra) conjugado com fosfatase alcalina (Bio-Rad), numa diluição de 1:5.000 (0,2 ng/ µL). Os blots foram revelados com o substrato quimioluminescente CSPD[®] (Applied Biosystems) de acordo com as indicações do fabricante, utilizando-se filmes fotográficos Kodak Standard[®] (Kodak).

2.5) Análises de imunocitoquímica.

Sementes maduras transgênicas R1 de linhagens pró-insulina foram cortadas em secções de 2 mm de comprimento e fixadas por 4 horas a 4°C em solução contendo paraformaldeído 2% e glutaraldeído 0,5% em tampão cacodilato 0,05 M, pH 7,2.

Após a fixação, os segmentos foram lavados no mesmo tampão por três vezes - cada uma por 15 minutos - e desidratados por 5 horas com etanol sob concentrações crescentes de 30, 50, 70 e 100%, 1 hora para cada concentração, a -20°C sob vácuo.

Após a desidratação os segmentos foram infiltrados durante 3 horas com soluções de concentrações crescentes de resina LR White[®] (SPI Supplies), diluída em etanol, variando de 30% a 100%, e 8 horas em resina pura. A inclusão foi realizada com a imersão dos pedaços de sementes em solução contendo 1,98 g de benzoilperóxido e 5 gotas do acelerador de polimerização da própria resina em 100 mL de resina LR White[®] pura, e incubados a 4°C sob luz UV por 72 horas.

Secções ultrafinas (50 nm de espessura) foram obtidas com ultra-micrótomo e coletadas em telas de níquel de 400 mesh. As telas foram incubadas por 1 hora, à temperatura ambiente, em tampão PBST 1X (Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,7 mM, NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Tween 20 0,5% e albumina sérica bovina 2%), e por 2 horas com o anticorpo anti-pró-insulina policlonal produzido em coelho (dil. 1: 10 - 5 ng/μL), diluídos em PBST 1X.

Após lavagem por 1 hora em PBS 1X (Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,7 mM, NaCl 140 mM e KCl 2,7 mM), as telas foram incubadas em solução contendo proteína A conjugada com ouro (Gold Conjugate Protein A[®] – SPI Supplies) numa diluição de 1 : 20 (20 nM) por 2 horas à temperatura ambiente.

Após lavagem por 1 hora em PBS 1X, as amostras foram secas por 24 horas, contrastadas com acetato de uranila 1% em PBS 0,1 M e observadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss EM 900[®] (Carl Zeiss).

3) RESULTADOS

Após o bombardeamento de 450 eixos embrionários, duas linhagens transgênicas R₀ foram obtidas, contendo ambos os transgenes da pró-insulina humana e o *ahas*. Elas foram denominadas: 194 e 195. Também foram obtidas linhagens transgênicas contendo apenas o gene *ahas*, mas estas não foram caracterizadas posteriormente.

A presença do gene da pró-insulina humana no genoma de sementes R₁, obtidas por autofecundação, foi detectada por PCR (figura 3). Essas sementes foram mantidas sob temperatura ambiente por aproximadamente sete anos.



Figura 3: Reação de PCR demonstrando a amplificação de fragmentos internos do gene da pró-insulina humana (aproximadamente 701 pb) em sementes R₁ de soja. As linhas 1 e 2 correspondem a sementes transgênicas das linhagens 194 e 195 respectivamente; a linha 3 a uma semente não-transgênica; a linha 4 ao controle interno com água e ausência de DNA genômico, e a linha 5 ao plasmídeo pRT-GK-PSC-PIh.

A expressão da pró-insulina em sementes R₁, pertencentes às linhagens 194 e 195, foi confirmada por western blot utilizando-se extratos protéicos totais obtidos de sementes transgênicas analisadas previamente por PCR (figura 4).

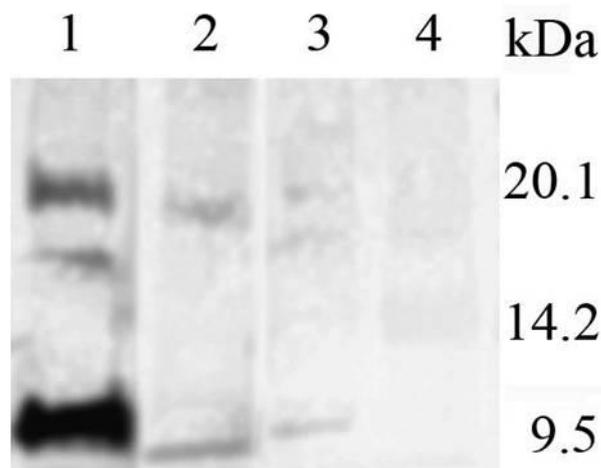


Figura 4: Western blot de sementes de soja R₁ demonstrando a expressão da pró-insulina recombinante. A linha 1 corresponde a 40 ng da proteína recombinante purificada de *Escherichia coli*; as linhas 2, 3 e 4 correspondem, respectivamente, a extratos protéicos totais (100 µg) de sementes das linhagens 194, 195 e de uma semente não-transgênica. Todos os pesos moleculares foram estimados utilizando o marcador de peso molecular Low Range[®] (Sigma, USA).

A localização espacial da pró-insulina recombinante nas sementes maduras, promovida pelo peptídeo-sinal da α -coixina, foi checada por ensaios de imunocitoquímica (figura 5). Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de secções de 50 nm de espessura, incubadas com um anticorpo específico anti-pró-insulina, demonstraram que o acúmulo do pró-hormônio nas sementes transgênicas das linhagens 194 e 195 ficou majoritariamente associado aos PSVs, como evidenciado pela presença das pertículas de ouro de 20 nm (pontos pretos indicados pelas setas). Não houve acúmulo significativo no citoplasma, no apoplasto nem nos grãos de amido.

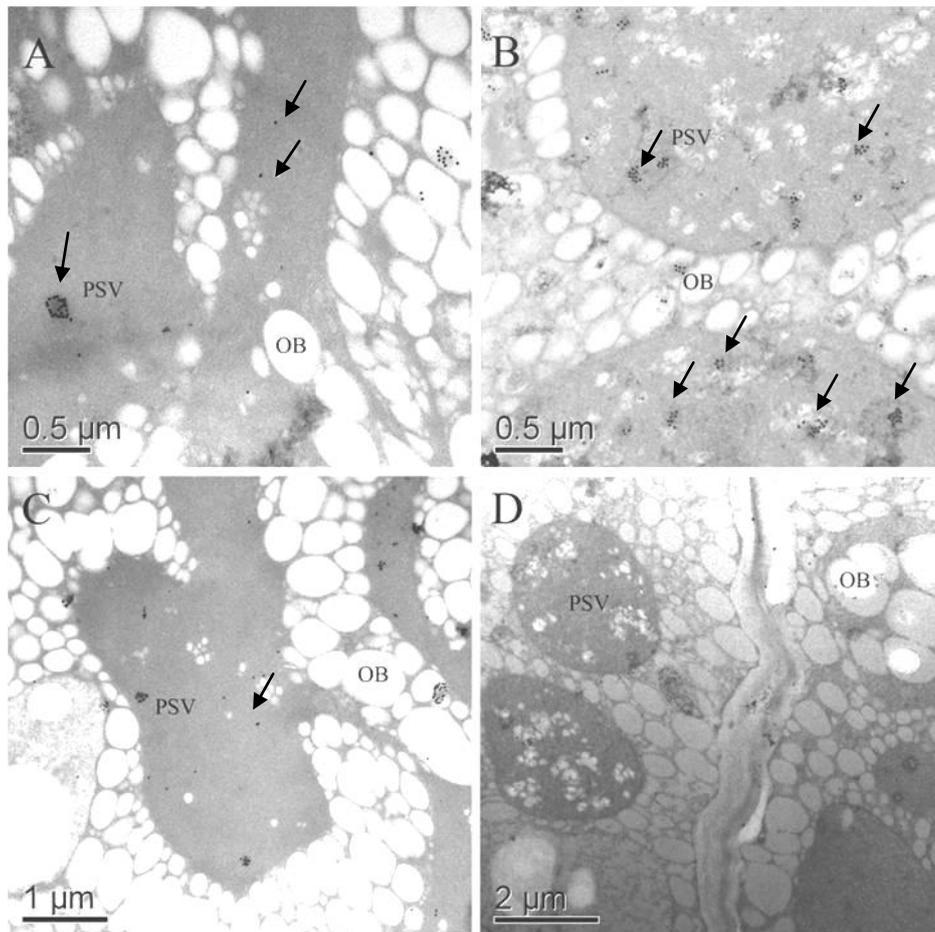


Figura 5: Secções cotiledonares ultrafinas de sementes de soja demonstrando o acúmulo subcelular da pró-insulina recombinante em sementes transgênicas R1 de soja. PSV = “Protein storage vacuoles” –vacúolos de estocagem de proteínas; OB =”Oil bodies” – corpos de óleo. As imagens A e B correspondem a sementes transgênicas da linhagem 194; C a uma semente da linhagem 195 e D a uma semente não-transgênica.

4) DISCUSSÃO

Nos experimentos de transformação genética de soja foram obtidas duas linhagens transgênicas diferentes contendo o gene da pró-insulina. A eficiência de transformação genética foi de 0,44%, abaixo do normalmente alcançado quando da utilização do protocolo elaborado pelo grupo do LTG II.

Esse valor pode ser atribuído tanto a variações nas condições de bombardeamento e da viabilidade das sementes utilizadas nos experimentos, quanto na manipulação dos explantes em cultura de tecidos, uma vez que qualquer diferença mínima, desde a pressão de coluna de gás hélio do acelerador de partículas, até mesmo no lote do herbicida utilizado para a seleção dos explantes, pode reduzir o rendimento do protocolo.

Nós observamos que a integração dos transgenes no genoma da soja foi estável, uma vez que as progênies R₁ de ambas as linhagens 194 e 195, obtidas em casa de vegetação, herdaram cópias dos transgenes.

A expressão da pró-insulina humana em sementes maduras das duas linhagens transgênicas foi detectada por western blot. As posições relativas de migração eletroforética das amostras mostraram que o peso molecular das bandas associadas ao pró-hormônio foram de aproximadamente 9,5 kDa quando comparadas ao marcador de peso molecular e à própria proteína recombinante purificada de bactéria utilizada como controle positivo. Outras bandas, de aproximadamente 20 kDa, também foram detectadas tanto no controle positivo quanto nos extratos de sementes transgênicas. Provavelmente esse resultado indica a ocorrência de dimerização protéica, algo comum quando ocorre baixa redução de grupamentos sulfidríla e de aminoácidos expostos das proteínas no gel desnaturante.

Além disso, a análise do extrato da linhagem transgênica 194 apresentou uma banda ligeiramente abaixo da posição do controle positivo (9,5 kDa), inclusive com redução correspondente na posição de migração do seu próprio dímero. Essa alteração no perfil de migração eletroforética pode ser consequência de remoção incorreta do peptídeo-sinal (quando há a retirada de resíduos da extremidade N-terminal da proteína juntamente com o tag) (Hjernø, 2006). Outra possibilidade, talvez a mais provável, é a de que houve uma ligeira degradação estrutural de indivíduos da população do pró-hormônio recombinante nessa amostra, o que explicaria a diminuição do peso molecular em ambas as posições.

As análises de imunocitoquímica de secções cotiledonares demonstraram que o peptídeo-sinal da α -coixina endereçou corretamente a pró-insulina para os PSVs das sementes transgênicas. A pró-insulina recombinante foi detectada de maneira restrita

ao lúmem dos PSVs e aos corpos de óleo, ficando indetectáveis em sementes não transgênicas.

Esse resultado corrobora a expressão a nível temporal e espacial esperada pela adoção da estratégia molecular adotada neste trabalho. Nós utilizamos o promotor tecido-específico da γ -kafirina associado ao peptídeo-sinal da α -coixina para restringir a expressão do gene da pró-insulina aos PSVs das sementes, de maneira semelhante àquela empregada pelo grupo do CBMEG para acumular o hGH em sementes transgênicas de tabaco (Leite et al., 2000).

As progênes de ambas as linhagens foram estocadas à temperatura ambiente por sete anos, e a detecção da pró-insulina recombinante em ambas, com pouco ou nenhum sinal de possível degradação, demonstra que a expressão nas sementes e o endereçamento subcelular para os PSVs foram eficientes para promover a estabilidade pós-traducional ao nível de síntese/acúmulo do pró-hormônio.

Aparentemente, esta estratégia molecular simples de expressão de genes em sementes minimiza o nível de degradação de proteínas recombinantes e permite sua estocagem sem custos e por longos períodos de tempo. A detecção da pró-insulina humana após sete anos é o exemplo de acúmulo mais estável já demonstrado para um fármaco recombinante, mesmo quando comparado aos proporcionados por diferentes sistemas de expressão recombinante procarióticos e eucarióticos (Fiedler & Conrad, 1995; Stöger et al., 2000; Larrick & Thomas, 2001; Ramírez et al., 2001).

Nós acreditamos que quantidades significativamente maiores de proteínas recombinantes podem ser obtidas utilizando esta estratégia se elas forem extraídas imediatamente após a colheita das sementes. Para corroborar esta hipótese, tentamos germinar as sementes estocadas a fim de que elas pudessem reiniciar o ciclo de produção, mas todas perderam seu poder de germinação devido às condições desfavoráveis de armazenamento.

Capítulo 3

Expressão recombinante do hormônio do crescimento humano (hGH) funcional em sementes transgênicas de soja

1) INTRODUÇÃO

O hormônio do crescimento humano (hGH), também conhecido como somatotropina, é uma proteína constituída por 191 aminoácidos e estabilizada por duas ligações de dissulfeto. Ele possui uma massa molecular de aproximadamente 22 kDa e ponto isoelétrico aproximado de 5,3, e é sintetizado, estocado e secretado pelas células somatotrópicas da parte anterior da glândula pituitária (Bidlingmaier et al., 2010).

O gene que codifica o hGH se localiza no locus *17q24.2* do cromossomo 17 e possui uma seqüência codificadora de 654 pb.

Essa proteína possui grande importância médica, uma vez que desempenha um papel fundamental no ciclo celular e no crescimento de células somáticas através de seu efeito amplo sobre o metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídeos (Filikov et al., 2002)

Mutações genéticas são as principais causas da ocorrência do nanismo hipopituitário pediátrico, moléstia caracterizada pela ausência ou baixa produção do hormônio na infância e na adolescência (Hindmarsh & Brook, 1987; Cunha, 2008; Bidlingmaier et al., 2010).

Apesar dos riscos implícitos na utilização de drogas purificadas do sangue ou dos órgãos de mamíferos, até 1985 praticamente todo o hGH disponível para o tratamento de nanismo e de uma série de doenças associadas à deficiência do hormônio era obtido pela extração e purificação da proteína de cadáveres humanos ou da glândula pituitária de macacos (Allen, 2006).

O cancelamento comercial do produto purificado da glândula de mamíferos ocorreu simultaneamente ao aumento do número de casos da doença neurodegenerativa de Creutzfeld-Jacob, associada à presença de príons presentes em amostras mal processadas do hormônio (Houdebine, 2009).

Espelhados no sucesso inicial da produção recombinante da pró-insulina em bactérias, e como não havia alternativa tecnológica e economicamente viável para o tratamento eficiente do nanismo hipopituitário pediátrico, cientistas de diversos grupos de pesquisa concentraram esforços para a síntese recombinante do hGH.

Em 1979, pesquisadores da mesma Genentech conseguiram clonar o gene do hGH e expressá-lo em células de *E.coli* pela primeira vez. Dessa maneira, o hormônio se tornou a terceira proteína-fármaco produzida em um organismo transgênico, obtida apenas 1 ano após a síntese recombinante da pró-insulina derivada de bactéria (Fiddes et al., 1979; Goeddel et al., 1979).

Com a aprovação comercial do hormônio recombinante em 1985, um novo fenômeno de produção foi experimentado pela indústria farmacêutica, quando inúmeras drogas injetáveis à base de hGH sintetizado em bactéria foram produzidas a nível comercial. Dentre elas, as mais populares são a Nutropin[®] (Genentech), a Humatrope[®] (Lilly), a Genotropin[®] (Pfizer), a Norditropin[®] (Novo), o Saizen[®] (Merck Serono) e o Onmitrope[®] (Sandoz).

A produção recombinante do hormônio humano em sistemas bacterianos está associada a altos níveis de expressão – normalmente de 6 a 10% PST – podendo atingir até 23% PST quando o hormônio é sintetizado como um proteína de fusão associada a outra proteína altamente estável como o fator alfa de necrose tumoral humana (Chang et al., 1987; Shin et al., 1998; Apte-Deshpande et al., 2009).

Os altos níveis de expressão do hGH, experimentados desde o início do desenvolvimento dos primeiros reatores microbianos, foram um dos principais fatores responsáveis pelo decréscimo considerável dos custos do tratamento do nanismo e de outros distúrbios do crescimento humano.

O nanismo é considerado uma doença rara pelo Human Growth Foundation (<http://www.hgfound.org/>) – afeta menos de 200.000 pessoas na população americana – mas o seu tratamento ainda é caro, mesmo utilizando a droga de origem bacteriana. Estima-se que o custo anual para o tratamento de uma criança de 30 kg que receba injeções semanais de hGH numa dosagem de 0,18 a 0,30 mg/kg esteja em torno de 15.000 a 20.000 US\$, o que sinaliza para a necessidade do desenvolvimento de plataformas de produção recombinante mais eficientes e que reduzam ainda mais os custos do medicamento (Allen, 2006).

A principal causa do alto custo de produção do hGH bacteriano ainda é a freqüente formação de corpúsculos de inclusão compostos pelo hormônio associado a outras proteínas da própria bactéria. Esses aglomerados requerem desnaturações caras para a solubilização do hGH, além da renaturação da proteína – algo que reduz a eficiência de recuperação de moléculas viáveis – a fim de garantir sua função biológica (Demain & Vaishnav, 2009).

Aumentos adicionais nos custos de produção do hGH são oriundos das sucessivas etapas de purificação para evitar a presença de endotoxinas bacterianas

no produto final, e também da necessidade de estocagem das células produtoras em ambiente estéril (Daniell et al., 2001; Ma et al., 2003; Demain & Vaishnav, 2009).

O aperfeiçoamento das estratégias de expressão do hGH em bactéria foram importantes para a redução do custo final do produto ao consumidor. A purificação do hormônio secretado para o periplasma de células de *E. coli* se mostrou eficiente para a recuperação da molécula com até 90% de pureza (Becker & Hsiung, 1986). Bactérias como o *Bacillus subtilis* também já foram testadas para a produção em larga escala da molécula (Franchi et al., 1991; Özdamar et al., 2009).

Dados estatísticos, claramente subestimados, apontam para a existência de cerca de 10.000 pacientes que sofrem com o nanismo hipopituitário pediátrico no Brasil. O custo médio para o tratamento de um paciente com a versão aguda da doença, mediante a aplicação de doses recorrentes do hormônio recombinante, é de aproximadamente 4.000 reais/mês. De qualquer modo, a demanda anual do Ministério da Saúde é de cerca de um milhão de doses importadas do hormônio, a um custo de 15 milhões de dólares (Revista Fapesp, Dezembro/02, número 82).

Sistemas eucarióticos já foram utilizados para a biossíntese do hGH recombinante. Células transgênicas de levedura foram capazes de expressar um gene sintético codificador do hormônio, atingindo um rendimento de produção de mais de dez moléculas recombinantes por célula transformada (Tokunaga et al., 1985).

Larvas de bicho-da-seda (*Bombyx mori*) e células de inseto infectadas por baculovirus com genoma engenheirado geneticamente também conseguiram sintetizar o hormônio bioativo (Kadonookuda et al., 1995; Cholin et al., 1996).

Resultados semelhantes foram observados por Rincon-Limas e colaboradores (1993) quando utilizaram células de ovário de hamsters chineses para secretar duas isoformas do hGH, com 20 e 22 kDa, em meio de cultura. Ambas as moléculas foram eficientes para promover a diferenciação de células precursoras em adipócitos viáveis.

A produção do hGH em mamíferos transgênicos se mostrou interessante uma vez que, freqüentemente, permite a produção abundante da molécula. Camundongos e cabras transformadas por um vetor viral secretaram o hormônio no leite sob concentrações superiores a 10% PST (Sanchez et al., 2004).

Linhagens homozigotas de camundongos transgênicos, cujo genoma foi manipulado para superexpressar a seqüência codificadora do hGH sob o controle do promotor da β -actina de galinha, atingiram um rendimento produção de até 17 μ g do hormônio por mL de leite (von Waldthausen et al., 2008).

O cenário ganha maiores proporções quando animais de grande porte funcionam como reatores do hGH. Vacas transgênicas foram capazes de expressar 5 g de hGH por litro de leite ordenhado (Salamone et al., 2006). Rendimentos

comparáveis a esse foram observados em porcas (25 ng por mL de leite) (Hens et al., 2000) e coelhos (50 µg por mL de leite e 0,6 ng por mL de sangue) (Limonta et al., 1995).

A expressão recombinante do hGH em plantas já foi alcançada por diversos grupos de pesquisa. Altos níveis de expressão do hGH já foram alcançados em sistema vegetal, como o acúmulo de 8% e 10% (PST) do hormônio respectivamente nos cloroplastos de folhas de *Nicotiana tabacum* e no apoplasto de células de folhas de *Nicotiana benthamiana* (Staub et al., 2000; Gils et al., 2005).

Sementes foram utilizadas como reatores do hGH pela primeira vez em 2000, quando Leite e colaboradores obtiveram sementes de tabaco expressando estavelmente o hormônio (0,16% PST).

A comparação simultânea entre diversos sistemas vegetais de expressão recombinante do hGH demonstrou menor nível de degradação proteolítica e maior acúmulo do hormônio nas sementes de milho e soja do que nas folhas e em cultura celular de tabaco (Russell et al., 2005). Nesse trabalho, as sementes de soja de quatro linhagens transgênicas obtidas por biobalística continham o gene do hGH sob o controle do promotor constitutivo CaMV 35S e resultaram em um nível máximo de expressão de 0,0008% PST.

Recentemente, o hGH biologicamente ativo foi obtido a partir da expressão transiente em folhas de *N. benthamiana* infectadas por vírus transgênicos. O hormônio recombinante foi utilizado para estimular o aumento de peso camundongos hipofisectomizados, atingindo níveis de até 1,7 g/dia (Rabindran et al., 2009).

O objetivo deste trabalho foi expressar o hGH em sementes de soja sob o controle do promotor da subunidade α da β -conglucina e do peptídeo-sinal da α -coixina.

2) MATERIAIS E MÉTODOS

2.1) Construção do vetor plasmidial de expressão em sementes p β cong3hGH.

O fragmento de 740 pb contendo a sequência codificadora do hGH maduro e o peptídeo-sinal da α -coixina de *C. lacryma-jobi* (PShGH) foi removido do vetor de expressão pPGK-hGH (Leite et al., 2000) com as enzimas *Nco*I e *Bam*HI e inserido no vetor contendo o promotor e o terminador da subunidade α da β -conglucina (Imoto et al., 2008), gerando o vetor plasmidial de expressão p β cong3hGH (4.732 pb) (figura 1).

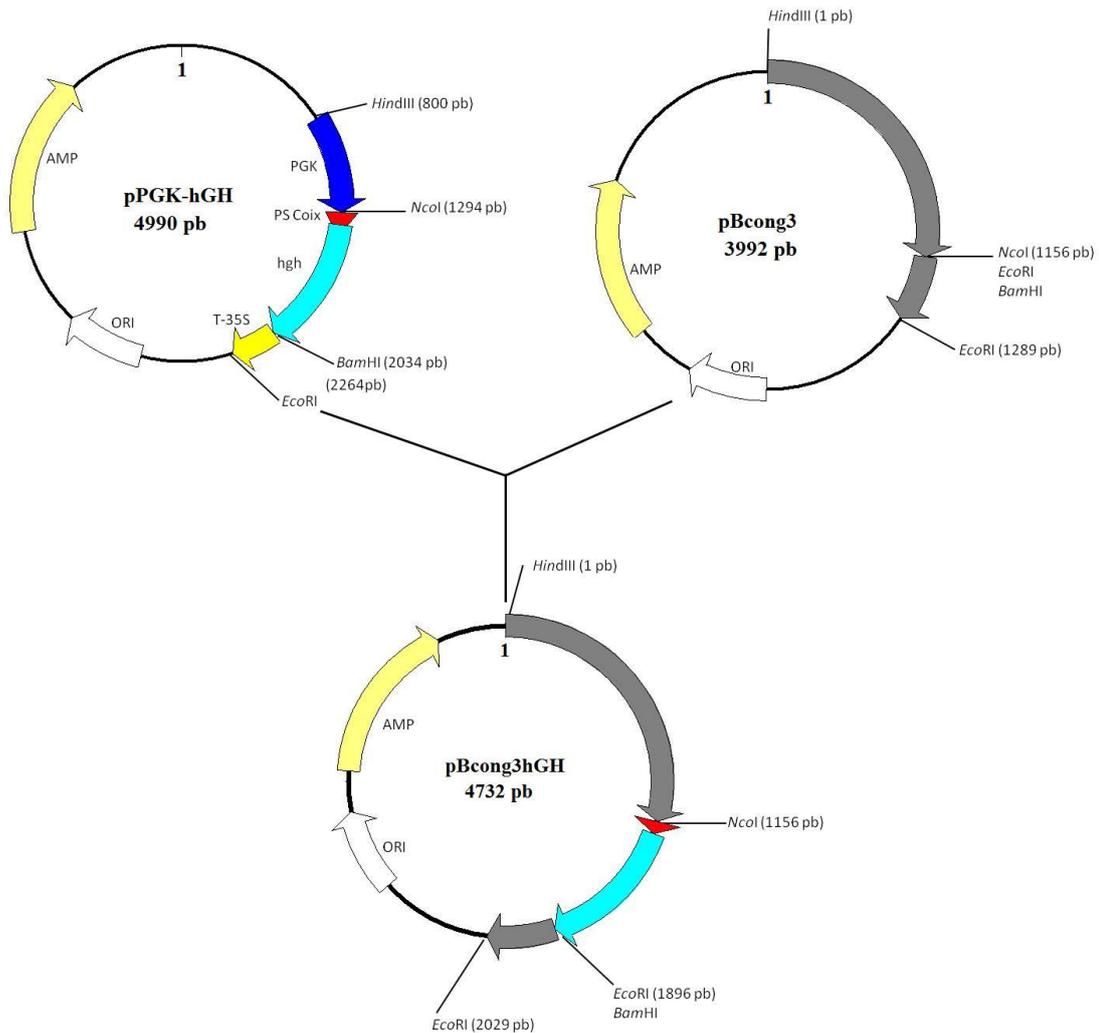


Figura 1: Representação esquemática da construção do plasmídeo pBcong3hGH (4.732 pb).

Esse plasmídeo foi utilizado nos experimentos de transformação genética de soja segundo um protocolo de co-transformação com o vetor pAC 321 (8.672 pb) (figura 2), que contém o gene mutado *ahas* de *Arabidopsis thaliana* sob controle do promotor e do terminador *ahas*. A expressão do gene mutante *ahas* confere tolerância ao herbicida Imazapyr® (Arsenal), utilizado como agente de seleção de eventos transformantes em meio de cultura (Aragão et al., 2000; Rech et al., 2008).

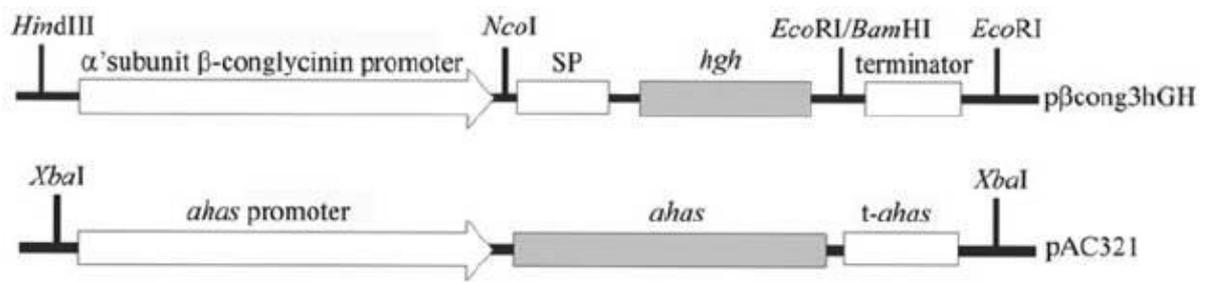


Figura 2: Representação esquemática dos cassetes de expressão dos plasmídeos pβcong3hGH e pAC 321 utilizados nos experimentos de transformação genética de embriões de soja via biobalística. O gene do hGH (*hgh*) foi fusionado ao peptídeo-sinal da α-coixina (SP) sob o controle do promotor e do terminador da subunidade α da β-conglicinina. O cassete de expressão do pAC 321 contém o gene marcador de seleção *ahas* de *A. thaliana* sob o controle promotor e do terminador *ahas*.

2.2) Transformação genética de soja.

Os meristemas apicais de eixos embrionários de soja (cultivar BR 16) foram co-bombardeados com os vetores pβcong3hGH e pAC 321 numa relação de 1:1 segundo o protocolo previamente descrito (Aragão et al., 2000; Rech et al., 2008). Os processos de preparação de material vegetal, bombardeamento, cultivo e seleção de explantes e regeneração de plantas adultas in vitro foram realizados como descrito anteriormente no capítulo 2.

As plantas transgênicas R₀ obtidas foram cultivadas em casa de vegetação para a maximização da produção de sementes.

2.3) Extração de DNA e reação em cadeia da DNA Polimerase (PCR).

O DNA genômico das plantas transgênicas R₀ e de sementes maduras e secas foi extraído conforme o protocolo proposto por Bonfim e colaboradores (2007). As reações de amplificação por PCR e a resolução de *amplicons* por eletroforese em gel de agarose foram realizadas como já mencionado previamente no capítulo 2. Os *primers* HGH 273 senso (ATCCAACCTAGAGCTGCTCC) e HGH 581 antisenso (CCTTGTCATGTCCTTCC), e AHAS P124 senso (ACTAGAGATTCCAGCGTCAC) e AHAS 500 antisenso (GTGGCTATACAGATACCTGG) foram utilizados para a amplificação de fragmentos de 308 e 624 pb respectivamente. Esses fragmentos são correspondentes à amplificação de segmentos internos dos genes *hgh* e *ahas*.

2.4) Análise de plantas por *Southern blot*.

O DNA genômico de plantas transgênicas R₁ das linhagens 3, 9 e 19 foi isolado de acordo com o protocolo estabelecido por Dellaporta e colaboradores (1983).

Cerca de 15 µg de DNA genômico foram digeridos com a enzima *Hind* III (150 unidades), separados em gel de agarose 1% e transferidos para uma membrana de nylon Hybond[®] N + (Amersham Biosciences, USA). O fragmento de 740 pb relativo à fusão do peptídeo-sinal de α-coixina e do gene *hgh* foi utilizado como sonda e marcado com α³²P dCTP (3000 Ci/mol) usando o kit de marcação Ready-To-Go DNA Labeled[®] (GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante.

A pré-hibridização e hibridização, as lavagens e a detecção foram conduzidas como descrito por Sambrook e Russell (2001).

2.5) Análise por RT-PCR.

Sementes transgênicas imaturas R₂, colhidas 60 dias após a polinização, foram analisadas para a presença de transcritos primários do gene *hgh*.

Os RNAs totais de um *pool* de sementes verdes (250 mg) foram isolados segundo o kit Micro-to-Midi Total RNA Purification System[®] (Invitrogen, USA). O DNA genômico remanescente foi eliminado pela digestão das amostras de RNA pela ação de 2 U de DNase 1[®] (Ambion). Os cDNAs foram sintetizados a partir de 2 µg de RNA total, utilizando-se o kit SuperScript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase[®] (Invitrogen) conforme as recomendações do fabricante.

Após a construção dos cDNAs, foram realizadas reações de PCR conforme descrito anteriormente, utilizando-se 1,0 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, USA) e cada *primer* (HGH 273 e HGH581), numa concentração final de 0,4 nmol/L, e dNTPs (125 µmol/L) diluídas em tampão para PCR (1X) (Invitrogen, USA).

2.6) Análises por western blot.

Para a análise da expressão do gene *hgh* a nível traducional, proteínas solúveis totais foram extraídas de folhas, caules, flores, raízes e sementes de plantas transgênicas. Aproximadamente 200 mg de cada tecido foram macerados em nitrogênio líquido, e cada grama de pó foi homogeneizado em 3 mL de tampão PBS 1X (Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,7 mM, NaCl 140 mM e KCl 2,7 mM, pH 7.2). Os extratos foram imediatamente homogeneizados por vortexação por 4 h a 4°C e

centrifugados a 10.650 g por 40 minutos. O sobrenadante aquoso foi coletado e o pellet foi ressuspensão em 3 mL adicionais de tampão PBS 1X, homogeneizado e centrifugado nas mesmas condições mencionadas previamente. Esse processo foi repetido mais três vezes para aumentar a recuperação de PST. Os sobrenadantes foram juntos numa única amostra e a concentração de PST determinada por ensaio de acordo com Cunha et al (2011c).

Aproximadamente 100 µg de extratos protéicos foram desnaturados e resolvidos em gel SDS PAGE conforme descrito no capítulo 2. O mesmo protocolo mencionado anteriormente foi utilizado para a transferência dos extratos protéicos resolvidos para a membrana de nitrocelulose e para o bloqueio, incubação com os anticorpos primário e secundário, e detecção da expressão com o substrato quimioluminescente CSPD (Applied Biosystems, USA). O anticorpo primário utilizado foi o anti-hGH policlonal produzido em coelho numa diluição de 1: 2.500 (0,4 ng/µL) em 10 mL de solução de bloqueio (leite em pó 5% em TBS 1X -Tris base 0,02 M e NaCl 0,137 M, pH 7,6).

2.7) Análises de imunocitoquímica.

A checagem do endereçamento subcelular do hGH recombinante para os PSVs de sementes de soja foi realizada a partir de secções cotiledonares de sementes transgênicas R₁ conforme descrito no capítulo 2. O anticorpo utilizado para o reconhecimento do hGH recombinante foi o anti-hGH policlonal produzido em coelho numa diluição de 1: 200 (5 ng/µL) em tampão PBST 1X (Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,7 mM, NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Tween 20 0,5% e albumina sérica bovina 2%).

2.8) Quantificação do hGH recombinante e determinação de sua atividade biológica.

Para a quantificação e avaliação da função biológica do hGH acumulado nas sementes, PST foram extraídas de *pools* de 1,5 g de sementes transgênicas submetidas à presença de 10 mL de tampão PBS 1X (Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,7 mM, NaCl 140 mM e KCl 2,7 mM, pH 7.2). As amostras foram homogeneizadas a 4°C com três pulsos de intensidade mínima, proporcionados pelo homogeneizador Kinematica Polytron (Kinematica, Bohemia, USA), e imediatamente congeladas a -80°C. As amostras foram descongeladas no gelo e centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante coletado e filtrado com o filtro de poliétersulfona Millipore 0,22 µm (Millipore, Billerica, USA), sob condições estéreis.

As concentrações de PST dos filtrados foram determinadas de acordo com o protocolo do kit Pierce BCA Protein Assay Reagent (Quantum Scientific, Murarrie, Austrália).

Os extratos filtrados de sementes transgênicas foram serialmente diluídos em tampão de cultivo (meio RPMI livre de fenol-vermelho suplementado por soro de bezerro 0,5% para suporte de cultura celular de mamíferos) (Invitrogen, USA) e cultivados em placa na presença de células precursoras de linfócitos murinos - células pró-B da linhagem BaF/BO3 (Rowland et al., 2002). A atividade biológica do hGH presente nos filtrados de sementes foi quantificada utilizando o ensaio de GH de Rowland e colaboradores (2002). Diferentes concentrações de hGH recombinante comercial foram analisadas em cada placa como controles positivos internos nos ensaios.

Os resultados foram analisados utilizando-se o programa de regressão estatística não-linear Graphpad Prism 5 (Graphpad Software, San Diego, USA), e a linha de tendência para cada amostra foi calculada contrastando-se a concentração de agente estimulante de crescimento (hGH) com a inclinação de cada curva de resposta.

2.9) Preparo de amostras para análise por espectrometria de massa.

Para a avaliação da estrutura primária e de possíveis modificações pós-traducionais nas frações do hGH recombinante produzido pelas sementes de soja, as proteínas totais de sementes transgênicas foram extraídas de acordo com Sussulini e colaboradores (2007). Alíquotas de 100 µg de sementes transgênicas foram maceradas com nitrogênio líquido e lavadas com 1 mL de éter de petróleo por 15 minutos. O solvente foi removido das amostras e o procedimento repetido uma vez. As proteínas foram extraídas com 1 mL de tampão de extração (Tris-HCl 50 mM (pH 8.8), cloreto de potássio 1,5 mM, DTT 10 mM, PMSF 1,0 mM e SDS 0,1% m/v) sob agitação a 4°C, por 10 minutos, e então centrifugadas por 5 minutos a 5.000 rpm a 4°C.

Os sobrenadantes das amostras foram coletados e precipitados com acetona gelada numa relação de 1:4 v/v por 1 hora, a 4°C, e então centrifugados por 10 minutos a 13.000 rpm. Os pellets foram solubilizados pela adição de 500 µL de bicarbonato de amônio 50 mM, quantificadas utilizando o espectrofotômetro Qubit (Invitrogen, USA) e diluídas com água milli Q estéril numa concentração final de 1 µg/µL.

Uma amostra de 50 µL foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga e 10 µL de bicarbonato de amônio foram adicionados, seguidos de 25 µL de uma

solução do surfactante RapiGest SF (Waters Corp, USA) 0,2%. A solução foi então vortexada rapidamente antes de ser incubada a 80°C em banho-seco por 15 minutos. Após o período de incubação, 2,5 µL de uma solução de DTT 100 mM foram adicionados à amostra e ela foi incubada por 30 min a 60°C.

A amostra foi então resfriada à temperatura ambiente e 2,5 µL de iodoacetamida 300 mM foram adicionados à solução. Seguiu-se uma incubação por 30 minutos em ambiente escuro. Dez microlitros de tripsina (Promega, USA) diluída em bicarbonato de amônio 50 mM (50 ng/µL) foram utilizados para digerir a amostra a 37°C durante a noite.

Após a digestão, 10 µL de uma solução de ácido trifluoroacético (TFA) 5% foram adicionadas à amostra para hidrolisar o surfactante RapiGest, seguido de vortexação rápida e incubação a 37°C por 90 minutos. A amostra foi então centrifugada a 14.000 rpm por 30 minutos a 6°C e o sobrenadante foi transferido para um frasco do tipo Waters Total Recovery vial (Waters, USA). Cinco microlitros da solução MassPREP Digestion Standard - Alcohol Dehydrogenase (ADH – Yeast; Waters, USA), numa concentração final de 1 pmol/µL, foram adicionados à amostra, além de 85 µL de acetonitrila (ACN) 3% acrescida de ácido fórmico 0,1%. As concentrações finais de proteínas e de ADH em solução foram respectivamente de 250 ng/µL e 25 fmol/µL.

2.10) Análise de amostras protéicas por NanoLC-MS^E

A separação de peptídeos trípticos por cromatografia líquida em nano escala foi realizada com um sistema nano Acquity™ (Waters Corp, USA) equipado com uma pré-coluna Symmetry C18 5 µm, 5-mm x 300-µm e uma coluna analítica fase reversa nanoEase™ BEH130 C18 1.7 µm, 100 µm x 100 mm (Waters, USA). As amostras foram inicialmente transferidas para a pré-coluna em uma solução aquosa de ácido fórmico 0.1%, com um fluxo de 15 µL/minuto durante 1 minuto. A fase móvel foi composta de água com ácido fórmico 0,1% e a fase móvel B de ácido fórmico 0,1% em ACN.

Os peptídeos foram separados com um gradiente de 3-40% da fase móvel B durante 90 minutos, com um fluxo de 600 nL/minuto seguido de enxágüe de 10 minutos em fase móvel B 90%. A coluna foi re-equilibrada nas condições iniciais por 20 minutos e sua temperatura mantida em 35°C. A “lock mass” foi alocada com a bomba auxiliar da nanoAcquity pump, com um fluxo constante de 150 nL/minuto a uma concentração de 100 fMolar de [Glu¹]-Fibrinopeptide B human (GFP) (Sigma-Aldrich,

USA) para o *sprayer* de referência da fonte NanoLockSpray do espectrômetro de massa.

Todas as amostras foram analisadas em triplicata. A investigação dos peptídeos trípticos foi realizada usando um espectrômetro de massa Synapt HDMS[®] (Waters, Manchester, UK). Esse instrumento possui uma geometria híbrida de tempo de voo do tipo quadrupole/ion mobility/orthogonal acceleration time-of-flight (oa-TOF).

Durante todas as medições, o espectrômetro de massa foi operado no “modo V” de análise, com uma força de resolução padrão de pelo menos 10.000 “full-width half-maximum” (FWHM). Todas as análises foram realizadas usando um modo de ionização do tipo “positive nanoelectrospray” (nanoESI +). O analisador de tempo de voo do espectrômetro de massa foi externamente calibrado com íons GFP b⁺ e y⁺ com uma relação *m/z* de 50 a 1990 e com a correção de pós-aquisição de dados de “lock mass” usando o íon precursor monoisotópico GFP [M + 2H]²⁺ = 784.8426. A frequência de acionamento do *sprayer* foi de 30 segundos.

Os dados de tempo de retenção de massa exata (EMRT) (Silva et al., 2005) por nanoLC-MS^E foram obtidos em um modo de aquisição de alternância de baixa e alta energia. O tempo contínuo de aquisição de espectros em cada modo foi de 1,5 segundo com um atraso de interscan de 0,1 segundo. No modo MS de baixa energia os dados foram coletados com uma energia constante de colisão de 3 eV. Já no modo de alta energia, a energia de colisão variou de 12 a 45 eV durante cada espectro de 1,5 segundo. A frequência de radio do analisador de massa quadrupolo foi ajustada para que íons com relação *m/z* de 50 a 2000 fossem eficientemente transmitidos, garantindo que quaisquer íons com relação *m/z* menor do que 50 observados nos dados de LC-MS somente pudessem ser originados de dissociações na célula de colisão TRAP T-wave.

2.11) Análise de dados e identificação de proteínas.

Os dados de espectrometria de massa obtidos por LC-MS^E foram processados utilizando o servidor ProteinLynx Global Server (PLGS) versão 2.4v (Waters, Manchester, UK). A identificação das proteínas foi obtida com o algoritmo interno de determinação de íons do software e por procura em um banco de dados de *Glycine max* com padrões de digestão de MassPREP (MPDS) do UniProtKB/Swiss-Prot com as seqüências (Phosphorylase - P00489 - PHS2_RABIT, Bovine Hemoglobin - P02070 - HBB_BOVIN, ADH - P00330 - ADH1_YEAST, BSA - P02769 - ALBU_BOVIN) e Human Somatotropin GH-N (UniProtKB/Swiss-Prot - P01241 - SOMA_HUMAN) anexas ao banco de dados.

As identificações e o processamento de dados quantitativos foram obtidos utilizando o algoritmo do método de quantificação absoluta de Silva e colaboradores (2006), e pela busca em bancos de dados específicos para as espécies checadas. A detecção dos íons, seu agrupamento e normalização de parâmetros em escala logarítmica foram realizadas em PLGS com uma licença Expression^E instalada. As medições de intensidade foram ajustadas em função dos EMRTs deisotópicos e reduzidos que se repetiram ao longo do experimento para a análise a nível de agrupamentos de EMRTs. Os componentes foram padronizadamente agrupados com uma precisão de massa de 10 ppm e um tempo de tolerância de 0,25-minuto.

O alinhamento de íons com elevada energia com os íons de baixa energia do peptídeo precursor foi conduzido com uma precisão de 0,05 minuto. Para a análise da identificação e quantificação das proteínas nas amostras as medidas de intensidade foram normalizadas à intensidade dos peptídeos identificados nas digestões-padrão internas.

3) RESULTADOS

3.1) Obtenção e caracterização molecular das linhagens transgênicas e da expressão a nível transcricional do gene *hgh* nas sementes.

Após o bombardeamento de 1000 eixos embrionários com os vetores p β cong3hGH (4.732 pb) e pAC 321 (8.672 pb), os explantes foram *cultivados in vitro* por 6 semanas antes que as plântulas fossem transferidas para vasos com solo na casa de vegetação. A presença do fragmento interno do gene *hgh* (308 pb) foi detectada em 5 linhagens R₀ independentes (figura 3 A). As linhagens 3, 9 e 19 mostraram um padrão de segregação mendeliana para o gene *hgh* nas sementes R₁ e foram escolhidas para a caracterização molecular. Todas as plantas R₀ e R₁ apresentaram a presença do gene marcador de seleção *ahas* (dados não mostrados).

A análise por *Southern blot* de plantas transgênicas R₁, utilizando uma sonda de 740 pb que anela num fragmento de 1.656 pb correspondente ao produto de digestão do p β cong3hGH com *HindIII*, demonstrou que os perfis de integração do *cassete* de expressão no genoma das linhagens 3, 9 e 19 apresentaram um padrão consistente de múltiplos eventos insercionais (figura 3 B). Ambas as linhagens tiveram de três a oito cópias do gene *hgh* inseridas nos seus genomas, num padrão semelhante ao observado em plantas transgênicas tolerantes ao Imazapyr[®] (Arsenal) contendo o gene marcador de seleção *ahas* (Aragão et al., 2000).

A avaliação da presença de transcritos primários do gene *hgh* em sementes R₂ imaturas foi verificada por RT-PCR. Todas as sementes das linhagens 3, 9 e 19 apresentaram expressão do transgene a nível transcricional, caracterizada pelo aparecimento de bandas de aproximadamente 308 pb na mesma posição de migração eletroforética do controle positivo: o próprio plasmídeo p β cong3hGH (figura 3 C).

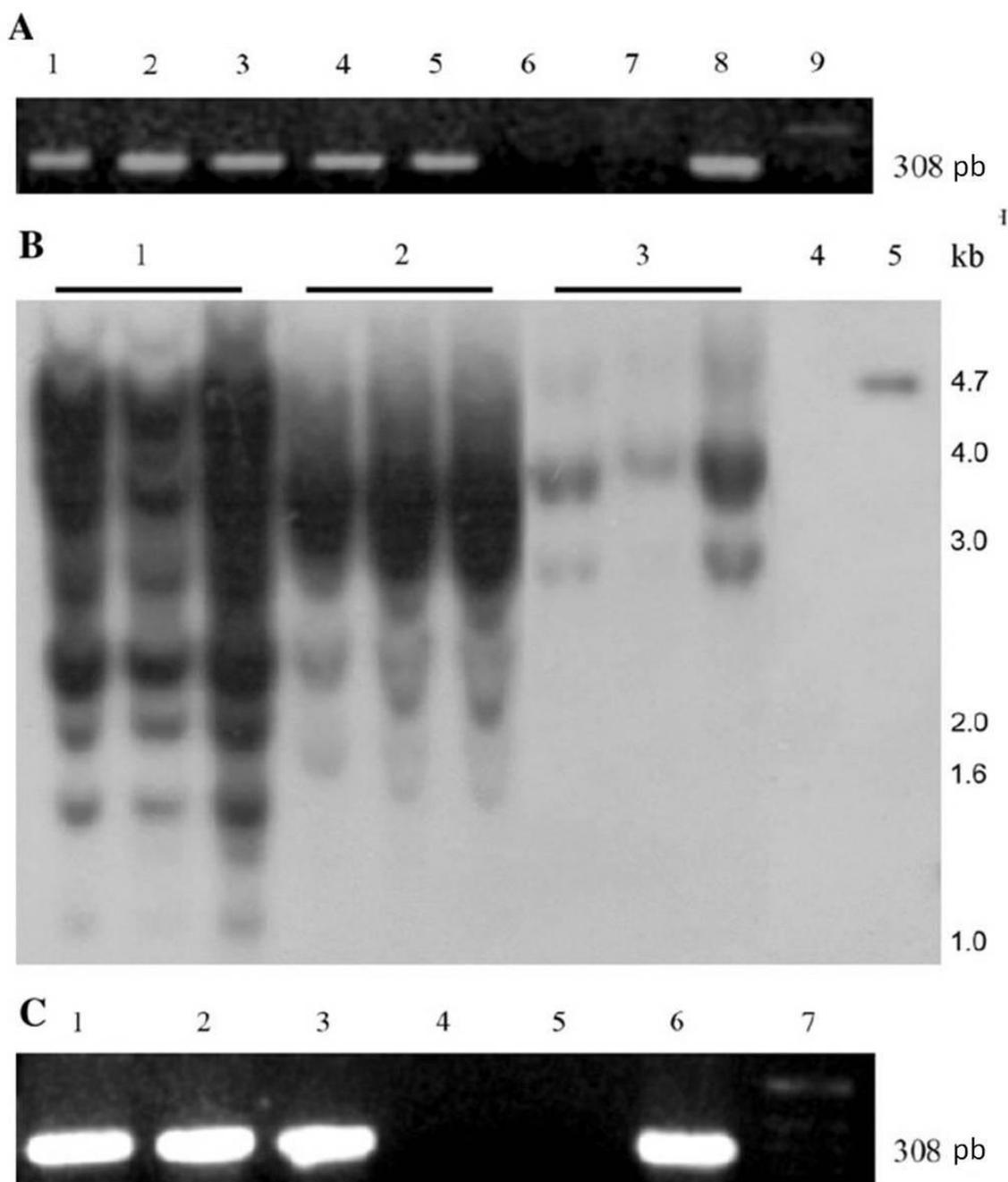


Figura 3: (A) Análise da integração do gene *hgh* no genoma de plântulas transgênicas regeneradas por PCR. As linhas 1 a 5 mostram resultados da amplificação de preparações de DNA de folhas de 5 linhagens transgênicas de soja demonstrando a presença do fragmento de 308 pb correspondente a uma região interna do gene *hgh*. As linhas 6 e 7 correspondem respectivamente aos controle negativos: uma amostra contendo o DNA de uma semente não-

transgênica e outra contendo água ao invés de DNA. A linha 8 corresponde à amplificação de um segmento interno de 308 pb do gene *hgh*, presente no plasmídeo p β cong3hGH (100 ng) utilizado como controle positivo. O marcador de peso molecular a 1-kb DNA ladder (Invitrogen, USA) foi utilizado para estimar o perfil de migração eletroforética de todas as amostras (linha 9). **(B)** Análise de *Southern blot* de plantas transgênicas R₁ demonstrando múltiplas cópias do gene *hgh* inseridas no genoma de todas as linhagens analisadas. As linhas 1 a 3 mostram amostras de DNA genômico de plantas provenientes das linhagens 3, 9 e 19 que foram submetidos à hibridização específica com uma sonda interna homóloga ao gene *hgh*. A linha 4 mostra que não houve hibridização da sonda com o DNA genômico de uma planta não-transgênica. Na linha 5 pode-se notar uma banda correspondente à hibridização da sonda com o plasmídeo p β cong3hGH (4,7-kb) (100 pg), indicando que a sonda reconhece especificamente um segmento interno do gene *hgh*. Os pesos moleculares foram estimados usando o marcador de peso molecular 1-kb DNA ladder (Invitrogen, USA). **(C)** Análise de RT-PCR de sementes R₂ imaturas das linhagens 3, 9 e 19 demonstrando a expressão do gene *hgh* ao nível transcricional. As linhas de 1 a 3 mostram a amplificação de cDNAs referentes aos transcritos primários do gene de interesse em amostras de cDNA de sementes das respectivas linhagens. As linhas 4 e 5 correspondem aos controles negativos respectivamente com cDNAs de uma semente não-transgênica e água ao invés de DNA *template*. A linha 6 mostra a reação de amplificação de um segmento interno do *cassete* de expressão (308 pb) presente no plasmídeo p β cong3hGH. Os pesos moleculares foram estimados usando o marcador de peso molecular 1-kb DNA ladder (Invitrogen, USA).

3.2) Caracterização da expressão do gene *hgh* a nível traducional nas linhagens transgênicas

Análises de western blot foram realizadas para a avaliação da expressão do hGH recombinante nas sementes R₁ das três linhagens transgênicas. Foi possível detectar a presença do hGH nas sementes estocadas à temperatura ambiente mesmo após seis anos. Anticorpos anti-hGH reconheceram especificamente as frações de aproximadamente 22 kDa presentes nos extratos protéicos de sementes das três linhagens: 3, 9 e 19.

A ausência de bandas e fragmentos de massa molecular menor do que 22 kDa nas amostras indica que não houve sinais detectáveis de degradação do hGH recombinante expresso nas sementes (figura 4 A).

A especificidade do promotor da subunidade α 'da β -conglícinina foi avaliada pela análise imunológica de extratos protéicos isolados de raízes, caules, folhas, flores e sementes. Como esperado, não houve detecção do hGH recombinante nesses tecidos, exceto nas sementes (figura 4 B)

A cinética de acúmulo da proteína recombinante durante o desenvolvimento fisiológico das sementes transgênicas R₁ (da linhagem 19) foi avaliada 2, 4, 6 e 8 semanas após a polinização dos óvulos (figura 4 C). Os resultados mostraram um aumento dos níveis de acúmulo do hGH ao longo do desenvolvimento da semente, atingindo seu auge em sementes imaturas colhidas 6 semanas após a polinização e mantendo-se estável nas duas semanas seguintes.

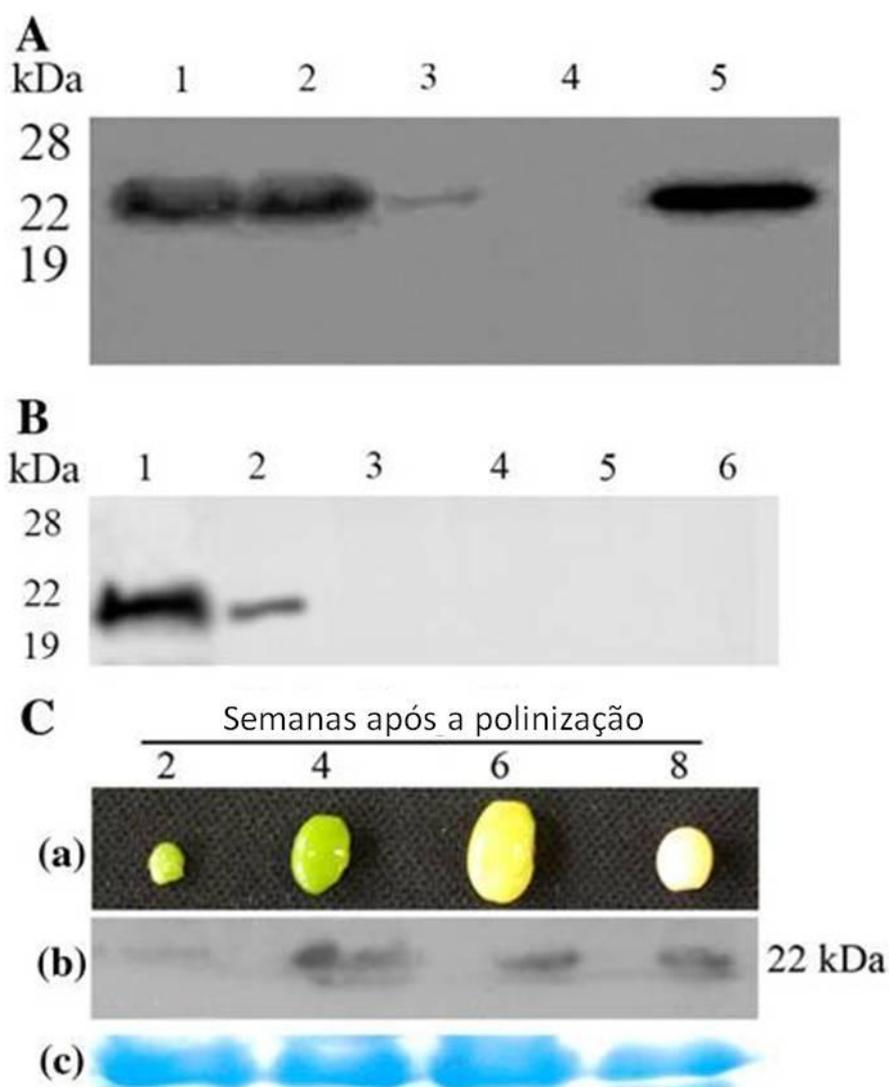


Figura 4: (A) O acúmulo do hGH recombinante em sementes transgênicas de soja foi avaliado por western blot. As linhas 1 a 3 correspondem à análise de extratos protéicos totais (100 µg) de sementes R₁ das linhagens 3, 9 e 19, e demonstram o reconhecimento do hormônio recombinante por moléculas de anticorpos primários anti-hGH. A linha 4 corresponde à reação do extrato de semente não-transgênica, onde não foi possível detectar a presença do hGH. A linha 5 mostra o aparecimento de uma banda de aproximadamente 22 kDa associada à presença do hGH recombinante purificado de *E. coli*, que foi utilizado como controle positivo para demonstrar a especificidade do anticorpo primário e como referência do padrão de

migração eletroforética das proteínas recombinantes de sementes sob condições desnaturantes. As massas moleculares das amostras e do controle foram estimadas utilizando o marcador de massa molecular Precision Plus Protein Standards All Blue™ (Bio-Rad, USA). **(B)** A eficiência do promotor da subunidade α' da β -conglucina em restringir a expressão do transgene nas sementes foi avaliada por análise órgão-específica de western blot. Na linha 1, aproximadamente 100 ng de hGH recombinante purificados de *E. coli*. foram detectados pelo anticorpo primário. As linhas 2 a 6 mostram a análise de PSTs (100 μ g) respectivamente de sementes folhas, flores, caules e raízes de uma planta transgênica da linhagem 19. A presença do hGH recombinante foi detectada apenas nas sementes. As massas moleculares das amostras e do controle foram estimadas utilizando o marcador de massa molecular Precision Plus Protein Standards All Blue™ (Bio-Rad, USA). **(C)** a) A cinética de expressão do hGH em diferentes estágios fenológicos de sementes R₁ (linhagem 19) foi determinada a partir de 2, 4, 6 e 8 semanas após a polinização das flores. b) As análises de western blot mostraram o acúmulo do hGH em cada estágio de desenvolvimento fisiológico das sementes. c) A eletroforese em gel de poliacrilamida com sódio-dodecil-sulfato (SDS-PAGE) dos extratos protéicos (~100 μ g) demonstrou a aplicação homogênea das amostras a fim de permitir a análise comparativa dos blots correspondentes.

3.3) Identificação subcelular do hGH em sementes de soja transgênicas.

Para determinar se o hGH recombinante havia sido acumulado nos PSVs, foram realizados experimentos de imunocitoquímica de cotilédones de sementes transgênicas. Foi possível observar a localização subcelular da proteína recombinante nas sementes das linhagens 9 e 19.

Imagens de microscopia eletrônica de secções ultrafinas (50 nm) de sementes tratadas com anticorpos específicos anti-hGH revelaram o acúmulo do hormônio primariamente nos PSVs das sementes analisadas, conforme indicado pela presença das partículas de ouro (20 nm) conjugadas à proteína A (figura 5 A e B).

Não foi possível detectar o acúmulo de hGH no apoplasto, nos grãos de amido ou no citoplasma, bem como em secções de sementes não-transgênicas (figura 5 D).

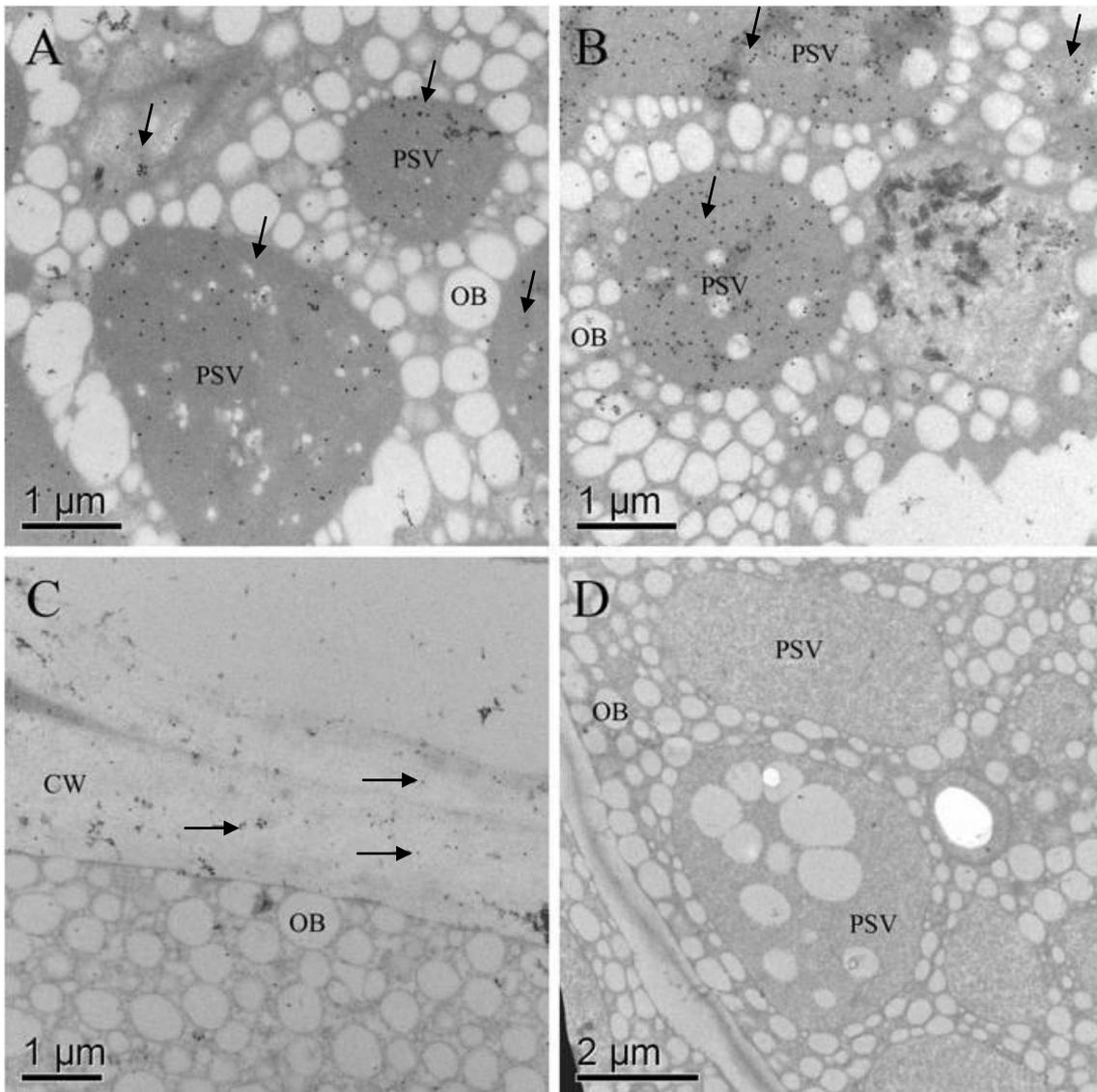


Figura 5: Avaliação por imunocitoquímica do endereçamento subcelular do hGH para os PSVs de sementes R₁ transgênicas. O acúmulo do hormônio foi detectado principalmente nos PSVs de diferentes sementes das linhagens 9 e 19, conforme mostrado respectivamente em **(A)** e **(B)**. Houve acúmulo pontual do hGH na parede celular - cell wall (CW) – em semente da linhagem 19 **(C)**. A presença da proteína recombinante não foi detectada em sementes não-transgênicas ou associada claramente aos corpos de óleo – oil bodies (OB) **(D)**.

3.4) Identificação de peptídeos trípticos do hGH por espectrometria de massa.

O hGH recombinante presente nas sementes foi detectado e identificado por NanoLC-MS^E. Os resultados demonstraram a presença das seqüências corretas dos peptídeos do hormônio humano nos extratos protéicos de sementes transgênicas de soja e as respectivas massas monoisotópicas esperadas (figura 6 A e B). A adição da modificação carbamidometila+C em dois dos peptídeos do hGH foi causada pela digestão protéica conforme descrito na seção Materiais e Métodos.

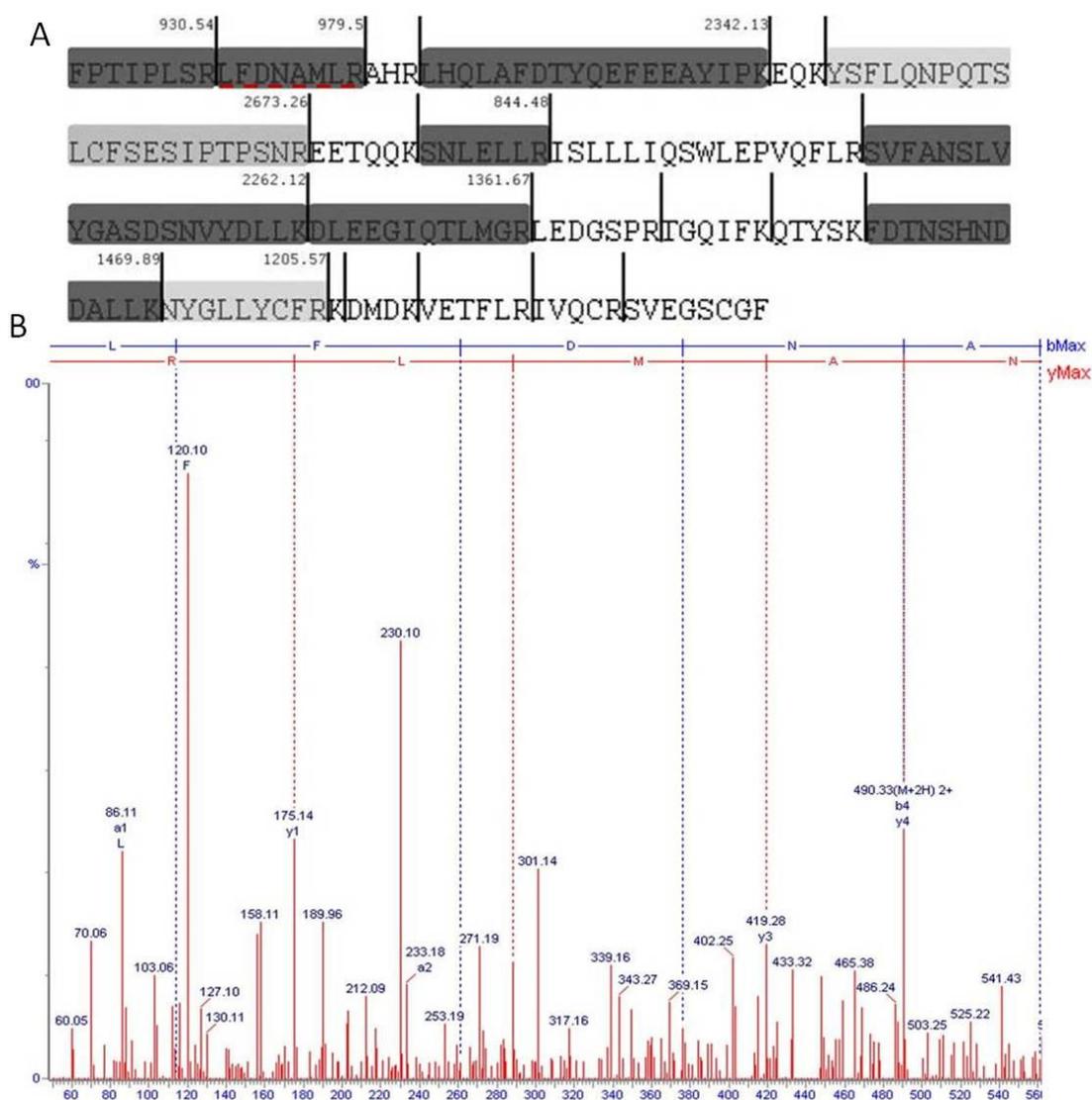


Figura 6. (A) Esquema analítico da seqüência completa do hGH expresso em soja. As barras pretas correspondem aos sítios de digestão da enzima tripsina. Os trechos em cinza-escuro indicam as seqüências de peptídeos confirmadas por espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS). Os trechos cinza-claro indicam as seqüências peptídicas com a modificação do tipo carbamidometila+C. Os números acima dos trechos identificados mostram as massas

monoisotópicas dos peptídeos correspondentes. **(B)** Espectro de ionização do peptídeo marcado em (A), com as respectivas séries b e y, indicando as massas seqüenciais dos aminoácidos cobertos no fragmento.

3.5) Quantificação e avaliação funcional do hGH recombinante.

A atividade biológica do hGH recombinante presente nos extratos protéicos de sementes das linhagens 3, 9 e 19 foi determinada conforme mostra a figura 7. O bioensaio de avaliação da atividade somatogênica se baseia na proliferação de células clones da linhagem BaF/B03-B2B2 de camundongo. Elas expressam o tipo selvagem do receptor de hGH (wt hGHR), capaz de ser reconhecido pelo hormônio ativo e desencadear os primeiros estágios da cascata de reações relacionadas à ativação do ciclo celular. A proliferação dessas linhagens celulares depende da presença de fatores de crescimento ativos no meio de cultura, dentre eles o hGH.

A atividade somatogênica no experimento foi medida pela diferença na resposta celular na presença e ausência de uma molécula antagonista, capaz de se ligar aos receptores wt hGHR e de competir com o hGH, inibindo a sua atividade.

Sementes das linhagens 9 e 19 expressaram altos níveis de hGH bioativo, com 2.90 ± 0.069 % PST (avaliado em 3 determinações independentes) para a linhagem 9 e 2.60 ± 0.01 % PST para a linhagem 19 (figura 7). Os resultados indicaram que o hormônio derivado das sementes de ambas as linhagens atuou como promotor eficiente da ativação metabólica do crescimento e da proliferação das células B2B2. Não foi possível detectar atividade significativa do hGH sintetizado em sementes da linhagem 3, bem como no controle negativo –sementes nao-transgênicas.

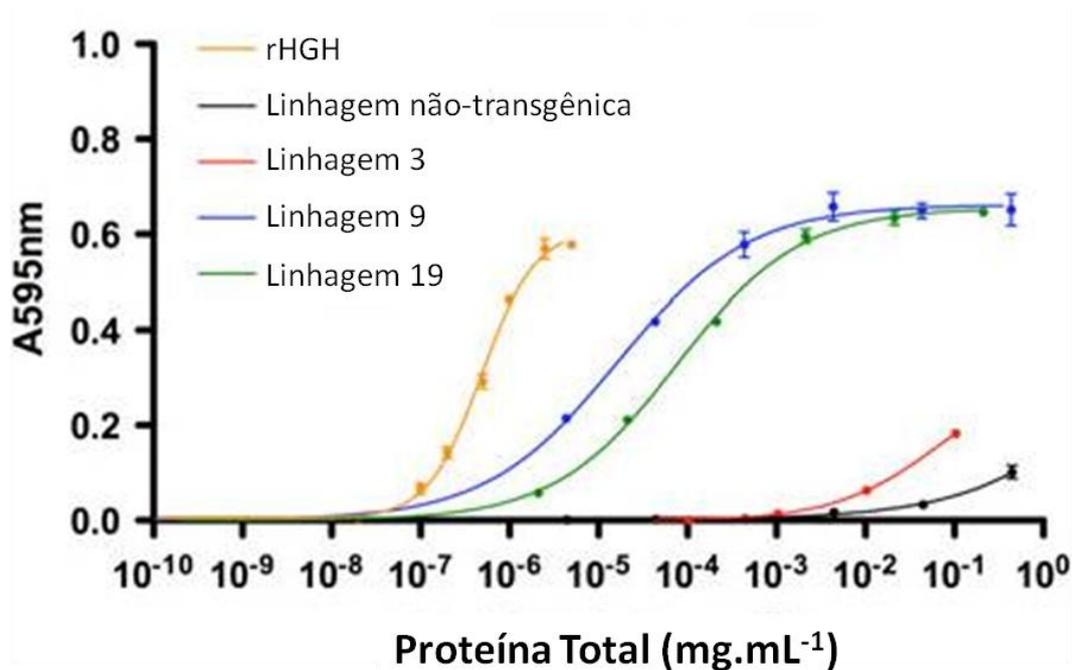


Figura 7: Curvas de proliferação de células BaF/B03-B2B2 expressando o receptor selvagem hGHR em função da dosagem de hGH presente no meio de cultura. Os hormônios presentes em sementes R₁ das linhagens transgênicas 3, 9 e 19 apresentaram diferentes níveis de indução de atividade somatogênica em células pró-B murinas. Não houve atividade significativa quando testadas as amostras de sementes não-transgênicas, bem como a linhagem de soja transgênica 3.

4) DISCUSSÃO

Neste trabalho, o hormônio do crescimento humano (hGH) foi expresso em sementes transgênicas de soja. As seqüências regulatórias presentes no vetor plasmidial de expressão utilizado nos experimentos de biobalística: o promotor tecido-específico da subunidade α' da β -conglucina de soja e o peptídeo-sinal da α -coixina de Coix foram avaliados quanto à sua eficiência em restringir a expressão do hGH nas sementes e endereçar o cúmulo do hormônio para os PSVs. O promotor mencionado é regulado temporalmente e promove a expressão gênica nos eixos embrionários e nos cotilédones de sementes em desenvolvimento (Chen et al., 1986; Imoto et al., 2008).

Cinco linhagens transgênicas de soja foram obtidas por biobalística e todas continham ambos os genes *hgh* e *ahas*, ou seja, nenhuma foi fruto de escape durante o processo de seleção. A eficiência de transformação genética foi de 0,5%, inferior à normalmente obtida quando da utilização do protocolo de transformação desenvolvido pelo LTG II (Aragão et al., 2000; Rech et al., 2008). As causas para esse índice de

sucesso podem ser as mesmas relacionadas à transformação genética de soja para a produção da pró-insulina.

Os transgenes foram estavelmente integrados ao genoma das plantas hospedeiras, como observado nas progênes R_1 e R_2 . Esse é um dado extremamente importante para o desenvolvimento de linhagens homozigotas destinadas à produção em larga escala do hGH recombinante e também para a caracterização da molécula em testes clínicos.

As análises de RT-PCR de sementes transgênicas imaturas demonstraram que a expressão do gene *hgh* no nível transcricional ocorreu em todas as linhagens testadas. Esse resultado sugere que as posições dos sítios de integração de uma ou mais cópias do transgene na cromatina do genoma das plantas não impediu a atividade regular do complexo da RNA Polimerase II e a obtenção de transcritos primários (Meyer & Saedler, 1996).

Três linhagens transgênicas apresentaram segregação mendeliana para os genes *hgh* e *ahas* (resultado não mostrado), sugerindo que, se múltiplas cópias tivessem se integrado de maneira randômica no genoma das plantas R_0 , provavelmente a integração ocorreu em diferentes *loci* com baixa freqüência de recombinação (Zhao et al., 2007). Essa hipótese foi corroborada com o resultado da análise de *Southern blot* de diferentes plantas R_1 das três linhagens (3, 9 e 19), as quais apresentaram pelo menos 8, 4 e 3 cópias respectivamente. Um problema associado ao alto número de cópias integradas ao genoma dos eventos transformantes é a possibilidade de integração supérflua em *tandem*, o que pode levar ao silenciamento no nível pós-transcricional e baixos níveis de produção da proteína recombinante (Finnegan & McElroy, 1994). Novas análises por hibridização em gerações mais avançadas irão permitir o monitoramento da segregação das cópias dos transgenes e associá-lo a padrões específicos de expressão do hGH.

As análises de western blot demonstraram a expressão do hormônio recombinante em sementes transgênicas durante todos os estágios do seu desenvolvimento fisiológico. Como esperado, não houve acúmulo da proteína nas raízes, caules, folhas e flores coletadas. A atividade regulatória do promotor da subunidade α' da β -conglucina está associada estritamente à presença de moduladores que se ligam a regiões de DNA a aproximadamente 250 pb do sítio de início de transcrição. A síntese desses moduladores protéicos está associada aos estágios iniciais do desenvolvimento das sementes, quando a presença abundante de proteínas de reserva é requerida para sua posterior utilização catabólica (Chen et al., 1986; Allen et al., 1989; Fujiwara & Beachy, 1994).

Neste estudo, o gene codificador do hGH foi clonado sob controle do promotor da subunidade α' da β -conglucina de soja e do peptídeo-sinal da α -coixina de *Coix lacryma-jobi* (Leite et al., 2000) com o objetivo de restringir a expressão gênica para as sementes transgênicas e endereçá-las para os PSVs, aumentando o rendimento final de produção recombinante em função da maximização da estabilidade protéica pós-traducional.

O acúmulo do hGH em sementes maduras das três linhagens foi detectada por western blot, demonstrando a especificidade do promotor tecido-específico empregado na estratégia de expressão.

A análise por digestão trípica e nanoLC-MS^E dos extratos de sementes transgênicas expressando o hormônio demonstraram que os peptídeos obtidos apresentavam as seqüências e massas moleculares esperadas. Os níveis de acúmulo do hGH recombinante nas sementes variaram de 2.6 a 2.9% PST, bastante significativos quando comparados com os valores típicos observados em biorreatores vegetais.

Apesar de o peso máximo de cada semente madura (cultivar BR-16) chegar a 200 mg, e do seu conteúdo protéico atingir até 40% do peso seco (Cantoral et al., 1995), no presente estudo as sementes utilizadas apresentaram um conteúdo protéico superior a 30% (dados não publicados), o que possibilita estimar que as sementes transgênicas da linhagem 9 apresentam um potencial de produção de mais de 9 g de hGH/Kg de sementes secas. Esse valor excede o resultado previamente observado de expressão desse mesmo hormônio em sementes de soja sob controle do promotor constitutivo 35SCaMV, igual a 0.0008% PST (Russell et al., 2005). Além disso, nossos resultados não apresentam detecção de degradação proteolítica do hGH recombinante nas sementes, característica associada diretamente à compartimentalização da proteína após a tradução, conforme demonstrado quando o hormônio foi acumulado nos cloroplastos de folhas de tabaco por Gils e colaboradores (2005). Em contraste, níveis significativos de degradação do hGH foram observados quando da síntese da proteína constitutivamente em folhas e sementes de tabaco e milho sem qualquer tipo de endereçamento subcelular (Russell et al., 2005).

O padrão de cinética de acúmulo do hGH nas sementes indica que a modulação temporal de síntese do hormônio, durante o ciclo da cultura, atinge seu pico aproximadamente 4 semanas após a polinização, seguido da estabilização da produção até a maturação completa das sementes. Esse resultado pode ser correlacionado com a própria cinética de formação e aumento da disponibilidade dos PSVs nas sementes (Yoo & Chrispeels, 1980).

Os resultados de imunocitoquímica de cotilédones de sementes transgênicas indicaram que moléculas de hGH recombinante foram eficientemente endereçadas para os PSVs. A presença da proteína foi detectada no lúmen dessas organelas, mas não no interior de corpos de óleo. Como as sementes de soja expressaram o hGH com a sua massa molecular correta – 22kDa – conforme determinado nos espectros MS/MS, pode-se constatar que a remoção do peptídeo-sinal da α -coixina no RE foi realizado corretamente, corroborando a hipótese de sucesso no endereçamento subcelular como já demonstrado em diferentes sistemas vegetais recombinantes obtidos por transformação do genoma nuclear (Daniell et al., 2001; Ma et al., 2003; Stöger et al., 2005).

A utilização de sementes de soja transgênicas como alvo do endereçamento subcelular de proteínas recombinantes pode constituir uma opção viável para a produção de plataformas de produção de fármacos (Giddings et al., 2000; Twyman et al., 2003). Nossos resultados demonstraram que sementes de diferentes linhagens obtidas há seis e estocadas à temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) ainda continham altas concentrações de hGH bioativo.

Esses resultados não apenas confirmam a idéia de estabilidade de acúmulo via expressão em órgãos como tubérculos e sementes (Fiedler & Conrad, 1995; Stöger et al., 2000; Larrick & Thomas, 2001; Ramírez et al., 2001), como também expandem o período potencial de estocagem de fármacos via acúmulo nos PSVs. A possibilidade de acúmulo de fármacos em sementes por longos períodos de tempo, sem redução drástica das concentrações iniciais, permite ainda a purificação para fins comerciais em função da demanda real do produto (Boothe et al., 2010).

Experimentos de purificação do hGH derivado de sementes de soja e a caracterização da molécula de acordo com as boas práticas de processamento estão sendo conduzidos para avaliar seu potencial emprego terapêutico em humanos (Boothe et al., 2010). Em adição, novos experimentos também estão feitos para avaliar a utilização de sementes de soja transgênica para o arraçoamento de peixes e alimentação bovina.

Capítulo 4

Acúmulo do fator de coagulação IX (FIX) funcional em sementes transgênicas de soja

1) INTRODUÇÃO

O fator IX de coagulação sanguínea (FIX) é uma serino-protease pertencente à família de peptidases S1, com 461 aminoácidos, 55 kDa e ponto isoelétrico de 5,2. Ela é sintetizada e armazenada no fígado e secretada, posteriormente, no sangue como um zimogênio cuja estrutura é estabilizada por três ligações de dissulfeto e dividida em duas regiões: uma leve e a outra pesada (Furie & Furie, 1988).

Uma vez no sangue, essa glicoproteína sofre diversas modificações pós-traducionais que a permitem desempenhar um papel-chave na via intrínseca de coagulação sanguínea (Bristol et al., 1993; Ragni et al., 2002).

A participação do FIX na complexa rede de reações da via envolve diretamente sua ativação pela vitamina K e o seu acoplamento a co-fatores lipídicos e íons de cálcio, além de clivagens mediadas por mais duas serino-proteases: os fatores XI (FXI) e X (FX) (Roth et al., 2001).

Durante o processamento pelo FXI, um peptídeo de 11 kDa é removido da cadeia do FIX imaturo para expor seu sítio ativo. Essa modificação permite ao FIX catalisar a hidrólise de uma ligação peptídica envolvendo uma arginina e uma isoleucina do FX o qual, uma vez maduro, modifica outras proteínas da via intrínseca de coagulação sanguínea, notadamente a pró-trombina e o fibrinogênio (Osterud & Rapaport, 1977; Furie & Furie, 1988).

Segundo Cunha (2008): “a informação genética do FIX é armazenada em um dos maiores e mais complexos genes humanos já caracterizados, localizado no locus *Xq27.1-q27.2.1*, no braço longo do cromossomo X. O gene completo possui 35 kb de extensão, 8 exons e uma longa seqüência codante de 1.326 pb. Mutações genéticas que levem à disfunção ou à ausência de síntese do FIX causam o segundo tipo de hemofilia mais comum, o B (“Christmas disease”), doença recessiva ligada ao X que afeta 1 em cada 30.000 homens”.

O tratamento da hemofilia do tipo B era realizado através da administração de doses do FIX purificado do fígado ou derivado do sangue de cadáveres humanos até a segunda metade de 2007, quando a multinacional americana Wyeth lançou o FIX recombinante produzido em larga escala a partir de células de ovário de hamsters chineses. O produto, comercializado na América do Norte e Europa, foi registrado

como BeneFIX[®] (<http://www.benefix.com/>) e se mostrou altamente eficiente e seguro (Lambert et al., 2007).

Apesar do sucesso do produto nos mercados citados acima, o fator de coagulação hemoderivado ainda é predominantemente utilizado por hemofílicos B em países em desenvolvimento. O FIX hemoderivado não apenas é caro como também um potencial carreador de príons causadores da doença de Creutzfeldt-Jakob (vCJD), de vírus causadores dos diferentes tipos de hepatite e AIDS, de manifestações de trombose, coagulação intravascular disseminada e alterações da função imune (Shapiro et al., 2005; Lisauskas et al., 2008).

Os primeiros organismos transgênicos a expressarem o FIX recombinante foram células de *E.coli*, em 1982 (Kurachi & Davie, 1982). Algum tempo depois, em 1986, o FIX humano produzido em células de ovários de hamsters chineses (*Cricetulus griseus* G. Fischer) foi purificado, caracterizado e testado com sucesso, e o sistema foi aperfeiçoado até a produção em larga escala do BeneFIX[®] (Kaufman et al., 1986).

Sistemas de suspensão de fibroblastos bovinos (Liu et al., 1993), de células-tronco do sistema hematopoiético (Chen et al., 2006) e de células de rim de hamsters (Wajih et al., 2005) também já foram desenvolvidos para expressar altas concentrações do FIX humano.

Animais transgênicos vêm gradualmente atraindo maior atenção para a avaliação *in vivo* da reversão da hemofilia B e também para a produção do FIX no leite (Jallat et al., 1990). Camundongos hemofílicos conseguiram produzir o FIX ativo em seus hepatócitos após a transferência *in vivo* de um plasmídeo contendo o gene codificador do FIX humano nessas células (Miao et al., 2001).

A infecção de células de músculos esqueléticos de camundongos e cães com hemofilia B (Arruda et al., 2004), e do fígado de macacos (*Rhesus macaques*) (Nathwani et al., 2002) com partículas de adenovírus transgênicas também foi utilizada para reverter quadros de hemofilia B nesses animais.

Recentemente, o grupo do LTG II do Cenargen demonstrou a secreção do FIX humano funcional produzido no leite de camundongas transgênicas. Os níveis de expressão chegaram a até 3% PST (Lisauskas et al., 2008), o que é bastante animador do ponto de vista do rendimento de produção e da possibilidade de desenvolvimento de vacas adultas capazes de fazer o mesmo em período de lactação.

Apesar da produção do FIX no leite de animais transgênicos ser promissora e proporcionar o processamento pós-traducional idêntico ao humano, a produção nessas plataformas ainda é cara. Além disso, animais transgênicos de grande porte apresentam ciclo fisiológico longo (demoram anos para atingir a fase adulta),

apresentam baixa capacidade de escalonamento de produção e restringem a produção — normalmente alta — apenas à fase de lactação (Kusnadi et al., 1997; Ma et al., 2003; Obembe et al., 2011).

Estudos de avaliação da eficiência e do custo de tratamento de hemofílicos com deficiência de outro fator de coagulação, o FVII, mostrou que a droga recombinante de células de mamíferos promoveu coagulações com 100% de eficiência e, em média, 14 vezes mais rapidamente do que a droga convencional, a um custo considerado alto — de US\$ 7.590 por paciente, mas, mesmo assim, equivalente à metade do custo final do tratamento com a droga hemoderivada (Ozelo et al., 2007).

Apesar da disponibilidade e do tratamento dos diversos tipos de hemofilia com alguns fatores recombinantes (derivados de células de mamíferos) ser relativamente mais seguro, eficiente e mais barato que a utilização de hemoderivados, seu uso terapêutico ainda possui um custo proibitivo em países em desenvolvimento como o Brasil, o que sinaliza para a necessidade de obtenção de sistemas de expressão recombinante dessas moléculas que permitam uma redução do preço final da droga ao consumidor.

A utilização de plantas como reatores de fármacos constitui um dos sistemas mais eficientes do ponto de vista custo/benefício para a produção em larga-escala dessa classe de moléculas (Ma et al., 2003; Twyman et al., 2003). Além disso, o maquinário enzimático de plantas superiores consegue promover a síntese de proteínas que exigem um dobramento complexo, a montagem de multímeros e a promoção de algumas das modificações pós-traducionais exigidas para a correta função de fatores de coagulação como o FIX (Ma et al., 2003; Howard, 2005).

O FIX funcional já foi produzido eficientemente em sistema vegetal. Plantas transgênicas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) foram obtidas via *A. tumefaciens* e foram capazes de produzir frutos cujos conteúdos protéicos continham níveis máximos de FIX na ordem de 0.016% PST (Zhang et al., 2007). Apesar do baixo nível de acúmulo nos frutos, o FIX produzido em tomate foi eficiente para promover a coagulação sanguínea *in vitro*.

Recentemente, moléculas de FIX recombinante fusionadas à subunidade β da toxina do vibrião do cólera (*Vibrio cholera*) foram produzidas em plantas de tabaco transplastômicas 3,8% PST. O fármaco foi bioencapsulado e oralmente administrado em camundongos, que desenvolveram resposta imune a reações típicas da infecção causada pelo patógeno (Verma et al., 2010).

Plataformas recombinantes baseadas em sementes transgênicas são particularmente interessantes para o acúmulo de fármacos em função do seu alto percentual protéico endógeno e por permitirem a estocagem de proteínas funcionais

por longos períodos de tempo (Hood et al., 2002; Ma et al., 2003; Stöger et al., 2005; Drakakaki et al., 2006; Moravec et al., 2007; Streatfield, 2007).

As sementes de soja possuem uma grande concentração endógena de proteínas (~40% do peso seco), notadamente em função da grande disponibilidade de PSVs destinados à estocagem de proteínas de reserva (Takaiwa et al., 2007).

No presente trabalho, o FIX recombinante foi expresso em sementes transgênicas de plantas de soja obtidas por biobalística, e endereçado para os PSVs de modo a ser acumulado estavelmente. Essa estratégia molecular de expressão foi possível graças à utilização de um *cassete* de expressão contendo o promotor da subunidade α' da β -conglucina de soja e do peptídeo-sinal de α -coixina de Coix.

2) MATERIAIS E MÉTODOS

2.1) Amplificação do cDNA do FIX e construção do vetor p β cong3FIX.

A seqüência codificadora do FIX (GenBank número de acesso: M11309) foi amplificada por PCR a partir de uma biblioteca de cDNA de fígado humano (λ TriplEx; Clontech, USA), utilizando a enzima Precision Plus Taq polymeraseTM (Invitrogen, USA) na reação. Os sítios de restrição de *Nco*I e *Bam*HI foram incluídos, respectivamente, como extensões das extremidades 5' dos *primers* senso e antisenso. O primeiro, inclusive, continha também uma extensão correspondente à seqüência do peptídeo-sinal de α -coixina para o endereçamento protéico para os PSVs (Ottoboni et al. 1993). O fragmento obtido foi obtido clonado nos sítios de *Nco*I e *Bam*HI presentes no vetor p β cong3 (mencionado anteriormente no capítulo 3) para gerar o vetor de expressão p β cong3FIX (figura 1).

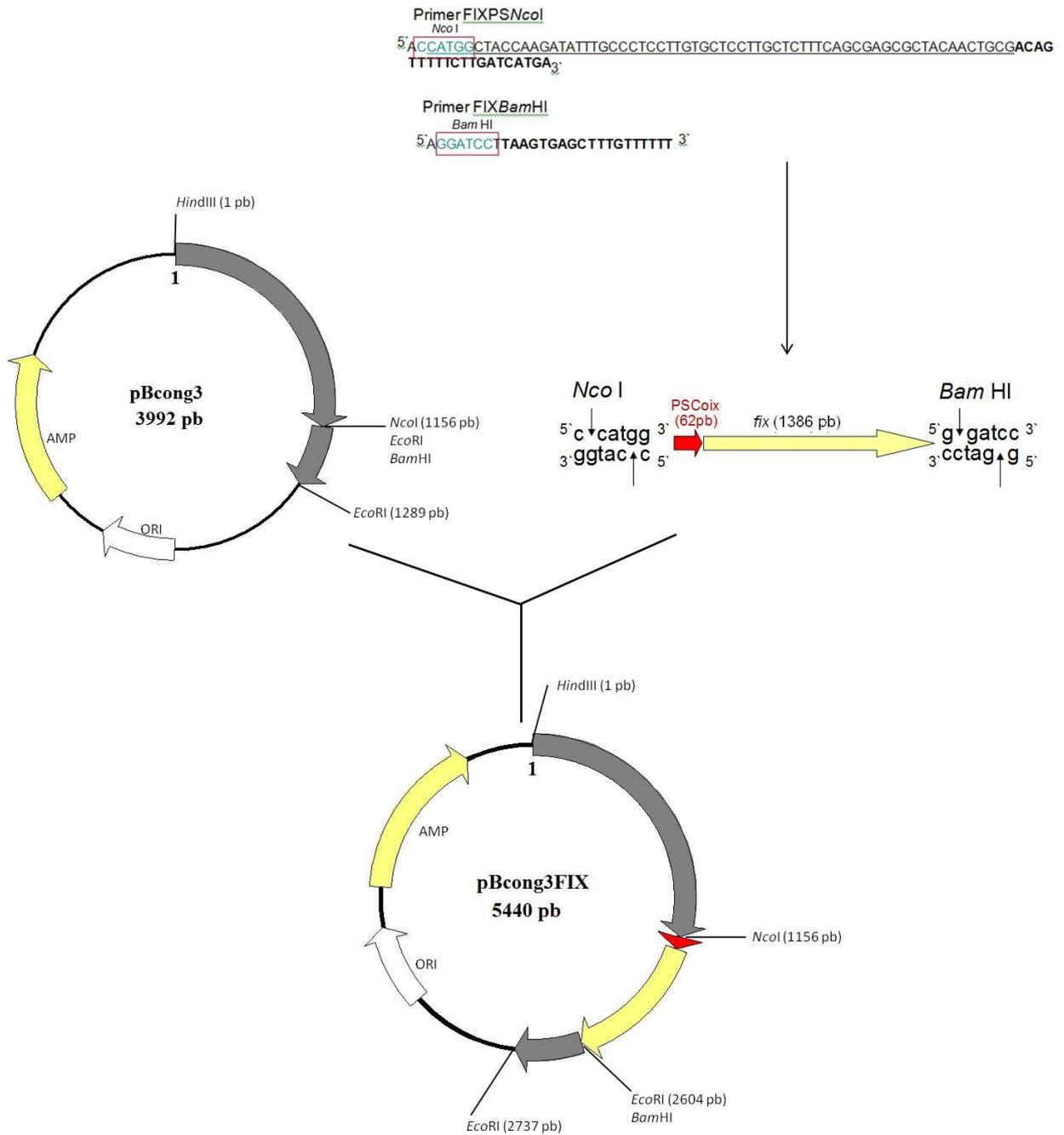


Figura 1: Representação esquemática da construção do vetor de expressão pBcong3FIX (5.440 pb), mostrando os *primers* utilizados para amplificar o fragmento contendo o gene *fix* e o peptídeo-sinal de Coix.

Este vetor final continha o *backbone* do vetor pBlue Script (Promega, USA), além de um *cassete* de expressão de 2.737 pb contendo a seqüência codificadora do FIX sob controle do promotor e do terminador da subunidade α' da β -conglucininina de soja (Chen et al., 1986; Doyle et al., 1986). Nos experimentos de transformação genética de embriões de soja, foi utilizado também o vetor pAC321, (Rech et al., 2008) o qual possui um *cassete* de expressão de 4.435 pb, formado pelo promotor *ahas*, o

gene marcador de seleção *ahas* e o terminador *ahas* previamente mencionados (figura 2).

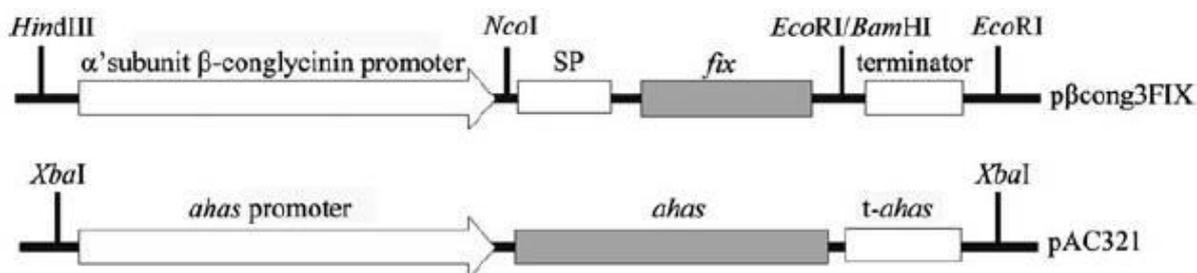


Figura 2: Representação esquemática dos cassetes de expressão dos plasmídeos pβcong3hFIX e pAC 321 utilizados nos experimentos de transformação genética de embriões de soja via biobalística. O gene do FIX (*fix*) foi fusionado ao peptídeo-sinal da α-coixina (SP) sob o controle do promotor e do terminador da subunidade α da β-conglicina. O cassete de expressão do pAC 321 contém o gene marcador de seleção *ahas* de *A. thaliana* sob o controle do promotor e o do terminador *ahas*.

2.2) Transformação genética de soja.

Os vetores pβcong3FIX e pAC321 foram utilizados nos experimentos de transformação genética de embriões somáticos de soja, em co-transformação (1:1), conforme descrito no capítulo 2, segundo o protocolo de Rech e colaboradores (2008).

2,3) Extração de DNA e reação em cadeia da DNA Polimerase (PCR).

O DNA genômico das plantas transgênicas R₀ e de sementes maduras e secas foi extraído, amplificado por PCR e analisado por eletroforese em gel de agarose conforme descrito nos capítulos 2 e 3.

Os primers FIX AL 256 senso (GATGGAGATCAGTGTGAGTC) e FIX AL 751c antisenso (TAACGATAGAGCCTCCACAG), e AHAS P124 senso (ACTAGAGATTCCAGCGTCAC) e AHAS 534 antisenso (GTGGCTATACAGATACCTGG) foram utilizados para a amplificação de fragmentos de 495 e 624 pb respectivamente. Esses fragmentos são correspondentes à amplificação de fragmentos internos dos genes *fix* e *ahas*.

2.4) Análise de plantas por *Southern blot*.

O isolamento do DNA genômico de plantas transgênicas R₁, sua digestão, separação eletroforética e hibridização foram realizados conforme descrito no capítulo 3. O fragmento de 405 pb relativo a uma região interna do gene *fix* foi utilizado como sonda e marcado com $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP (3000 Ci/mol) usando o kit de marcação Ready-To-Go DNA Labeled[®] (GE Healthcare) de acordo com as recomendações do fabricante.

2.5) Análise por RT- PCR.

Sementes transgênicas imaturas R₁, colhidas 60 dias após a polinização, foram analisadas para a presença de transcritos primários do gene *fix*.

A obtenção de RNAs totais, construção de cDNAs e amplificação dos cDNAs alvos foram realizadas de acordo com a descrição presente no capítulo 3. Os *primers* senso e antisenso utilizados para a reação de amplificação foram os mesmos descritos para os experimentos de PCR acima.

2.6) Obtenção de extratos protéicos totais de sementes transgênicas de soja.

Extratos protéicos totais de folhas, caules, flores, raízes e sementes (cada semente pesando aproximadamente 200 mg) foram obtidos por homogeneização de 1,5 g de tecido macerado em 10 mL de PBS 1X (Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,7 mM, NaCl 140 mM e KCl 2,7 mM, pH 7.2). As amostras foram homogeneizadas em gelo com três pulsos de intensidade a mais baixa possível, utilizando-se um Polytron PT (Kinematica, USA) e imediatamente congeladas a -80°C.

Para as análises, as amostras foram descongeladas a 4°C e centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e filtrados usando um filtro Millipore 0,22 μm (Millipore, Billerica, USA).

As concentrações protéicas foram determinadas usando o kit Pierce BCA Protein Assay Reagent (Quantum Scientific, Australia) de acordo com o protocolo do fabricante. Grupos de 3 sementes foram utilizados para ensaio quantitativo de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Para a determinação de função do FIX recombinante, *pools* de 50 sementes foram submetidos ao protocolo de extração descrito acima. Os extratos solúveis foram concentrados aproximadamente seis vezes usando uma coluna Falcon 100 μm nylon

sieve column (Millipore/Amicon, USA) e quantificados com o protein assay kit (Bio-Rad, USA).

2.7) Análises por western blot.

Aproximadamente 100 µg PST de cada amostra foram analisados por western blot conforme descrito no capítulo 3. Como anticorpo primário para o reconhecimento do FIX recombinante foi utilizado o anti-FIX policlonal produzido em coelho, numa diluição de 1:3.000 (4 ng/µL) em PBS 1X.

2.8) Quantificação do FIX humano nas sementes de soja.

A fim de determinar a concentração do FIX nas sementes transgênicas de soja, 20 µg de PST de sementes foram diluídos em PBS 1X e quantificados usando o kit Asserachrom IX:AG ELISA kit (Diagnostica Stago, USA) de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações do FIX recombinante foram determinadas baseadas numa curva-padrão de FIX comercial, em cujas concentrações variaram de 0,17 a 5,0 µg/mL. A lavagem da placa, a incubação com o anticorpo anti-FIX conjugado com peroxidase (Diagnostica Stago, USA) e a detecção usando o substrato diamina-orto-fenileno com peróxido de hidrogênio (OPD/H₂O₂; Diagnostica Stago, USA) foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante. As reações foram interrompidas com ácido sulfúrico (H₂SO₄) 3 M e a absorbância foi medida a 492 nm em um leitor de placa microplate Reader 3550 (Bio-Rad, USA).

2.9) Análises de imunocitoquímica.

A checagem do endereçamento subcelular do FIX recombinante para os PSVs de sementes de soja foi realizada como descrito no capítulo 2. O anticorpo utilizado para o reconhecimento do FIX recombinante foi o anti-FIX policlonal produzido em coelho, numa diluição de 1: 500 (24 ng/µL) em tampão PBST 1X.

2.10) Preparo de amostras e análise por NanoLC-MS^E.

A extração de PST para espectrometria de massa, digestão com tripsina e aquisição de espectros foram realizadas de acordo com os protocolos descritos no capítulo 3.

2.11) Análise de dados e identificação de proteínas.

Os dados de espectrometria de massa obtidos por LC-MS^E foram processados conforme descrito previamente no capítulo 3. A única diferença residiu no fato de que a identificação das proteínas foi realizada através de procura em um banco de dados de *Glycine max* com padrões de digestão de MassPREP (MPDS) do UniProtKB/Swiss-Prot com as seqüências: “Phosphorylase - P00489 - PHS2_RABIT, Bovine Hemoglobin P00489 - PHS2_RABIT, Bovine Hemoglobin - P02070 - HBB_BOVIN, ADH - P00330 - ADH1_YEAST, BSA - P02769 - ALBU_BOVIN) e human coagulation factor IXa (UniProtKB/Swiss-Prot P00740 FA9_HUMAN) anexas ao banco de dados.

2.12) Avaliação funcional do FIX por ensaio de coagulação *in vitro*.

A atividade funcional do FIX recombinante sintetizado em sementes de soja foi avaliada pelo ensaio de tempo de ativação parcial da tromboplastina (aPTT) (Arruda et al., 2004). Aproximadamente 600 µg TSP de cada amostra foram incubados em PBS1X com 200 µL de vitamina K₁ (Sigma, USA) (100 µg/ mL) por 24 horas a 37°C. Após esse período, as amostras foram incubadas individualmente com 150 µL de substrato com plasma deficiente de FIX (Helena Laboratories, USA) e 150 µL de tampão ativador de FIX Veronal (Dade–Behring, Germany) por 3 minutos a 37°C. Um volume de 150 µL de TriniCLOTTM aPTT CaCl₂ (Trinity Biotech, USA), numa concentração de 25 mM, foram adicionados à amostra, e o tempo de coagulação foi determinado em um coagulômetro ACL 200 System (Instrumental Laboratory, USA).

Para a determinação da atividade relativa de coagulação do FIX presente nas amostras, uma curva-padrão em diluição seriada de 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560 e 1:5120, foi elaborada utilizando-se as mesmas soluções de preparo das amostras transgênicas mas com um reagente similar ao plasma humano normal liofilizado - denominado Verify[®] (BioMérieux, France) – em substituição aos extratos protéicos.

3) RESULTADOS

3.1) Caracterização molecular das linhagens transgênicas obtidas e análise da expressão transcricional do gene *fix*.

Após os experimentos de biobalística, os eixos embrionários bombardeados foram cultivados *in vitro* por seis semanas antes da transferência das plântulas regeneradas para a casa de vegetação. Onze linhagens transgênicas independentes foram identificadas por PCR (figura 3). Após um período máximo de dez meses dos bombardeamentos, as plantas cultivadas sob regime de 23 horas diárias de fotoperíodo produziram uma média de aproximadamente 1000 sementes cada (dados não mostrados). O padrão de segregação dos transgenes nas sementes R₁ foi avaliado por PCR. As linhagens 1 e 7 apresentaram segregação mendeliana para o gene *fix* e foram escolhidas para a caracterização molecular e bioquímica. Todas as linhagens transgênicas apresentaram a presença do gene *ahas* (dado não mostrado).

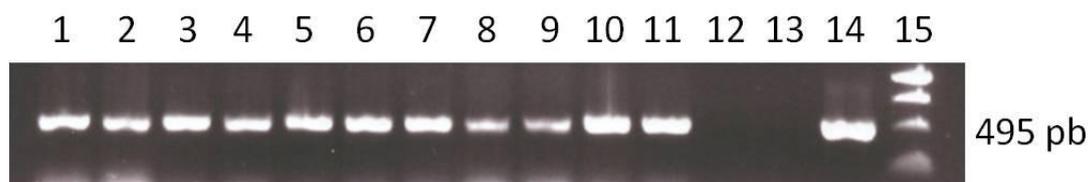


Figura 3: Identificação de 11 linhagens transgênicas por PCR demonstrando a amplificação de um segmento interno do gene *fix* de 495 pb. As linhas de 1 a 11 indicam as linhagens transgênicas obtidas. As linhas 12 e 13 correspondem aos controles negativos, respectivamente com o DNA genômico de uma planta não-transgênica e com água. A linha 14 corresponde a uma reação com plasmídeo pβcong3FIX.

A análise de plantas R₁ das linhagens 1 e 7 por *Southern blot* revelou que múltiplas cópias do gene *fix* foram integradas ao genoma da primeira e apenas uma ao da segunda (figura 4 A). A utilização de uma sonda radioativa interna ao gene *fix* mostrou que pelo menos quatro cópias do transgene foram detectadas no padrão de digestão e migração eletroforética do DNA genômico da linhagem 1.

O experimento de RT-PCR detectou a expressão do gene *fix* ao nível transcricional em sementes transgênicas R₂. O produto de amplificação por PCR de 495 pb foi detectado em amostras de ambas as linhagens (figura 4 B).

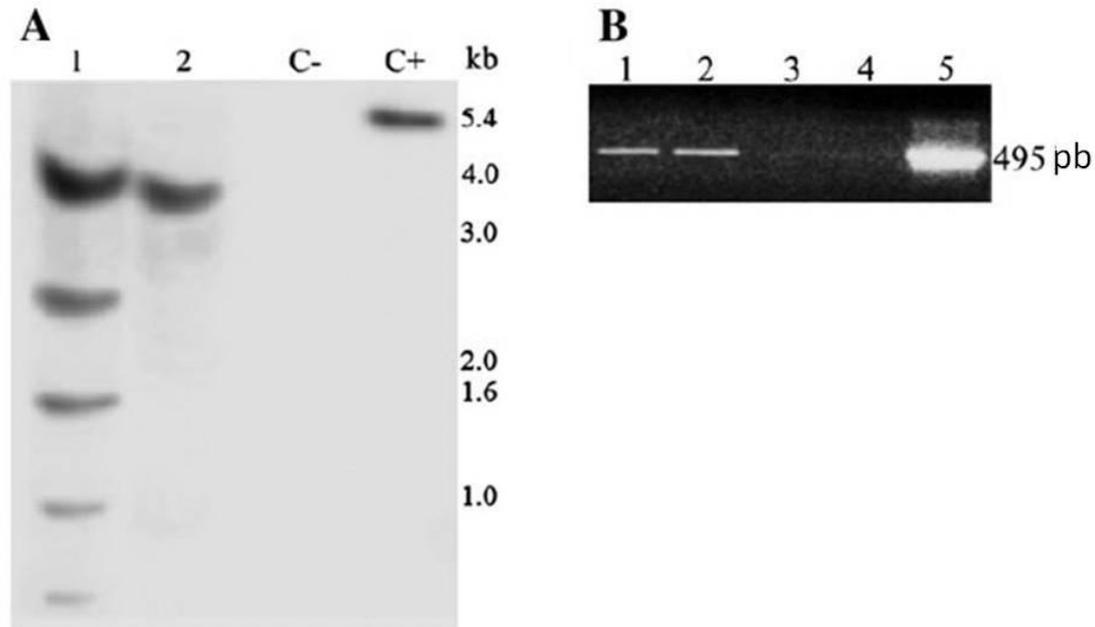


Figura 4: (A) Análise de *Southern blot* de plantas transgênicas R₁. As linhas 1 e 2 correspondem a plantas transgênicas as linhagens 1 e 7; C- a uma planta não-transgênica e C+ ao plasmídeo pβcong3FIX (100 pg). (B) Resultado de RT-PCR de sementes imaturas R₂ das linhagens transgênicas 1 e 7 (representadas respectivamente nas linhas 1 e 2). A linha 3 corresponde a uma semente não-transgênica; a linha 4 a uma amostra sem DNA *template* e a linha 5 a uma reação com o plasmídeo pβcong3FIX. O marcador de peso molecular a 1-kb DNA ladder (Invitrogen, USA) foi utilizado para estimar o perfil de migração eletroforética de todas as amostras.

3.2) Expressão e localização do FIX recombinante em sementes transgênicas.

A expressão do FIX recombinante em sementes R₁ foi confirmada por western blot usando PST de sementes das linhagens 1 e 7. Houve a detecção da proteína recombinante com a massa molecular esperada de aproximadamente 56 kDa em ambas as sementes (figura 5 A). No experimento de western blot tecido-específico, a restrição da expressão nas sementes foi demonstrada pelo fato da não-detecção nas amostras de raiz, caule, folha e flor (figura 5 B).

A cinética de expressão durante o ciclo de desenvolvimento das sementes R₁ foi avaliada em 2, 4, 6, e 8 semanas após a polinização. Houve um acúmulo crescente de FIX durante a maturação das sementes. Aparentemente a concentração de FIX foi maior nas sementes imaturas coletadas na sexta e oitava semanas de avaliação (figura 5 C).

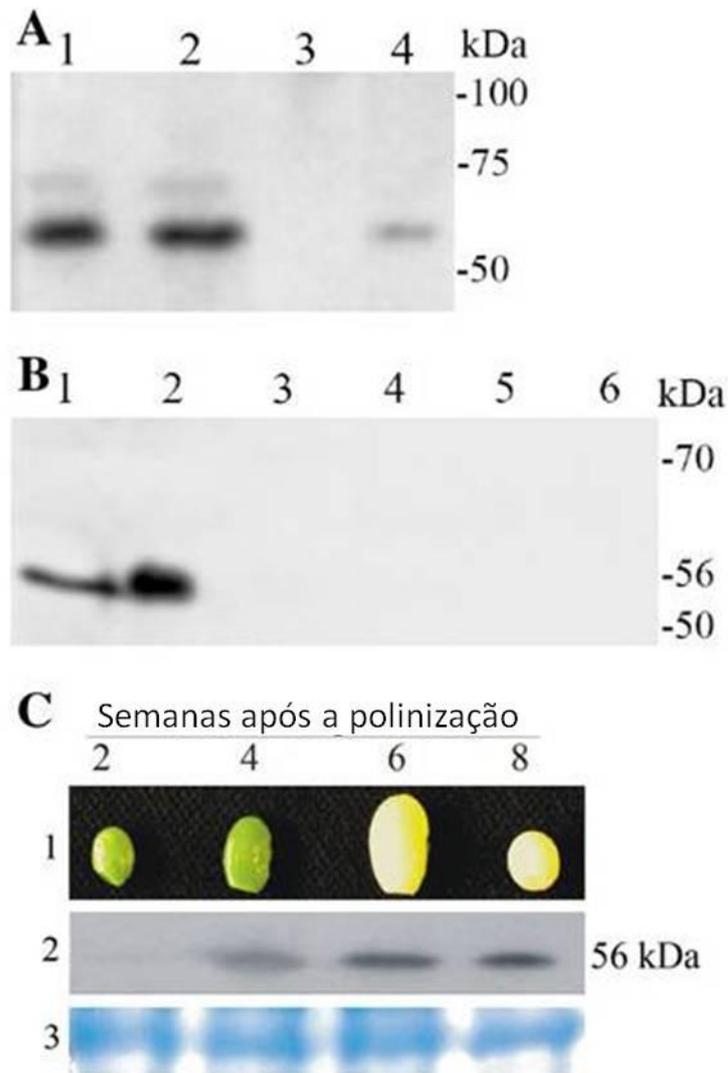


Figura 5: (A) Análise de western blot de sementes transgênicas expressando o FIX recombinante. O reconhecimento imunológico dos extratos protéicos totais (100 µg) de sementes R₁ das linhagens 1 e 7 é mostrado nas linhas 1 e 2. A linha 3 corresponde a uma amostra de semente não-transgênica e a linha 4 a 40 ng de FIX comercial (Sigma, USA). (B) Western blot demonstrando a expressão tecido-específica do FIX nas sementes da linhagem 1. A linha 1 representa a detecção de 40 ng de FIX comercial (controle positivo). As linhas 2, 3, 4, 5 e 6 mostram a análise de 100 µg TSP respectivamente de sementes, flores, folhas, caules e raízes. (C) Experimento de western blot mostrando o acúmulo da proteína recombinante em diferentes estágios de maturação das sementes: (1) sementes colhidas com 2, 4, 6 e 8 semanas após a polinização; (2) o acúmulo de FIX em cada estágio de desenvolvimento fisiológico; (3) controles de carregamento de gel SDS-PAGE com ~80 µg de cada extrato protéico. As massas moleculares das amostras e do controle foram estimadas utilizando o marcador de massa molecular Precision Plus Protein Standards All Blue™ (Bio-Rad, USA).

A localização subcelular do FIX nas sementes maduras da linhagem 1 foi avaliada por ensaios de imunocitoquímica ultraestrutural. Imagens de microscopia eletrônica de secções ultrafinas (50nm) de cotilédones transgênicos, tratados com anticorpos anti-FIX, indicaram o acúmulo da proteína nos PSVs, como evidenciado pela presença de partículas de ouro (20 nm) conjugadas com proteína A nesses locais (indicados pelas setas). Não houve detecção significativa do FIX no apoplasto e nos grãos de amido (figura 6 A e B).

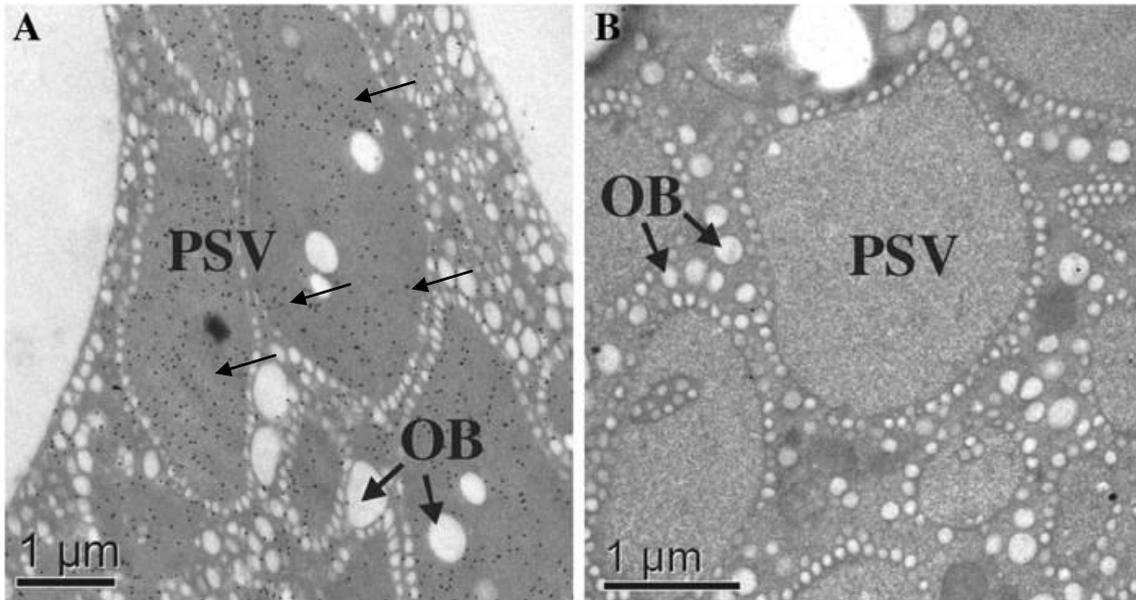


Figura 6: Avaliação do endereçamento subcelular do FIX recombinante em secções ultrafinas de cotilédones de soja. **(A)** Acúmulo subcelular do FIX recombinante nos PSVs de semente transgênica da linhagem 1. **(B)** Imunocitoquímica de semente não-transgênica. OB = oil bodies.

3.3) Quantificação do FIX nas sementes transgênicas de soja.

Experimentos de ELISA foram realizados para determinar a concentração de FIX nos PST de sementes das linhagens 1 e 7 (figura 7). As concentrações foram respectivamente de 0,138 mg/mL (0,2% PST) e 0,158 mg/mL (0,23% PST).

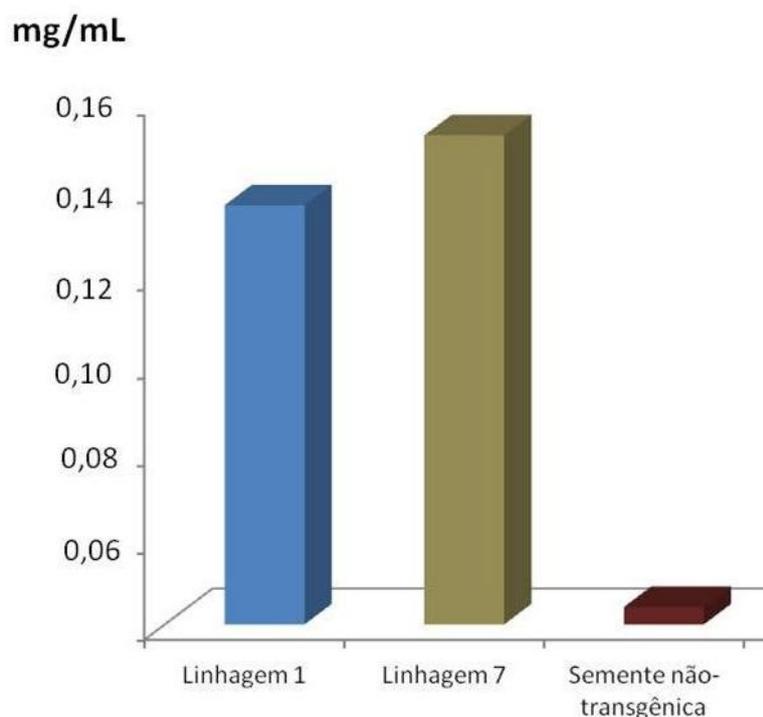


Figura 7: Quantificação do FIX recombinante presente nas sementes transgênicas linhagens 1 e 7.

3.4) Resultados de NanoLC-MS^E

A presença do FIX recombinante nas PST foi identificada também por NanoLC-MS^E. As seqüências e massas monoisotópicas dos peptídeos trípticos foram identificadas corretamente, e não houve detecção de modificações pós-traducionais, como glicosilação, no fragmento coberto pelo espectro (figura 8 A e B). Modificações metilcarbamida+C adicionadas a alguns dos peptídeos foram resultado do protocolo de preparo das amostras conforme mostrado no capítulo 3.

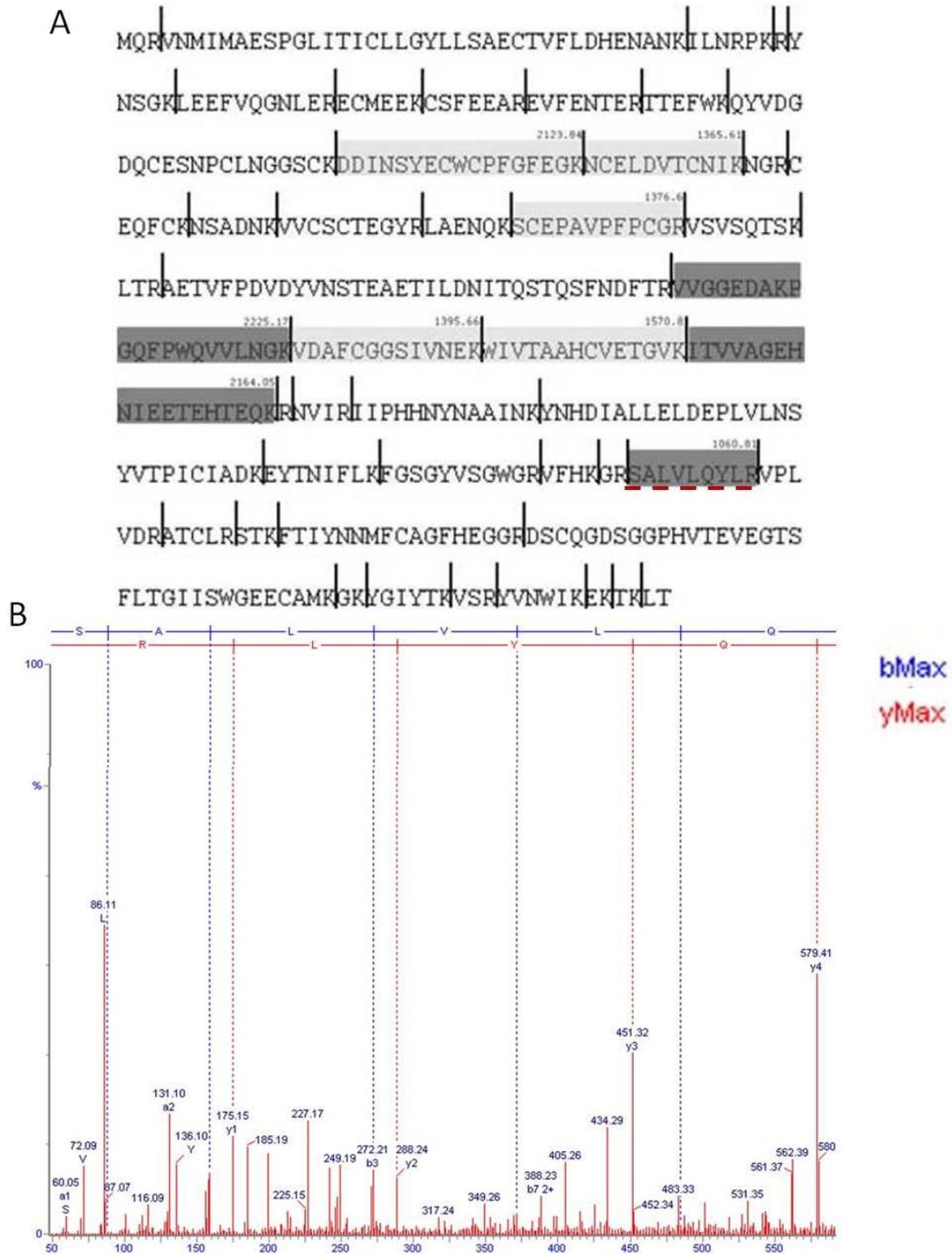


Figura 8. (A) Esquema analítico da seqüência completa do FIX expresso em soja. As barras pretas correspondem aos sítios de digestão da enzima tripsina. Os trechos em cinza-escuro indicam as seqüências de peptídeos confirmadas por espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS). Os trechos cinza-claro indicam as seqüências peptídicas com a modificação do tipo carbamidometila+C. Os números acima dos trechos identificados mostram as massas monoisotópicas dos peptídeos correspondentes. **(B)** Espectro de ionização do peptídeo marcado em (A), com as respectivas séries b e y, indicando as massas seqüenciais dos aminoácidos cobertos no fragmento.

3.5) Avaliação da atividade biológica do FIX acumulado nas sementes de soja.

A atividade coagulante do FIX recombinante em extratos de sementes das linhagens 1 e 7 foi avaliada pelo método aPTT. Esse protocolo permite a determinação da atividade de componentes requeridos para a coagulação plasmática em termos de tempo requerido para a formação de coágulos.

Para interpretar a atividade coagulante do FIX recombinante derivado das sementes, uma série de diluições com plasma humano liofilizado, contendo FIX ativo, foi elaborada. Ela permite estabelecer uma comparação com os valores-padrão do plasma normal, cuja referência de concentração de FIX é de 1 IU/mL (unidade internacional/mL), ou 5 µg/mL de sangue. Essa concentração pode estimular uma atividade de coagulação de 100% em um adulto sadio (Hoffer et al., 1999; Acar et al., 2006).

O FIX recombinante das linhagens 1 e 7 demonstrou uma atividade coagulante de 1 e 1,4%, e tempos de coagulação de 119,5 e 126,0 segundos respectivamente. Extratos de sementes não-transgênicas não mostraram atividade coagulante (tabela 1).

Tabela 1: Atividade coagulante do FIX expresso nas sementes transgênicas.

Amostra	Tempo de coagulação (s)	Atividade relativa de FIX comparada à do sangue humano
Diluição em série do FIX no plasma humano normal		
1 (1:80)	40,5	75,5
2 (1:160)	45,0	28,7
3 (1:320)	50,1	10,7
4 (1:640)	54,8	4,7
5 (1:1280)	60,3	1,9
6 (1:2560)	63,1	1,3
7 (1:5120)	64,9	1,0
Sementes de soja		
Linhagem 1	119,5	1,0
Linhagem 7	117,5	1,4
Sementes não-transgênicas	254	0

4) DISCUSSÃO

As sementes de soja podem funcionar como biorreatores do FIX. Nos experimentos, 1100 eixos embrionários foram submetidos à co-transformação via biobalística. As análises por PCR demonstraram que onze linhagens transgênicas independentes apresentaram o fragmento de 495 pb relativo a um segmento interno do gene *fix*. A frequência de transformação (1%) foi consistente com o descrito por Rech e colaboradores (2008).

Dentre as 11 linhagens transgênicas obtidas, duas apresentaram segregação mendeliana para o gene *fix*, apesar de uma delas apresentar múltiplas cópias do transgene, conforme demonstrado por *Southern blot* de plantas R₁. Os resultados sugerem que as cópias do gene na linhagem 1 segregaram ligadas como resultado de integração múltipla em um ou poucos *loci*, num único bloco complexo de genes herdado de maneira mendeliana. Esse não é o padrão de herança mais comum observado em plantas transgênicas obtidas por biobalística, mas exemplos em cereais e tabaco transgênicos atestam para a ocorrência de exceções como essa (Campbell et al., 2000; Popelka et al., 2003; Yin et al., 2004; Travella et al., 2005).

As linhagens de soja transgênicas mostraram bandas de 4,0 kb, resultantes de hibridização de segmentos do seu DNA genômico com fragmentos internos do *cassete* de expressão do plasmídeo p β cong3FIX, previamente digerido com *HindIII*.

Diversas outras bandas de menor peso molecular e baixo sinal de hibridização também foram detectadas, provavelmente em função de integração degenerada ou de fragmentos parcialmente integrados (Montchamp-Moreau et al., 1993; Luthra & Medeiros, 2004). Esses resultados corroboram relatos anteriores que mostraram que a integração de DNA exógeno, via biobalística ou por intermédio de *A. tumefaciens*, são processos randômicos e correlacionados ao efeito de posição quando não há a identificação de “hot spots” alvos de recombinação homóloga em genomas previamente seqüenciados (Aragão & Rech, 1997; Aragão et al., 2000; Altpeter et al., 2005).

Cópias supérfluas integradas *in tandem* no genoma hospedeiro normalmente refletem baixos níveis de acúmulo de proteínas recombinantes. Isso ocorre principalmente em função de silenciamento pós-transcricional (Hobbs et al., 1993; Kumar & Fladung, 2001; Kohli et al., 2003; Popelka et al., 2003).

As sementes de linhagens transgênicas foram analisadas por RT-PCR para determinar a ocorrência de transcrição do gene *fix*. Foi possível detectar os transcritos primários em sementes R₁ de ambas as linhagens analisadas, indicando que a

integração dos genes nos genomas receptores não foram seguidos de silenciamento drástico, capaz de anular a expressão gênica.

O acúmulo do FIX recombinante nas sementes estocadas por seis anos, à temperatura ambiente ($22\pm 2^\circ\text{C}$), foi demonstrada nas progênies R_1 das linhagens 1 e 7. Isso mostrou que o promotor da subunidade α' da β -conglucina de soja e o peptídeo-sinal da α -coixina foram suficientes para direcionar a expressão do FIX para os PSVs das sementes. Uma estratégia similar já havia sido utilizada para enriquecer nutricionalmente o tremoço (*Lupinus angustifolius* L.), através da indução de expressão nas sementes de uma proteína rica em metionina (Molvig et al., 1997).

A identificação do FIX com a massa aproximada de 56 kDa nos experimentos de western blot sugeriu que houve a remoção do peptídeo-sinal no RE, além do posterior endereçamento subcelular para os PSVs. As bandas de maior massa molecular presentes nos blots das duas progênies sugerem que frações do FIX expresso podem ter sofrido adições de glicanos ou outros grupamentos que contribuíram para um ligeiro aumento de massa (Jacobs & Callewaert, 2009), ou até mesmo que resquícios do peptídeo-sinal tenham sido deixados após o endereçamento subcelular (Hjernø, 2006).

A digestão trípica do FIX recombinante e a análise dos peptídeos resultantes por nanoLC-MS^E revelaram que os mesmos apresentaram as massas corretas e ausência de modificações pós-traducionais.

As análises de imunocitoquímica mostraram que a estratégia molecular baseada no promotor e no peptídeo-sinal escolhidos foi eficiente para acumular o FIX nos PSVs de sementes de maneira localizada, com a presença residual no apoplasto e nos corpos de óleo e ausência nos grãos de amido e na parede celular. Em contraste, a expressão de uma delta-zeína sob controle do promotor da β -conglucina em sementes de soja indicou a formação de dois corpos protéicos densos distintos, localizados principalmente no citosol mas também nos PSVs (Hohl et al., 1996; Müntz, 1998; Vitale & Raikhel, 1999; Kim & Krishnan, 2004).

O FIX recombinante chegou a constituir até 0,23% PST dos extratos das sementes. Este nível de acúmulo é consistente com aqueles apresentados tipicamente por biorreatores vegetais (Kusnadi et al., 1997; Daniell et al., 2001), mas significativamente mais alto que a expressão da mesma proteína em tomates - 0,016% PST (Zhang et al., 2007). Nossa experiência no acúmulo de fármacos recombinantes em sementes de soja, promovido por duas combinações diferentes de seqüências regulatórias, revelaram os mais variados níveis de expressão, que chegaram a até 5% PST quando do acúmulo do microbicida Cyanovirin-N (CV-N), usando o mesmo promotor da subunidade α' da β -conglucina e o seu peptídeo-sinal

endógeno. A aplicação de uma estratégia similar resultou na obtenção da subunidade B da toxina termolábil de *E. coli* enterogênica ao nível de 2,4% PST e da GFP acima de 7% PST quando retida no RE de células das sementes de soja (Moravec et al., 2007; Schmidt a& Herman, 2008).

Como uma plataforma com alto potencial de redução de custos de produção, a soja transgênica pode constituir um sistema promissor para a síntese em larga escala de fármacos recombinantes. A maximização do número de sementes produzidas por cada planta sob cultivo protegido pode, em última análise, elevar o rendimento médio a até 1.000 sementes/planta, aumentando excepcionalmente a biomassa destinada a abrigar as proteínas de interesse (Cavazonni et al., 1999; Kantolic & Slafer, 2007).

Estudos preliminares demonstraram que a soja pode representar o meio mais barato para a produção de proteínas recombinantes em comparação com todos os outros vegetais já utilizados para esse fim, como o milho, a canola, o amendoim, o girassol, a alfafa e a batata (Kusnadi et al., 1997; Hood et al., 2002; Chen et al., 2005; Demain & Vaishnav, 2009; Sharma & Sharma, 2009).

Os ensaios de coagulação confirmaram a atividade biológica do FIX de soja. Quando comparados com os valores observados no plasma normal, as taxas de coagulação proporcionadas pelo FIX recombinante (1,0 a 1,4%) foram baixas. Entretanto, o tratamento da maioria dos casos de hemofilia do tipo B requer suplementações com o FIX com 10% de sua atividade para promover níveis de coagulação satisfatórios. Além disso, um efeito hemostático significativo pode ser conseguido com a elevação da concentração de FIX no sangue para apenas 0,8 IU/dL (Kay et al., 2000; Goldenberg et al., 2008).

A baixa atividade de coagulação presente no FIX de soja pode ser parcialmente atribuída à presença de proteínas endógenas da soja nos extratos, as quais podem inibir a coagulação *in vitro* (Limentani et al., 1995; Buchacher et al., 1998). Há ainda a necessidade de otimização da ativação *in vitro* do FIX recombinante, a qual é complexa e mediada por diversos outros fatores e pela vitamina K (Jallat et al., 1990).

Para auxiliar a purificação do FIX das sementes e remover contaminantes, a adição de tags N ou C-terminais, como caudas de histidina, pode ser uma alternativa interessante, funcionando como uma ferramenta auxiliar para a obtenção de maiores quantidades da proteína (Rohila et al., 2004; Ribeiro et al., 2008). Atualmente, experimentos vêm sendo realizados para aperfeiçoar a extração de proteínas totais de soja e separá-las da proteína-alvo por meio da avaliação da sua solubilidade em diferentes tampões alternativos (Robic et al., 2006; Robić et al., 2010), o que poderá ser útil para avaliar o potencial econômico da produção do FIX em sementes de soja.

A estratégia molecular de expressão gênica apresentada neste capítulo se mostrou eficiente para aumentar a estabilidade do FIX após a tradução. Essa hipótese é suportada não apenas pelo período de estocagem ser superior aos mais estáveis já relatados em “Plant Farming” (Fiedler & Conrad, 1995; Stöger et al., 2000; Larrick & Thomas, 2001; Ramírez et al., 2001), como também pelo fato de as condições de armazenagem, mesmo distante daquelas praticadas em bancos de germoplasma, não terem sido suficientemente drásticas para reduzir a concentração de FIX a níveis indetectáveis.

5) CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Fármacos recombinantes oriundos de plantas transgênicas podem ser uma alternativa significativamente mais barata que as moléculas comumente isoladas de microorganismos transgênicos e cultura de células em suspensão (Kusnadi et al., 1997; Ma et al., 2003; Twyman et al., 2003). Sistemas de expressão baseados em sementes possuem ainda vantagens quando comparadas às espécies folhosas, uma vez que possuem conteúdo protéico maior e mais homogêneo que o complexo arranjo presente nos tecidos verdes. Apesar disso, a purificação de uma dada proteína a partir de sementes pode ser cara e ineficiente.

No presente trabalho foi possível acumular estavelmente três diferentes proteínas recombinantes de natureza e propriedades distintas. Certamente, a estratégia molecular empregada foi eficiente para reduzir o chamado “turnover” protéico, ou seja, a frequência de degradação das proteínas à medida que são sintetizadas ou após o seu armazenamento. O aumento da estabilidade pós-traducional, associado à atividade transcricional forte são os dois elementos-chave para o sucesso da soja como uma candidata à plataforma de expressão recombinante.

Nesses termos, o sistema descrito nesse trabalho congrega diferentes características desejáveis e complementares em todas as suas etapas componentes.

O protocolo de transformação genética, de seleção e de regeneração de plantas de soja *in vitro* já se mostrou eficiente em diversos exemplos previamente publicados. As características fisiológicas da soja, assim como a modulação do seu ciclo em casa de vegetação, nos possibilitou o escalonamento da produção em até 20 kg de sementes numa única safra.

Além disso, as seqüências regulatórias utilizadas, especialmente o promotor da subunidade α da β -conglucina são bastante promissores, já que representam os

elementos regulatórios envolvidos com o acúmulo do que há de mais abundante numa semente de leguminosa: as proteínas de reserva.

Naturalmente que a obtenção de linhagens homozigotas é fundamental para uma avaliação mais aprofundada do potencial dessa plataforma. A homogeneidade fenotípica é não apenas desejável como pode também dar novos contornos ainda mais estimulantes para apostar na soja como um veículo promissor para essa finalidade.

No presente momento, estamos multiplicando sementes de diversas linhagens transgênicas a fim de buscar a homozigose para altos níveis de expressão de diferentes fármacos com alto potencial mercadológico e impacto científico. Também almejamos “humanizar” o padrão de glicosilação de sementes por meio da tecnologia de silenciamento por interferência de RNA associada a técnicas de ajuste de “design” e modificação de vias metabólicas desejáveis nas sementes, a chamada *Biologia Sintética*.

Estudos futuros envolvendo a expressão de proteínas recombinantes em sementes de soja irão contribuir sobremaneira para o desenvolvimento de tecnologias de produção de fármacos baseadas em plantas. O sucesso dessa previsão irá depender diretamente da otimização dos níveis de expressão, algo que pode ser alcançado com a aposta em novas combinações de seqüências regulatórias no *cassete* de expressão e no aumento da estabilidade protéica proporcionada pela compartimentalização em organelas como os PSVs.

5) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abud S, Souza PIM, Moreira CT, Andrade, et al. (2003). Dispersão de pólen em soja transgênica na região do Cerrado. *Pesquisa agropecuária brasileira*. 38: 1229-1235.

Acar K, Yagci M, Sucak GT and Haznedar R (2006). Isolated prolonged activated partial thromboplastin time in an asymptomatic patient: Fletcher factor deficiency. *Thrombosis Research*. 118: 765-766.

Adler AI and Turner RC (1999). The diabetes prevention program. *Diabetes Care*. 22: 543-545.

Allen DB (2006). Growth Hormone Therapy for Short Stature: Is the Benefit Worth the Burden? *Pediatrics*. 118: 343-348.

Allen RD, Bernier F, Lessard PA and Beachy RN (1989). Nuclear Factors Interact with a Soybean [beta]-Conglycinin Enhancer. *The Plant Cell*. 1: 623-631.

Altpeter F, Baisakh N, Beachy R, Bock R, et al. (2005). Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. *Molecular Breeding*. 15: 305-327.

Apte-Deshpande A, Rewanwar S, Kotwal P, Raiker VA, et al. (2009). Efficient expression and secretion of recombinant human growth hormone in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: potential applications for other proteins. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 54: 197-205.

Aragão FJL and Rech EL (1997). Morphological factors influencing recovery of transgenic bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) of a carioca cultivar. *Int J Plant Sci*. 158: 157-163.

Aragão FJL, Sarokin L, Vianna GR and Rech EL (2000). Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. *TAG Theoretical and Applied Genetics*. 101: 1-6.

Arruda VR, Schuettrumpf J, Herzog RW, Nichols TC, et al. (2004). Safety and efficacy of factor IX gene transfer to skeletal muscle in murine and canine hemophilia B models by adeno-associated viral vector serotype 1. *Blood*. 103: 85-92.

Barta A, Sommergruber K, Thompson D, Hartmuth K, et al. (1986). The expression of a nopaline synthase — human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Molecular Biology*. 6: 347-357.

Becker GW and Hsiung HM (1986). Expression, secretion and folding of human growth hormone in *Escherichia coli*: Purification and characterization. *FEBS Letters*. 204: 145-150.

- Berg P and Mertz JE (2010). Personal Reflections on the Origins and Emergence of Recombinant DNA Technology. *Genetics*. 184: 9-17.
- Bidlingmaier M, Strasburger CJ, Thieme D and Hemmersbach P (2010). Growth Hormone Doping in Sports: Biochemical Principles, Effects and Analysis. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 195: 187-200.
- Bohnsack MT and Schleiff (2010). The evolution of protein targeting and translocation systems. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1803: 1115-1130.
- Bonfim K, Faria JC, Nogueira EOPL, Mendes ãrA, et al. (2007). RNAi-Mediated Resistance to Bean golden mosaic virus in Genetically Engineered Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20: 717-726.
- Boothe J, Nykiforuk C, Shen Y, Zaplachinski S, et al. (2010). Seed-based expression systems for plant molecular farming. *Plant Biotechnology Journal*. 8: 588-606.
- Borisjuk NV, Borisjuk LG, Logendra S, Petersen F, et al. (1999). Production of recombinant proteins in plant root exudates. *Nat Biotech*. 17: 466-469.
- Brasileiro ACM and Carneiro VT (1998). Introdução à Transformação Genética de Plantas. In *Manual de Transformação Genética de Plantas*, E. Cenargen, ed (Brasilia: Embrapa Cenargen), 13-16.
- Bristol JA, Furie BC and Furie B (1993). Propeptide processing during factor IX biosynthesis. Effect of point mutations adjacent to the propeptide cleavage site. *Journal of Biological Chemistry*. 268: 7577-7584.
- Buchacher A, Schulz P, Choromanski J, Schwinn H, et al. (1998). High-performance capillary electrophoresis for in-process control in the production of antithrombin III and human clotting factor IX. *Journal of Chromatography A*. 802: 355-366.
- Campbell BT, Baenziger PS, et al. (2000). Inheritance of multiple transgenes in wheat. *Crop Science*. 40: 1133-1141.
- Cançado LJ (2002). Utilização de Sementes de Tabaco Transgênico como Biorreatores para Produção de um Fragmento scFv de um Anticorpo Monoclonal. In *Instituto de Biologia Celular* (Campinas: Universidade Estadual de Campinas UNICAMP), pp. 78.
- Cantoral R, Fernández-Quintela A, Martínez JA, Macarulla MT (1995) Comparative study of the composition and nutritional value of the seeds and protein concentrations in legumes. *Arch Latinoam Nutr*. 45: 242-248.

- Castro OM, Prado HD, SevedoI ACR and CardosoI EJBN. (1993). Avaliação da atividade de microrganismos do solo em diferentes sistemas de manejo de soja. *Scientia Agricola*. 50: 212-219.
- Carrillo C, Wigdorovitz A, Oliveros JC, Zamorano PI, et al. (1998). Protective Immune Response to Foot-and-Mouth Disease Virus with VP1 Expressed in Transgenic Plants. *Journal of virology*. 72: 1688-1690.
- Cavazzoni J, Volk T, Bugbee B and Dougher T (1999). Phasic temperature and photoperiod control for soybean using a modified CROPGRO model. *Life Support Biosph Sci*. 6: 273-278.
- Chang CN, Key M, Bochner B, Heyneker H, et al. (1987). High-level secretion of human growth hormone by *Escherichia coli*. *Gene*. 55: 189-196.
- Chargelegue D, Vine ND, van Dolleweerd CJ, Drake PMW, et al. (2000). A murine monoclonal antibody produced in transgenic plants with plant-specific glycans is not immunogenic in mice. *Transgenic Research*. 9: 187-194.
- Chen H, Yao H, Huang L, Shen Q, et al. (2006). Expression of human factor IX gene in murine plasma through lentiviral vector-infected haematopoietic stem cells. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 33: 1196-1201.
- Chen M, Liu X, Wang Z, Song J, et al. (2005). Modification of plant N-glycans processing: The future of producing therapeutic protein by transgenic plants. *Medicinal Research Reviews*. 25: 343-360.
- Chen ZL, Schuler MA and Beachy RN (1986). Functional analysis of regulatory elements in a plant embryo-specific gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 83: 8560-8564.
- Cholin S, Bieth E, Molinas C, Cahoreau C, et al. (1996). Expression of a recombinant human growth hormone binding protein in baculovirus/insect cell system. *Biochimie*. 78: 882-886.
- Chong DKX and Langridge WHR (2000). Expression of full-length bioactive antimicrobial human lactoferrin in potato plants. *Transgenic Research*. 9: 71-78.
- Christou P, McCabe DE and Swain WF (1988). Stable Transformation of Soybean Callus by DNA-Coated Gold Particles. *Plant Physiology*. 87: 671-674.
- Commandeur U, Twyman RM and Fischer (2003). The biosafety of molecular farming in plants. *AgBiotechNet*. 110: 1-9.

- Cramer CL, Boothe JG and Oishi KK (1999). Transgenic plants for therapeutic proteins: linking upstream and downstream strategies. *Current topics in microbiology and immunology*. 240: 95-118.
- Cunha N (2008). Expressão de cinco diferentes proteínas de interesse farmacológico em sementes transgênicas de soja [*Glycine max* L. (Merril)]. In *Programa de Pós Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia* (Brasília: Universidade Católica de Brasília UCB), pp. 123.
- Cunha N, Murad A, Cipriano T, Araújo A, et al. (2011a). Expression of functional recombinant human growth hormone in transgenic soybean seeds. *Transgenic Research*. 20: 811-826.
- Cunha N, Murad A, Ramos G, Maranhão A, et al. (2011b). Accumulation of functional recombinant human coagulation factor IX in transgenic soybean seeds. *Transgenic Research*. 20: 841-855.
- Cunha NB, Araújo ACG, Leite A, Murad AM, Vianna GR and Rech EL (2010c). Correct Targeting of Proinsulin in Protein Storage Vacuoles of Transgenic Soybean Seeds. *Genetics and Molecular Research*. 9: 1163-1170.
- Daniell H, Streatfield SJ and Wycoff K (2001). Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Science*. 6: 219-226.
- de Freitas FA, Yunes JA, da Silva MJ, Arruda P, et al. (1994). Structural characterization and promoter activity analysis of the γ -kafirin gene from sorghum. *Molecular and General Genetics MGG*. 245: 177-186.
- Delaney D (2002). Plant Biotechnology. In *Proceedings of the 10th IAPTC&B Congress*, I. Vasil, ed (Orlando, Florida: Kluwer Academic), pp. 393-394.
- Dellaporta S, Wood J and Hicks J (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1: 19-21.
- De Lucca PC (2003). Produção dos hormônios recombinantes de crescimento e da pró-insulina humanos em plantas de milho. In *Instituto de Biologia Celular* (Campinas: Universidade Estadual de Campinas UNICAMP), pp. 89.
- Demain AL and Vaishnav P (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*. 27: 297-306.

- Denbow DM, Grabau EA, Lacy GH, Kornegay ET, et al. (1998). Soybeans transformed with a fungal phytase gene improve phosphorus availability for broilers. *Poultry Science*. 77: 878-881.
- DeRose RT, Begum D and Hall TC (1996). Analysis of kafirin promoter activity in transgenic tobacco seeds. *Plant Molecular Biology*. 32: 1029-1035.
- Desai PN, Shrivastava N and Padh H (2010). Production of heterologous proteins in plants: Strategies for optimal expression. *Biotechnology Advances*. 28: 427-435.
- Doyle JJ and Doye JL (1987). Rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochemical Bulletin*. 19: 11-15.
- Doyle JJ, Schuler MA, Godette WD, Zenger V, et al. (1986). The glycosylated seed storage proteins of *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris*. Structural homologies of genes and proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 261: 9228-9238.
- Drakakaki G, Marcel S, Arcalis E, Altmann F, et al. (2006). The Intracellular Fate of a Recombinant Protein Is Tissue Dependent. *Plant Physiology*. 141: 578-586.
- Düring K, Hippe S, Kreuzaler F and Schell J (1990). Synthesis and self-assembly of a functional monoclonal antibody in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology*. 15: 281-293.
- Egelkrout E, Rajan V and Howard JA (2012). Overproduction of recombinant proteins in plants. *Plant Science*. 184: 83-101.
- Fernández-San Millán A, Mingo-Castel A, Miller M and Daniell H (2003). A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify Human Serum Albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. *Plant Biotechnology Journal*. 1: 71-79.
- Fiddes JC, Seeburg PH, DeNoto FM, Hallewell RA, et al. (1979). Structure of genes for human growth hormone and chorionic somatomammotropin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 76: 4294-4298.
- Fiedler U and Conrad U (1995). High-Level Production and Long-Term Storage of Engineered Antibodies in Transgenic Tobacco Seeds. *Nat Biotech*. 13: 1090-1093.
- Filikov AV, Hayes RJ, Luo P, Stark DM, et al. (2002). Computational stabilization of human growth hormone. *Protein Science*. 11: 1452-1461.

- Finer J and McMullen M (1991). Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant*. 27: 175-182.
- Finnegan J and McElroy D (1994). Transgene Inactivation: Plants Fight Back! *Nat Biotech*. 12: 883-888.
- Fischer R, Stöger E, Schillberg S, Christou P, et al. (2004). Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Plant Biology*. 7: 152-158.
- Franchi E, Maisano F, Testori SA, Galli G, et al. (1991). A new human growth hormone production process using a recombinant *Bacillus subtilis* strain. *Journal of Biotechnology*. 18: 41-54.
- Francisco JA, Gawlak SL, Miller M, Bathe J, et al. (1997). Expression and Characterization of Bryodin 1 and a Bryodin 1-Based Single-Chain Immunotoxin from Tobacco Cell Culture. *Bioconjugate Chemistry*. 8: 708-713.
- Fujiwara T and Beachy RN (1994). Tissue-specific and temporal regulation of a beta-conglycinin gene: roles of the RY repeat and other cis-acting elements. *Plant Molecular Biology*. 24: 261-272.
- Furie B and Furie BC (1988). The molecular basis of blood coagulation. *Cell*. 53: 505-518.
- Giddings G, Allison G, Brooks D and Carter A (2000). Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nat Biotech*. 18: 1151-1155.
- Gils M, Kandzia R, Marillonnet S, Klimyuk V, et al. (2005). High-yield production of authentic human growth hormone using a plant virus-based expression system. *Plant Biotechnology Journal*. 3: 613-620.
- Gleba Y, Klimyuk V and Marillonnet S (2005). Magniffectionâ€”a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine*. 23: 2042-2048.
- Goeddel DV, Heyneker HL, Hozumi T, Arentzen R, et al. (1979). Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature*. 281: 544-548.
- Goldenberg NA, Bombardier C, Hathaway WE, McFarland K, et al. (2008). Influence of factor IX on overall plasma coagulability and fibrinolytic potential as measured by global assay: monitoring in haemophilia B. *Haemophilia*. 14: 68-77.

- Goldman J, Baldwin D, Rubenstein AH, Klink DD, et al. (1979). Characterization of circulating insulin and proinsulin-binding antibodies in autoimmune hypoglycemia. *The Journal of Clinical Investigation*. 63: 1050-1059.
- Gomord V, Fichette A-C, Menu-Bouaouiche L, Saint-Jore-Dupas C, et al. (2010). Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant Biotechnology Journal*. 8: 564-587.
- Gomord V, Sourrouille C, Fichette A-C, Bardor M, et al. (2004). Production and glycosylation of plant-made pharmaceuticals: the antibodies as a challenge. *Plant Biotechnology Journal*. 2: 83-100.
- Graef G, LaVallee BJ, Tenopir P, Tat M, et al. (2009). A high-oleic-acid and low-palmitic-acid soybean: agronomic performance and evaluation as a feedstock for biodiesel. *Plant Biotechnology Journal*. 7: 411-421.
- Hansen G, Das A and Chilton MD (1994). Constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91: 7603-7607.
- Hens JR, Amstutz MD, Schanbacher FL and Mather IH (2000). Introduction of the human growth hormone gene into the guinea pig mammary gland by in vivo transfection promotes sustained expression of human growth hormone in the milk throughout lactation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1523: 161-171.
- Hiatt A, Cafferkey R and Bowdish K (1989). Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*. 342: 76-78.
- Hindmarsh PC and Brook CG (1987). Effect of growth hormone on short normal children. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 295: 573-577.
- Hjernø K (2006). Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics *Methods in molecular biology*. 367: 61-75.
- Hobbs SLA, Warkentin TD and DeLong CMO (1993). Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. *Plant Molecular Biology*. 21: 17-26.
- Hoffer L, Schwinn H and JosiÄ¶ D (1999). Production of highly purified clotting factor IX by a combination of different chromatographic methods. *Journal of Chromatography A*. 844: 119-128.

- Hofte H and Chrispeels MJ (1992). Protein Sorting to the Vacuolar Membrane. *The Plant Cell*. 4: 995-1004.
- Hohl I, Robinson DG, Chrispeels MJ and Hinz G (1996). Transport of storage proteins to the vacuole is mediated by vesicles without a clathrin coat. *Journal of Cell Science*. 109: 2539-2550.
- Hood EE and Jilka JM (1999). Plant-based production of xenogenic proteins. *Current Opinion in Biotechnology*. 10: 382-386.
- Hood EE, Woodard SL and Horn ME (2002). Monoclonal antibody manufacturing in transgenic plants – myths and realities. *Current Opinion in Biotechnology*. 13: 630-635.
- Hooykaas PJ and Schilperoort RA (1992). Agrobacterium and plant genetic engineering. *Plant Mol Biol*. 19: 15-38.
- Horvath H, Huang J, Wong O, Kohl E, et al. (2000). The production of recombinant proteins in transgenic barley grains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 1914-1919.
- Houdebine LM (2009). Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 32: 107-121.
- Howard JA (2005). Commercialization of Biopharmaceutical and Bioindustrial Proteins from Plants. *Crop Science*. 45: 468-472.
- Imoto Y, Yamada T, Kitamura K, Kanazawa A (2008). Spatial and temporal control of transcription of the soybean beta-conglycinin alpha subunit gene is conferred by its proximal promoter region and accounts for the unequal distribution of the protein during embryogenesis. *Genes Genet Syst*. 83: 469-476.
- Jacobs PP and Callewaert N (2009). N-glycosylation engineering of biopharmaceutical expression systems. *Curr Mol Med*. 9: 774-800.
- Jaeger GD, Scheffer S, Jacobs A, Zambre M, et al. (2002). Boosting heterologous protein production in transgenic dicotyledonous seeds using *Phaseolus vulgaris* regulatory sequences. *Nat Biotech*. 20: 1265-1268.
- Jallat S, Perraud F, Dalemans W, Balland A, et al. (1990). Characterization of recombinant human factor IX expressed in transgenic mice and in derived trans-immortalized hepatic cell lines. *EMBO J*. 9: 3295–3301.

- James C (2010). A global overview of biotech (GM) crops: Adoption, impact and future prospects. *GM Crops and Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain*. 1: 8-12.
- Jolliffe NA, Craddock CP and Frigerio L (2005). Pathways for protein transport to seed storage vacuoles. *Biochem Soc Trans*. 33: 1016-1018.
- Jung R, Scott MP, Nam Y-W, Beaman TW, et al. (1998). The Role of Proteolysis in the Processing and Assembly of 11S Seed Globulins. *The Plant Cell*. 10: 343-358.
- Kadonookuda K, Yamamoto M, Higashino Y, Taniai K, et al. (1995). Baculovirus-Mediated Production of the Human Growth Hormone in Larvae of the Silkworm, *Bombyx mori*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 213: 389-396.
- Kantolic AG and Slafer GA (2007). Development and Seed Number in Indeterminate Soybean as Affected by Timing and Duration of Exposure to Long Photoperiods after Flowering. *Annals of Botany*. 99: 925-933.
- Kar K. and Sen, S (1991). A comparative Karyological study of root and embryo tissue of a few genera of leguminosae. *Cytologia* 56: 403-408.
- Katsube T, Kurisaka N, Ogawa M, Maruyama N, et al. (1999). Accumulation of Soybean Glycinin and Its Assembly with the Glutelins in Rice. *Plant Physiology*. 120: 1063-1074.
- Kaufman RJ, Wasley LC, Furie BC, Furie B, et al. (1986). Expression, purification, and characterization of recombinant gamma-carboxylated factor IX synthesized in Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biological Chemistry*. 261: 9622-9628.
- Kaufmann JE, Irminger JC, Mungall J and Halban PA (1997). Proinsulin conversion in GH3 cells after coexpression of human proinsulin with the endoproteases PC2 and/or PC3. *Diabetes*. 46: 978-982.
- Kawakatsu T and Takaiwa F (2010). Cereal seed storage protein synthesis: fundamental processes for recombinant protein production in cereal grains. *Plant Biotechnology Journal*. 8: 939-953.
- Kay MA, Manno CS, Ragni MV, Larson PJ, et al. (2000). Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet*. 24: 257-261.
- Khoudi H, Laberge S, Ferullo J-M, Bazin R, et al. (1999). Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants. *Biotechnology and Bioengineering*. 64: 135-143.

- Kim W-S and Krishnan HB (2004). Expression of an 11 kDa methionine-rich delta-zein in transgenic soybean results in the formation of two types of novel protein bodies in transitional cells situated between the vascular tissue and storage parenchyma cells. *Plant Biotechnology Journal*. 2: 199-210.
- Kjeldsen T, Pettersson AF and Hach M (1999). Secretory expression and characterization of insulin in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Appl Biochem*. 29: 79-86.
- Kohli A, Twyman RM, Abranches R, Wegel E, et al. (2003). Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Molecular Biology*. 52: 247-258.
- Komarnytsky S, Borisjuk NV, Borisjuk LG, Alam MZ, et al. (2000). Production of Recombinant Proteins in Tobacco Guttation Fluid. *Plant Physiology*. 124: 927-934.
- Kumar S and Fladung M (2001). Controlling transgene integration in plants. *Trends in Plant Science*. 6: 155-159.
- Kurachi K and Davie EW (1982). Isolation and characterization of a cDNA coding for human factor IX. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 79: 6461-6464.
- Kusnadi AR, Nikolov ZL and Howard JA (1997). Production of recombinant proteins in transgenic plants: Practical considerations. *Biotechnology and Bioengineering*. 56: 473-484.
- Lambert T, Recht M, Valentino LA, Powell JS, et al. (2007). Reformulated BeneFix®: efficacy and safety in previously treated patients with moderately severe to severe haemophilia B. *Haemophilia*. 13: 233-243.
- Lamphear BJ, Streatfield SJ, Jilka JM, Brooks CA, et al. (2002). Delivery of subunit vaccines in maize seed. *Journal of Controlled Release*. 85: 169-180.
- Larrick JW and Thomas DW (2001). Producing proteins in transgenic plants and animals. *Current Opinion in Biotechnology*. 12: 411-418.
- Lau OS and Sun SSM (2009). Plant seeds as bioreactors for recombinant protein production. *Biotechnology Advances*. 27: 1015-1022.
- Lee D and Natesan E (2006). Evaluating genetic containment strategies for transgenic plants. *Trends in Biotechnology*. 24: 109-114.
- Leite A, Kemper EL, da Silva MJ, Luchessi AD, et al. (2000). Expression of correctly processed human growth hormone in seeds of transgenic tobacco plants. *Molecular Breeding*. 6: 47-53.

- Limentani, SA, Gowell, KP, et al. (1995). In vitro characterization of high purity factor IX concentrates for the treatment of hemophilia B. *Anglais*. 73:
- Limonta JM, Castro FO, MartÃ-nez R, Puentes P, et al. (1995). Transgenic rabbits as bioreactors for the production of human growth hormone. *Journal of Biotechnology*. 40: 49-58.
- Lisauskas S, Cunha N, Vianna G, Mendes É, et al. (2008). Expression of functional recombinant human factor IX in milk of mice. *Biotechnology Letters*. 30: 2063-2069.
- Liu HW, Ofofu FA and Chang PL (1993). Expression of human factor IX by microencapsulated recombinant fibroblasts. *Hum Gene Ther*. 4: 291-301.
- Luthra R and Medeiros LJ (2004). Isothermal Multiple Displacement Amplification: A Highly Reliable Approach for Generating Unlimited High Molecular Weight Genomic DNA from Clinical Specimens. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 6: 236-242.
- Ma JK., Hiatt A, Hein M, Vine ND, et al. (1995). Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science*. 268: 716-719.
- Ma JKC, Hikmat BY, Wycoff K., Vine ND, et al. (1998). Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat Med*. 4: 601-606.
- Ma SW, Zhao DL, Yin ZQ, Mukherjee R, et al. (1997). Transgenic plants expressing autoantigens fed to mice to induce oral immune tolerance. *Nat Med*. 3: 793-796.
- Ma JKC, Chikwamba R, Sparrow P, Fischer R, et al. (2005). Plant-derived pharmaceuticals – the road forward. *Trends in Plant Science*. 10: 580-585.
- Ma JKC, Drake PMW and Christou P (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet*. 4: 794-805.
- Mason HS, Lam DM and Arntzen CJ (1992). Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89: 11745-11749.
- Matsumoto S, Ikura K, Ueda M and Sasaki R (1995). Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells. *Plant Molecular Biology*. 27: 1163-1172.
- Mayfield SP, Franklin SE and Lerner RA (2003). Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100: 438-442.

- McCormick AA, Kumagai MH, Hanley K, Turpen TH, et al. (1999). Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single-chain Fv epitopes in tobacco plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96: 703-708.
- McGarvey PB, Hammond J, Dienelt MM, Hooper DC, et al. (1995). Expression of the Rabies Virus Glycoprotein in Transgenic Tomatoes. *Nat Biotech*. 13: 1484-1487.
- Meyer P and Saedler H (1996). Homology-dependent gene silencing in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 47: 23-48.
- Miao CH, Thompson AR, Loeb K and Ye X (2001). Long-Term and Therapeutic-Level Hepatic Gene Expression of Human Factor IX after Naked Plasmid Transfer in Vivo. *Mol Ther*. 3: 947-957.
- Mishra A, Tomar A, Bansal S, Khanna V, et al. (2008). Temporal and spatial expression analysis of γ kafirin promoter from Sorghum (*Sorghum bicolor* L. moench) var. M 35-1. *Molecular Biology Reports*. 35: 81-88.
- Molvig L, Tabe LM, Eggum BO, Moore AE, et al. (1997). Enhanced methionine levels and increased nutritive value of seeds of transgenic lupins (*Lupinus angustifolius* L.) expressing a sunflower seed albumin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94: 8393-8398.
- Montchamp-Moreau C, Ronsseray S, Jacques M, Lehmann M, et al. (1993). Distribution and conservation of sequences homologous to the 1731 retrotransposon in *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution*. 10: 791-803.
- Moravec T, Schmidt MA, Herman EM and Woodford-Thomas T (2007). Production of *Escherichia coli* heat labile toxin (LT) B subunit in soybean seed and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine. *Vaccine*. 25: 1647-1657.
- Müntz K (1998). Deposition of storage proteins. *Plant Molecular Biology*. 38: 77-99.
- Nathwani AC, Davidoff AM, Hanawa H, Hu Y, et al. (2002). Sustained high-level expression of human factor IX (hFIX) after liver-targeted delivery of recombinant adeno-associated virus encoding the hFIX gene in rhesus macaques. *Blood*. 100: 1662-1669.
- Nilsson J, Jonasson P, Samuelsson E, Stahl S, et al. (1996). Integrated production of human insulin and its C-peptide. *Journal of Biotechnology*. 48: 241-250.

- Nykiforuk CL, Boothe JG, Murray EW, Keon RG, et al. (2006). Transgenic expression and recovery of biologically active recombinant human insulin from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Biotechnology Journal*. 4: 77-85.
- Obembe OO, Popoola JO, Leelavathi S and Reddy SV (2011). Advances in plant molecular farming. *Biotechnology Advances*. 29: 210-222.
- Osterud B and Rapaport SI (1977). Activation of Factor IX by the Reaction Product of Tissue Factor and Factor VII: Additional Pathway for Initiating Blood Coagulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74: 5260-5264.
- Ottoboni LM, Leite A, Yunes JA, Targon ML, et al. (1993). Sequence analysis of 22 kDa-like alpha-coixin genes and their comparison with homologous zein and kafirin genes reveals highly conserved protein structure and regulatory elements. *Plant Mol Biol*. 21: 765-778.
- Ow DW, Jacobs JD and Howell SH (1987). Functional regions of the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter determined by use of the firefly luciferase gene as a reporter of promoter activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 84: 4870-4874.
- Özdamar TH, Şentürk B, Yılmaz ÖD, Çalık G, et al. (2009). Expression system for recombinant human growth hormone production from *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Progress*. 25: 75-84.
- Ozelo MC, VillaÇA PR, De Almeida JOS, Bueno TMF, et al. (2007). A cost evaluation of treatment alternatives for mild-to-moderate bleeding episodes in patients with haemophilia and inhibitors in Brazil. *Haemophilia*. 13: 462-469.
- Padgett SR, Kolacz KH, Delannay X, Re DB, et al. (1995). Development, identification, and characterization of a glyphosate tolerant soybean line. *Crop science*. 35: 1451-1461.
- Patlak M (2002). Combating diabetes. *FASEB J*. 16: 1853.
- Paul M, Dolleweerd Cv, Drake PMW, Reljic R, et al. (2011). Molecular pharming: Future targets and aspirations. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 7: 375-382.
- Paul M and Ma JKC (2011). Plant-made pharmaceuticals: Leading products and production platforms. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 58: 58-67.
- Pennisi P, Gavrilova O, Setser-Portas J, Jou W, et al. (2006). Recombinant Human Insulin-Like Growth Factor-I Treatment Inhibits Gluconeogenesis in a Transgenic Mouse Model of Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocrinology*. 147: 2619-2630.

- Philip R, Darnowski DW, Maughan PJ and Vodkin LO (2001). Processing and localization of bovine β -casein expressed in transgenic soybean seeds under control of a soybean lectin expression cassette. *Plant Science*. 161: 323-335.
- Popelka JC, Xu J and Altpeter F (2003). Generation of rye (*Secale cereale* L.) plants with low transgene copy number after biolistic gene transfer and production of instantly marker-free transgenic rye. *Transgenic Research*. 12: 587-596.
- Rabindran S, Stevenson N, Roy G, Fedorkin O, et al. (2009). Plant-produced human growth hormone shows biological activity in a rat model. *Biotechnology Progress*. 25: 530-534.
- Ragni MV, Pasi KJ, White GC, Giangrande PL, et al. (2002). Use of recombinant factor IX in subjects with haemophilia B undergoing surgery. *Haemophilia*. 8: 91-97.
- Ramírez N, Oramas P, Ayala M, Rodríguez M, et al. (2001). Expression and long-term stability of a recombinant single-chain Fv antibody fragment in transgenic *Nicotiana tabacum* seeds. *Biotechnology Letters*. 23: 47-49.
- Rech EL, Aragão FJL and Vianna GR (1997). A routine and variety independent system to obtain transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) plants. In *II Encontro Brasileiro de Biotecnologia Vegetal* (Gramado) pp. 33-38.
- Rech EL (2012). Seeds, recombinant DNA and biodiversity. *Seed Science Research*. 22: S36-S44.
- Rech EL, Vianna GR and Aragao FJL (2008). High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. *Nat Protocols*. 3: 410-418.
- Rech EL, Ulbrich A, Aragão FJL, Louzano L, et al. (2010). Soybean Event 127 and Methods Related Thereto WO/2010/080829. Patent.
- Ribeiro CW, Soares-Costa A, Falco MC, Chabregas SM, et al. (2008). Production of a His-tagged canecystatin in transgenic sugarcane and subsequent purification. *Biotechnology Progress*. 24: 1060-1066.
- Rincon-Limas DE, Resendez-Perez D, Ortiz-Lopez R, Alvidrez-Quihui LE, et al. (1993). HGH isoforms: cDNA expression, adipogenic activity and production in cell culture. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. 1172: 49-54.
- Robić G, Farinas C, Rech E and Miranda E (2010). Transgenic Soybean Seed as Protein Expression System: Aqueous Extraction of Recombinant β -Glucuronidase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 160: 1157-1167.

- Robic G, Farinas CS, Rech EL, Bueno SMA, et al. (2006). Downstream process engineering evaluation of transgenic soybean seeds as host for recombinant protein production. *Biochemical Engineering Journal*. 32: 7-12.
- Rohila JS, Chen M, Cerny R and Fromm ME (2004). Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. *The Plant Journal*. 38: 172-181.
- Roth DA, Kessler CM, Pasi KJ, Rup B, et al. (2001). Human recombinant factor IX: safety and efficacy studies in hemophilia B patients previously treated with plasma-derived factor IX concentrates. *Blood*. 98: 3600-3606.
- Rother KI (2007). Diabetes Treatment " Bridging the Divide. *The New England journal of medicine*. 356: 1499-1501.
- Rowland JE, Marshall NJ, Leung K-c, Ho KKY, et al. (2002). A novel bioassay for human somatogenic activity in serum samples supports the clinical reliability of immunoassays. *Clinical Endocrinology*. 56: 475-485.
- Ruggiero F, Exposito JY, Bournat P, Gruber V, et al. (2000). Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants. *FEBS Letters*. 469: 132-136.
- Russell DA, Spatola LA, Dian T, Paradkar VM, et al. (2005). Host limits to accurate human growth hormone production in multiple plant systems. *Biotechnology and Bioengineering*. 89: 775-782.
- Russo E (2003). Special Report: The birth of biotechnology. *Nature*. 421: 456-457.
- Saint-Jore-Dupas C, Faye Lc and Gomord Vr (2007). From planta to pharma with glycosylation in the toolbox. *Trends in Biotechnology*. 25: 317-323.
- Sairam RV, Parani M, Franklin G, Lifeng Z, et al. (2003). Shoot meristem: an ideal explant for *Zea mays* L. transformation. *Genome*. 46: 323-329.
- Salamone D, BaraÃ±o L, Santos C, Bussmann L, et al. (2006). High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. *Journal of Biotechnology*. 124: 469-472.
- Sambrook J, Russell DW (2001). Commonly used techniques in molecular cloning. In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, Appendix 8-A8.20

- Sanchez O, Toledo JR, Rodriguez MP, Castro FO (2004). Adenoviral vector mediates high expression levels of human growth hormone in the milk of mice and goats. *J Biotechnol.* 114:89-97.
- Sanford JC, Klein TM, Wolf ED and Allen N (1987). Delivery of substances into cells tissues using a particle bombardment process. *Journal Particulate Science Technology.* 5: 27-37.
- Schmidt MA and Herman EM (2008). Proteome rebalancing in soybean seeds can be exploited to enhance foreign protein accumulation. *Plant Biotechnology Journal.* 6: 832-842.
- Shapiro AD, Paola JD, Cohen A, Pasi KJ, et al. (2005). The safety and efficacy of recombinant human blood coagulation factor IX in previously untreated patients with severe or moderately severe hemophilia B. *Blood.* 105: 518-525.
- Sharma AK and Sharma MK (2009). Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances.* 27: 811-832.
- Sharma VK, Hänsch R, Mendel RR and Schulze J (2004). A highly efficient plant regeneration system through multiple shoot differentiation from commercial cultivars of barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.) using meristematic shoot segments excised from germinated mature embryos. *Plant Cell Reports.* 23: 9-16.
- Shi R, Huang Y, Wang D, Zhao M, et al. (2006). Expression and characterization of insulin growth factor-I-enhanced green fluorescent protein fused protein as a tracer for immunoassay. *Analytica Chimica Acta.* 578: 131-136.
- Shin N-K, Kim D-Y, Shin C-S, Hong M-S, et al. (1998). High-level production of human growth hormone in Escherichia coli by a simple recombinant process. *Journal of Biotechnology.* 62: 143-151.
- Sijmons PC, Dekker BMM, Schrammeijer B, Verwoerd TC, et al. (1990). Production of Correctly Processed Human Serum Albumin in Transgenic Plants. *Nat Biotech.* 8: 217-221.
- Silva JC, Denny R, Dorschel CA, Gorenstein M, et al. (2005). Quantitative Proteomic Analysis by Accurate Mass Retention Time Pairs. *Analytical Chemistry.* 77: 2187-2200.
- Silva JC, Gorenstein MV, Li G-Z, Vissers JPC, et al. (2006). Absolute Quantification of Proteins by LCMSE. *Molecular & Cellular Proteomics.* 5: 144-156.
- Spök A and Karner S (2008). Plant Molecular Farming. *Opportunities and Challenges. Final Report.* Seville: The Institute for Prospective Technological Studies. p. 148.

Staub JM, Garcia B, Graves J, Hajdukiewicz PTJ, et al. (2000). High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat Biotech.* 18: 333-338.

Steiner DF, Rouille Y, Gong Q, Martin S, et al. (1996). The role of prohormone convertases in insulin biosynthesis: evidence for inherited defects in their action in man and experimental animals. *Diabetes Metab.* 22: 94-104.

Stöger E, Ma JKC, Fischer R and Christou P (2005). Sowing the seeds of success: pharmaceutical proteins from plants. *Current Opinion in Biotechnology.* 16: 167-173.

Stöger E, Sack M, Perrin Y, Vaquero C, et al. (2002). Practical considerations for pharmaceutical antibody production in different crop systems. *Molecular Breeding.* 9: 149-158.

Stöger E, Vaquero C, Torres E, Sack M, et al. (2000). Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Molecular Biology.* 42: 583-590.

Streatfield SJ (2007). Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. *Plant Biotechnology Journal.* 5: 2-15.

Sussulini A, Garcia JS, Mesko MF, Moraes DP, et al. (2007). Evaluation of soybean seed protein extraction focusing on metalloprotein analysis. *Microchimica Acta.* 158: 173-180.

Tackaberry ES, Dudani AK, Prior F, Tocchi M, et al. (1999). Development of biopharmaceuticals in plant expression systems: cloning, expression and immunological reactivity of human cytomegalovirus glycoprotein B (UL55) in seeds of transgenic tobacco. *Vaccine.* 17: 3020-3029.

Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Estes MK, et al. (2000). Human Immune Responses to a Novel Norwalk Virus Vaccine Delivered in Transgenic Potatoes. *The Journal of Infectious diseases.* 182: 302-305.

Takaiwa F, Takagi H, Hirose S and Wakasa Y (2007). Endosperm tissue is good production platform for artificial recombinant proteins in transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal.* 5: 84-92.

Terashima M, Murai Y, Kawamura M, Nakanishi S, et al. (1999). Production of functional human α -1-antitrypsin by plant cell culture. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 52: 516-523.

Tokunaga T, Iwai S, Gomi H, Kodama K, et al. (1985). Expression of a synthetic human growth hormone gene in yeast. *Gene.* 39: 117-120.

- Torres E, Vaquero C, Nicholson L, Sack M, et al. (1999). Rice cell culture as an alternative production system for functional diagnostic and therapeutic antibodies. *Transgenic Research*. 8: 441-449.
- Travella S, Ross SM, Harden J, Everett C, et al. (2005). A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and Agrobacterium-mediated techniques. *Plant Cell Reports*. 23: 780-789.
- Tremblay R, Wang D, Jevnikar AM and Ma S (2010). Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. *Biotechnology Advances*. 28: 214-221.
- Twyman RM, Stöger E, Schillberg S, Christou P, et al. (2003). Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology*. 21: 570-578.
- Vaquero C, Sack M, Chandler J, Drossard Jr, et al. (1999). Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96: 11128-11133.
- Vasil I (2008). A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Reports*. 27: 1423-1440.
- Verch T, Yusibov V and Koprowski H (1998). Expression and assembly of a full-length monoclonal antibody in plants using a plant virus vector. *Journal of Immunological Methods*. 220: 69-75.
- Verma D, Moghimi B, LoDuca PA, Singh HD, et al. (2010). Oral delivery of bioencapsulated coagulation factor IX prevents inhibitor formation and fatal anaphylaxis in hemophilia B mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107: 7101-7106.
- Vernetti FJ (1983). Soja - Planta, Clima, Pragas, Moléstias e Invasoras (Campinas: Fundação Cargill), pp. 990.
- Vianna GR (2002). Obtenção de Plantas Transgênicas de Soja (*Glycine Max* (L.) Merrill) e Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) com Tolerância a Herbicidas. In *Departamento de Biologia Celular* (Brasília: Universidade de Brasília), pp. 194.
- Vianna GR, Cunha NB, Murad AM and Rech EL (2011). Soybeans as bioreactors for biopharmaceuticals and industrial proteins. *Genet. Mol. Res*. 10: 1733 – 1752.
- Vianna GR, Cunha NB and Rech EL (2011). Expression and accumulation of heterologous molecules in the protein storage vacuoles of soybean seeds. *Protocol Exchange*. doi:10.1038/protex.2011.206
Published online 1 February 2011.

Vitale A and Raikhel NV (1999). What do proteins need to reach different vacuoles? *Trends in Plant Science*. 4: 149-155.

von Waldthausen D, Schneider M, Renner-Müller I, Rauleder D, et al. (2008). Systemic overexpression of growth hormone (GH) in transgenic FVB/N inbred mice: an optimized model for holistic studies of molecular mechanisms underlying GH-induced kidney pathology. *Transgenic Research*. 17: 479-488.

Wadahama H, Iwasaki K, Matsusaki M, Nishizawa K, et al. (2012). Accumulation of β -conglycinin in soybean cotyledon through formation of disulfide bonds between α' and α subunits. *Plant Physiology*. Epub ahead of print:

Wajih N, Hutson SM, Owen J and Wallin R (2005). Increased Production of Functional Recombinant Human Clotting Factor IX by Baby Hamster Kidney Cells Engineered to Overexpress VKORC1, the Vitamin K 2,3-Epoxy-reducing Enzyme of the Vitamin K Cycle. *Journal of Biological Chemistry*. 280: 31603-31607.

Wigdorovitz As, Carrillo C, Dus Santos M, amp, et al. (1999). Induction of a Protective Antibody Response to Foot and Mouth Disease Virus in Mice Following Oral or Parenteral Immunization with Alfalfa Transgenic Plants Expressing the Viral Structural Protein VP1. *Virology*. 255: 347-353.

Wilkinson RJ, Elliott P, Carragher JF and Francis G (2004). Expression, purification, and in vitro characterization of recombinant salmon insulin-like growth factor-II. *Protein Expression and Purification*. 35: 334-343.

Xu SJ, Singh RJ and Hymowitz T (1989). The Genomic Relationships Among *Glycine max* (L.) Merr. and '*G. gracilis*'. *Plant Breeding*. 103: 171-173.

Xu J, Dolan MC, Medrano G, Cramer CL, et al. (2011). Green factory: Plants as bioproduction platforms for recombinant proteins. *Biotechnology Advances*.

Yamada Y, Nishizawa K, Yokoo M, Zhao H, et al. (2008). Anti-hypertensive activity of genetically modified soybean seeds accumulating novokinin. *Peptides*. 29: 331-337.

Yin Z, Plader W and Malepszy S (2004). Transgene inheritance in plants. *J Appl Genet*. 45: 127-144.

Yoo BY and Chrispeels MJ (1980). The origin of protein bodies in developing soybean cotyledons: a proposal. *Protoplasma*. 103: 201-204.

Yu J and Langridge WHR (2001). A plant-based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases. *Nat Biotech.* 19: 548-552.

Zeitlin L, Olmsted SS, Moench TR, Co MS, et al. (1998). A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotection of the vagina against genital herpes. *Nat Biotech.* 16: 1361-1364.

Zhang D-C, Huang Y-Q, Shao Y-Q and Jiang S-G (2006). Molecular cloning, recombinant expression, and growth-promoting effect of mud carp (*Cirrhinus molitorella*) insulin-like growth factor-I. *General and Comparative Endocrinology.* 148: 203-212.

Zhang H, Zhao L, Chen Y, Cui L, et al. (2007). Expression of human coagulation Factor IX in transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Biotechnology and Applied Biochemistry.* 48: 101-107.

Zhao Y, Qian Q, Wang H and Huang D (2007). Hereditary Behavior of bar Gene Cassette is Complex in Rice Mediated by Particle Bombardment. *Journal of Genetics and Genomics.* 34: 824-835.

Zhu Z, Hughes KW, Huang L, Sun B, et al. (1994). Expression of human α -interferon cDNA in transgenic rice plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 36: 197-204.

Zimmet P, Alberti KGMM and Shaw J (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature.* 414: 782-787.

“O hormônio no mercado”. Revista Fapesp, n 82, dezembro 2002.

Sites consultados

<http://hiperdia.datasus.gov.br/>

<http://medicago.com>

<http://www.lsbc.com>

<http://www.benefix.com/>

<http://www.chlorogen.com>

<http://www.cna.org.br/cna/index.wsp>

<http://www.cnpso.embrapa.br>

http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/estudo_safra.pdf

<http://www.doctorshealthsupply.com/hgh/>

<http://www.fda.gov/>

<http://www.hgfound.org/>

<http://www.idf.org/>

<http://www.meristem-therapeutics.com/>

<http://www.monsanto.com/>

<http://www.planetbiotechnology.com/products.html#carorx>

<http://www.prodigene.com>

PUBLICAÇÕES