



XVI Encontro de Geneticistas do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, de 27 à 29 de julho de 2008

Expressão transgênica da eritropoietina humana em plantas

Sperb¹, Fernanda; Basso², Luiz A.; Pinheiro-Margis¹, Márcia; Pasquali¹, Giancarlo; Santos², Diógenes S.; Werlang², Isabel C. R.

1 – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

2 – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC)

Email para contato: fesperb@ig.com.br

A eritropoietina (EPO) é uma citocina endógena essencial para o desenvolvimento e maturação de células progenitoras de eritróides, que regula os níveis de células vermelhas circulantes do sangue. É uma proteína glicosilada que executa um papel central na eritropoiese por auxiliar na proliferação e diferenciação das células na medula óssea.

A produção de EPO ocorre nos rins, sendo posteriormente secretada na circulação dos tecidos hematopoiéticos, assim como no fígado de fetos, em resposta à hipóxia e a cloreto de cobalto (CoCl₂). A hipóxia é o principal estímulo fisiológico para o aumento da expressão do gene da EPO.

O oxigênio é requerido por células de mamíferos para a respiração oxidativa e outras reações bioquímicas. Tanto o excesso quanto a falta de oxigênio leva a um dano oxidativo de múltiplos componentes celulares, causando a morte celular. A hemoglobina, presente nos eritrócitos, carrega o oxigênio dos pulmões e disponibiliza-o a outros tecidos, sendo o número de eritrócitos circulantes o maior determinante da oxigenação dos tecidos. A produção diária de eritrócitos é estritamente regulada e o mediador deste controle homeostático perfeito do número de eritrócitos para oxigenação do tecido é a EPO.

Com finalidades clínicas, a EPO é utilizada no tratamento de anemias devido a doenças renais crônicas, pacientes em diálise e transplante renal, anemia associada à malignicências, transplantes, cirurgias e associadas à infecção por HIV. Novas aplicações potenciais têm sido descobertas nos últimos anos, como em doenças auto-imunes, danos de isquemia cerebral, injúrias na medula espinhal e recuperação neurológica, além de doenças cardíacas congestivas.

As plantas são um dos sistemas possíveis para a produção de proteínas recombinantes, os quais também incluem culturas de células microbianas, fúngicas e animais, assim como animais transgênicos. A produção de proteínas recombinantes em plantas, incluindo as despesas com infra-estrutura para cultivo, processamento e estoque de sementes, pode reduzir em muito a quantidade de investimento capital requerido para sua produção comercial. Além disso, deve-se considerar o fato de que nem sempre as bactérias têm a capacidade de realizar todo o processamento necessário para que a proteína em questão seja ativa no organismo em que se deseja utilizá-la como, por exemplo, em mamíferos. Já a expressão em sistema de células animais sintetiza produtos de mamíferos corretamente. Porém, além de caros, estes são bastante sensíveis a mudanças ambientais, especialmente quando cultivados em escala industrial.

Altos índices de pureza de produtos humanos são obtidos em plantas que possuem, ainda, a distinta vantagem de serem livres de patógenos que contaminam o sistema de produção animal e microbiano. Devido a esta e demais vantagens, é grande o número de proteínas expressas com sucesso em plantas, sendo esperado um rápido crescimento desta tecnologia no futuro. Os tipos de proteínas-alvo para esta tecnologia incluem anticorpos, aditivos alimentares, produtos para saúde humana e animal, e enzimas de interesse industrial.

A EPO já foi expressa de forma transgênica em células de mamíferos com sucesso. Trabalhos relatam a expressão de EPO em células de insetos, bactérias e leveduras também são encontrados, mas estes sistemas são incapazes do correto processamento pós-transcricional e pós-traducional necessários para a atividade da proteína *in vivo*.

Matsumoto et al. (1995) produziram EPO em células vegetais em cultura, mas a atividade das proteínas foi detectada apenas *in vitro*, não havendo resultados de atividade da proteína recombinante *in vivo*. Um único trabalho descreve a expressão de EPO em plantas, mas foram relatadas deformidades morfológicas severas e esterilidade em tabaco e *Arabidopsis* (Cheon et al., 2004).



XVI Encontro de Geneticistas do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, de 27 à 29 de julho de 2008

No presente trabalho tivemos a intenção de testar a seqüência correspondente ao RNA mensageiro do gene da EPO quanto à capacidade de expressão em plantas transgênicas utilizando como modelo *Nicotiana tabacum* (tabaco) e *Oryza sativa* (arroz). O gene EPO foi sintetizado com base na técnica de "overlapping" de nucleotídeos. Um fragmento de 582 pb correspondente ao cDNA da EPO foi clonado no vetor de expressão pWUbi.tml, armado com o promotor do gene da ubiquitina e o terminator tm1'. Este cassete de expressão foi transferido para o vetor binário pWBVec4a, utilizado para transformar as linhagens ALG1 e LB4404 de *Agrobacterium tumefaciens*. Essas agrobactérias foram empregadas na transformação genética de arroz e do tabaco, respectivamente. Após regeneradas, somente plantas de tabaco foram obtidas. As plantas transformadas foram avaliadas por PCR para confirmar a presença do transgene no genoma vegetal. Duas plantas apresentaram o produto correspondente presença de EPO. Para confirmar que as plantas estavam expressando o gene integrado, experimentos de PCR em tempo real foram realizados, onde foi possível constatar que uma das plantas é expressa 2,15 vezes mais que a outra, diferença que também foi observada na síntese de proteínas através de Western blot, por visualização da intensidade das bandas correspondentes a proteína transgênica.

Por auto-fecundação, foi obtida a geração T1, que apresentou segregação mendeliana e nenhuma das plantas apresentou qualquer deformidade morfológica como já havia sido relatado na literatura. A eficiência de regeneração das plantas de tabaco foi extremamente baixa, efeito inversamente proporcional aos níveis de expressão do transgene nas plantas, fato também observado na germinação de sementes da geração T1.

Diferenças entre o nosso trabalho e o realizado por Cheon et al. (2004), que também expressou EPO em modelos vegetais obtendo plantas com mal-formações e estéreis, podem ser destacados, justificando os resultados encontrados por ambos os grupos. Entre as principais diferenças que podemos citar estão a seqüência do cDNA da EPO utilizada, onde nós usamos a versão que contém uma mutação de ponto silenciosa. Nós trabalhamos com diferentes variedades de tabaco, usando *N. tabacum* SR1 cultivar Little Havana, e o outro grupo utilizou a cultivar Xanthi. Mas a diferença mais importante foi a construção utilizada. Nós utilizamos uma construção contendo o promotor da ubiquitina (*ubi*) e o terminador *tm1'* para controlar a expressão do cDNA da EPO. A seqüência *ubi* 5' de milho é conhecida por ser um forte promotor em células de monocotiledôneas, mas não ser tão efetivo em células dicotiledôneas. Esta pode ser esta a razão da incapacidade das plantas de arroz regenerarem. Devido ao efeito tóxico que a superexpressão do transgene causa as células de monocotiledôneas, plantas de arroz não foram regeneradas, mas para tabaco, apesar da baixa eficiência, plantas foram obtidas com sucesso. O grupo de Cheon et al. (2004), por sua vez utilizou o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV), conhecido por ter índices mais altos de expressão em dicotiledôneas, o que pode explicar as mal-formações de suas plantas, visto que nenhuma justificativa contundente foi dada em seu trabalho e o fenótipo se repetiu nos dois modelos vegetais utilizados, *Arabidopsis* e tabaco, que se tratam de duas espécies dicotiledôneas.

Após 36 anos de pesquisa contínua, é surpreendente que apenas algumas proteínas recombinantes humanas produzidas por plantas transgênicas estão comercialmente disponíveis. Motivos para tal se devem a dificuldades básicas relativas a sistemas de expressão confiáveis, leis de biossegurança aplicáveis e regulamentação de políticas para plantar, comercializar e consumir organismos geneticamente modificados e seus derivados. No entanto, confiante de que a engenharia genética também irá revelar-se na área da agricultura molecular, desenvolvemos com êxito a proposta de testar a capacidade de expressão de um cDNA codificando a seqüência da eritropoetina humana, gerando um peptídeo transgênicos nas plantas *Nicotiana tabacum* (tabaco) e *Oryza sativa* (arroz).

Através deste estudo provamos que é possível expressar EPO em plantas transgênicas com morfologia e capacidade de reprodução normais. Nós acreditamos que os níveis de proteínas recombinantes podem ser otimizados, na ordem de contribuir para o progresso na produção de proteínas humanas de interesse farmacológico em grande escala.

Cheon BY, Hae Kim J, Oh KH, Bahn SC, Ahn JH, Choi JW, Ok SH, Bae JM and Shin JS (2004) *Transgenic Research* 13: 541–549.

Matsumoto S, Ikura K, Ueda M and Sasaki R (1995) *Plant Mol Biol* 27: 1163–1172.