

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR

## **Expressão Transgênica da Eritropoietina Humana em Plantas**

Fernanda Sperb

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como um dos requisitos à obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Giancarlo Pasquali

Porto Alegre, 2008

Por que cometer erros antigos se  
há tantos erros novos a escolher?  
(Bertrand Russel)

## **Instituição e Fontes Financiadoras**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular Vegetal (LBMV) do Centro de Biotecnologia (CBiot) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Foi fonte financiadora deste trabalho, por meio de concessão de uma Bolsa de Mestrado, o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) do Ministério da Ciência e Tecnologia.

## Agradecimentos

A todos que estiveram presentes nestes 2 anos da minha vida, seja colaborando e dando apoio ou mesmo atrapalhando e dando problemas. Cada um, de uma maneira diferente, me fez mais forte!

Gian, meu obrigado por ter dado esta oportunidade, mesmo que um pouco na marra. Foi um grande prazer tê-lo tido como orientador. Admiro muito a tua competência em proporcionar os meios e recursos para realizar este sonho e por toda liberdade que me deste para desenvolver este projeto, acreditando em mim e me aconselhando nos meus momentos de crise e participando ativamente na “formação do caráter”.

Às meninas do lab que deixaram a minha vida mais florida...

Fê Bastolla, minha amiga de sempre e para sempre, cúmplice, obrigada por me entender e aceitar do jeito que eu sou.

À Andréia, que é uma jóia rara, a mais grata surpresa deste período, que foi a amiga para todas as horas, obrigada por me contagiar com seu bom humor e segurar a minha mão nos momentos mais difíceis.

À Marina, que comigo é a outra “mente perigosa” do lab, obrigada por ser uma amiga tão especial, que me entende como ninguém. Às vezes me choco com a sintonia de nossos pensamentos. É bom saber que alguém pensa como eu...

À Michèle, obrigada por trazer magia a minha vida e por sempre me fazer ver o lado bom da coisa ruim. Admiro-te muito, és uma guerreira.

À Lu, que é a menina mais meiga e doce do lab, obrigada por ser uma ótima amiga, com quem posso compartilhar minhas discussões sobre todos os tipos de piruísses.

À Rochele, obrigada pela amizade e por compartilhar minhas agonias da cultura de tecidos e da BR-116.

À Dani, obrigada pela parceria e diversão garantida, afinal foram muitos happy-hours...

Um agradecimento especial à Mi, Lu, Rô e Andréia, que foram as madrinhas oficiais das minhas plantas, sempre molhando elas quando eu não estava presente.

À Anne, obrigada por ser uma amiga muito querida, sempre me dando força, e pela imensa ajuda com os *westerns blots*.

À Bea, obrigada pela parceria e amizade nesta reta final com os *Southerns* e *westerns*.

Ao Guilherme Pizzoli, Guilherme Loss, Sinara, Ana Paula, Júlio, Sissa, Pâmela, Débora, Gabriela, Agnes, FF e Maraschin, e todo pessoal da Genética Vegetal, em especial à Sílvia Rosa e à Andréia Caversan, ótimos colegas de laboratório, que sempre colaboraram com meu trabalho e compartilharam divertidos cafezinhos.

Ao Dr. Tarso Kist, obrigada por fornecer a bolsa CNPq, que permitiu que eu iniciasse meu mestrado.

Aos Drs. Diógenes S. Santos e Luiz A. Basso, assim como à Isabel Werlang e à Gaby Renard, obrigada por fornecerem o material e as informações necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

À Sílvia e ao Luciano, que foram maravilhosos, obrigada por sempre me atenderem muito bem quando eu precisei de algo do PPGBCM.

Ao Dr. Rogério Margis, obrigada pela colaboração com os experimentos de *Real-Time* e pelos exemplos de profissionalismo.

À Dra. Márcia Margis, pessoa incrível que tive o prazer de conhecer, obrigada por abrir as portas de seu laboratório para realização dos experimentos com arroz, e por me aconselhar nos momentos de dúvidas e incentivar nos momentos de incertezas.

Obrigado àqueles professores que me mostraram tudo que eu não quero ser na vida, que me fizeram distinguir o bom do mal profissional, admirando ainda mais os profissionais de respeito e com integridade que cruzaram o meu caminho nestes 2 anos.

Aos cobradores, motoristas, passageiros e amigos dos ônibus D43 e Central NH-POA, que tornaram as viagens mais leves e divertidas, sempre com histórias do arco e conselhos “magníficos”.

À toda a minha família, que ajudou e atrapalhou à sua maneira, que eu amo muito.

À luz da minha vida, minha mãe, minha melhor amiga, a pessoa mais incrível e maravilhosa que existe, obrigada por me apoiar, incentivar-me, acreditar em mim sempre, enxugar minhas lágrimas e vibrar em cada etapa vencida, sempre deixando a minha marmitinha pronta e madrugando para me deixar no ônibus. Tu és o máximo, é a real alegria da minha vida.

Ao Xande, meu bebezão, meu amorzão, obrigada por sempre me apoiar, proporcionar-me momentos de encanto e me mostrar o que é amor de verdade. Em cada pequeno e grande gesto fez da minha realidade mais doce e me ajudou, dando estadia, traduzindo meus textos e agüentando meus ataques de mau-humor após os longos dias de trabalho.

# Índice

Resumo.....	7
Abstract.....	9
<b>1 Capítulo 1: Introdução e Objetivos.....</b>	<b>10</b>
1.1 Introdução.....	11
1.2 Objetivo Geral.....	15
1.3 Objetivos específicos.....	15
<b>2 Capítulo 2: Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>16</b>
2.1 Eritropoietina.....	17
2.2 Plantas transgênicas.....	21
2.3 Utilização de plantas na geração de biofármacos.....	23
2.4 Produção de EPO recombinante.....	27
<b>3 Capítulo 3: Manuscrito .....</b>	<b>28</b>
<b>4 Capítulo 4: Discussão Geral. ....</b>	<b>58</b>
<b>5 Referências Bibliográficas.....</b>	<b>64</b>

## Resumo

A eritropoietina (EPO) é um hormônio que pertence a um grupo de fatores de crescimento hematopoiético, controlando a proliferação e a diferenciação de células da medula óssea. Ela age induzindo a elevação da produção de células vermelhas, aumentando a quantidade de hemoglobina e o oxigênio circulante.

Este hormônio é principalmente secretado pelo rim, e é amplamente usado na medicina no tratamento de anemias, desordens renais e cardíacas, tumores e diversas outras doenças. A EPO recombinante tem sido produzida em células de mamíferos (COS-1 e CHO) em culturas *in vitro* e tem sido expressa experimentalmente em células de insetos, leveduras e bactérias. Até o momento, há somente uma descrição da expressão transgênica desta proteína em plantas sem, no entanto, sucesso na regeneração de plantas saudáveis e férteis. No presente trabalho, plantas transgênicas de arroz (*Oryza sativa*) e tabaco (*Nicotiana tabaccum*) contendo o gene da EPO foram geradas, nas quais foi avaliada a expressão gênica e detectada a presença da proteína recombinante.

O gene recombinante da EPO utilizado foi sintetizado baseado na técnica de “overlapping” de nucleotídeos. Um fragmento de 582 pb correspondente ao cDNA da EPO foi clonado e submetido a seqüenciamento automático. Uma mutação no nucleotídeo 252 (G→A) foi identificada, o que não modificou o aminoácido codificado pelo códon, uma glicina. O fragmento foi transferido para o vetor de expressão pWUbi.tm1, o qual contém o promotor do gene da ubiquitina e o terminador tm1'. Este cassete de expressão foi transferido para o vetor binário pWBVec4a, que foi transformado nas cepas AGL1 e LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*. Estas cepas foram utilizadas na transformação de arroz e de tabaco, respectivamente.

A integração do transgene no genoma da planta foi comprovada por PCR. A expressão da EPO nas plantas de tabaco foi detectada por RT-PCR convencional e quantitativa, e a presença da proteína foi avaliada por SDS-PAGE e Western blot, provando o sucesso da obtenção de plantas transgênicas de tabaco expressando EPO. Foi obtida por auto-fecundação a geração T1, a qual apresentou segregação mendeliana. Nenhuma das plantas avaliadas apresentou qualquer tipo de deformidade ou mal-formação. Não foi possível a obtenção de plantas de arroz transgênicas devido à deficiência das

mesmas no processo de regeneração, possivelmente em consequência da super-expressão do transgene em função do promotor escolhido.



## Abstract

Erythropoietin (EPO) is a hormone that belongs to a group of growth hematopoietic factors, which control the proliferation and differentiation of marrow bone's cells. It acts inducing the production of blood red cells, increasing the amount of circulating hemoglobin and oxygen. This hormone, mostly secreted by kidneys, is widely used in medicine as a treatment for anaemia, kidney and heart disorders, tumors and numerous diseases. Recombinant EPO has been produced in mammalian cells (COS-1 and CHO) cultured *in vitro* and has been also experimentally inserted into insect, yeast and bacterial cells. Up to now, to the best of our knowledge, there is only one description of transgenic expression of this protein in plants but without success in the generation of healthy, fertile plants. In the present work we evaluated the expression of human EPO in plants such as rice (*Oryza sativa*) and tobacco (*Nicotiana tabacum*). The recombinant EPO gene was synthesized based on the nucleotide "overlapping" technique. A fragment of 582 bp corresponding to the EPO cDNA was cloned and then submitted to automatic sequencing. At that time, a mutation on nucleotide 252 (G→A) was identified. It did not modify the encoded amino acid of the codon, a glycine. This fragment was transferred to the expression vector pWUbi.tm1, armed with the promoter of the ubiquitin gene and the terminator tm1'. This expression cassette was transferred to the binary vector pWBVec4a, which was then transformed into strains ALG1 and LB4404 of *Agrobacterium tumefaciens*. These strains were employed in the transformation of rice and tobacco, respectively. Transgenic integration into plant genomes was evaluated by PCR. The expression of EPO in tobacco plants was detected by conventional and quantitative RT-PCR and the presence of the protein was evaluated by SDS-PAGE and western blot, successfully proving the generation of transgenic tobacco plants expressing EPO. By self-crossing it was obtained a collection of T1 plants, which presented mendelian segregation of the transgene, and none of the plants presented any kind of miss-formation or deformity. It was not possible to obtain rice transgenic plants due to their deficiency in the regeneration process, possibly due to the transgene over-expression driven by the ubiquitin promoter.

# **Capítulo 1**

## **Introdução e Objetivos**

## 1.1 Introdução

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 (Graber & Kranz, 1978; Kranz & Goldwasser, 1984; Cheung & Miller, 2001). É uma proteína glicosilada que executa um papel central na eritropoiese por auxiliar na proliferação e diferenciação das células na medula óssea (Jelkmann, 1992).

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 ( $\text{CoCl}_2$ ). A hipóxia é o principal estímulo fisiológico para o aumento da expressão do gene da EPO. Esta relação foi primeiramente observada pelo aumento de células vermelhas do sangue em grandes altitudes já em 1882, por P. Bert (Goldwasser et al., 1958; Graber & Kranz, 1989; Jelkmann, 1992).

O oxigênio é requerido por células de mamíferos para a respiração oxidativa e outras reações bioquímicas. O excesso de oxigênio, entretanto, 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 cada dia, humanos normais removem 1% dos eritrócitos da circulação e os repõe em número igual de reticulócitos. Contudo, esta 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 (Koury, 2005).

O gene da EPO humana está situado no cromossomo 7q11-22, e consiste de cinco éxons e quatro íntrons, os quais produzem um único polipeptídeo contendo 193 aminoácidos. A massa molecular do polipeptídeo e da sua forma glicosilada é estimada em 18 kD e 30 kD, respectivamente (Ng et al., 2003).

Em situação de hipóxia, o fígado de adultos é estimulado a aumentar a expressão de EPO por intermédio de uma proteína de ligação ao DNA chamada de fator-1 induzido por hipóxia (HIF-1). A secreção da EPO ocorre no plasma e, após sua chegada na medula óssea, a mesma se liga ao receptor de EPO (EPO-R) sobre a superfície de células progenitoras de eritróides. Essa associação dispara uma cascata de reações no interior da

célula progenitora de eritrócitos que resulta no amadurecimento deste eritrócito e na liberação do mesmo na corrente sanguínea (Ng et al., 2003).

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 (Winearls, 1998; Weiss, 2003; Ng, 2005).

O melhor marcador para o benefício da introdução da EPO recombinante na prática clínica é a redução da necessidade de transfusões sanguíneas regulares (Sundal, 1991). No Brasil, as hemoglobinopatias são um problema de saúde pública, e o principal tratamento utilizado é a administração da EPO recombinante. Em pacientes com doenças renais, a produção endógena de EPO acaba comprometida, tendo como consequência a anemia crônica, além de outras implicações como hipertrofia ventricular em decorrência da hemodinâmica destes pacientes, que é associada a altas taxas de mortalidade. Em 2005, por exemplo, dos 70.000 brasileiros doentes renais, apenas 3.362 conseguiram ser transplantados. Estima-se que 1,5 milhões de pessoas em todo o mundo atualmente dependam de diálise (Mascarenhas, 2007; Valadares, 2007).

A EPO comercializada no Brasil é importada de Cuba. Segundo o Ministério da Saúde, o Governo teve em 2006 gastos de R\$ 4,2 bilhões na compra de medicamentos, sendo 500 milhões investidos na importação da EPO e de um interferon. Isto significa 11% do orçamento da Saúde investidos exclusivamente em medicamentos. O medicamento Epogen (Amglen, Sankio), uma das formas comerciais da EPO recombinante, gerou em vendas globais U\$ 5.772.000.000,00 no ano de 2001, representando 52% da comercialização de medicamentos produzidos de forma recombinante.

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 (Giddings, 2001). Os valores dos custos estimados para a produção de proteínas recombinantes em plantas são entre 10 e 50 vezes menores se comparados à

mesma proteína produzida em *Escherichia coli*. (Kusnadi et al, 1997; Fischer & Emans, 2000). 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 (Giddings, 2001).

Assim, plantas transgênicas possuem vantagens em relação a todos os sistemas de expressão heteróloga já estabelecidos em termos de capacidade, flexibilidade, escala e custo de produção. A área de plantas transgênicas plantada pode ser adaptada e alterada de acordo com a demanda de um ano para o outro sem muitos custos adicionais (Boehm, 2006).

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 (Hood, 2004).

A EPO já foi expressa de forma transgênica em células de mamíferos COS-1 (Jacobs et al., 1985), CHO (Lin et al., 1985), COS-7 e BHK (Jerry et al, 1986) com sucesso. Outros sistemas também já foram utilizados como a produção de EPO no leite de porcos, mas que resultou em uma alta taxa de mortalidade dos animais hospedeiros, além de esterilidade de alguns animais (Park et al, 2006). Trabalhos que relatam a expressão de EPO em células de insetos (Quelle et al., 1989), bactérias (Lee-Huang, 1984) e leveduras (Elliott et al., 1989) também são encontrados na literatura científica, 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 e esterilidade em tabaco e *Arabidopsis* (Cheon et al., 2004).

## 1.2 Objetivo Geral

Testar a seqüência correspondente ao RNA mensageiro do gene da EPO quanto à capacidade de expressão em plantas transgênicas utilizando como modelo *Nicotiana tabaccum* (tabaco) e *Oryza sativa* (arroz).

## 1.3 Objetivos Específicos

- Construção dos cassetes de expressão contendo o gene da *EPO* humana sob o controle do promotor da ubiquitina e do terminador tm1’;
- Obtenção dos vetores plasmidiais binários portando os cassetes de expressão de *EPO*;
- Geração de plantas transgênicas de tabaco e arroz, transformadas com *EPO* e respectivo grupo de plantas-controle;
- Análise da estrutura e do padrão de expressão do transgene;
- Determinação dos níveis da proteína recombinante presente em tecidos foliares e sementes das plantas transgênicas;
- Obtenção da geração T<sub>1</sub>;
- Análise das plantas transgênicas da geração T1 quanto à segregação do transgene e os níveis de expressão da EPO, e fenótipo geral.

## **Capítulo 2**

### **Revisão Bibliográfica**



## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 Eritropoietina

O corpo humano gera cerca de 2,5 milhões de novas células vermelhas sanguíneas por segundo na medula óssea, para repor a contínua remoção destas mesmas células da corrente sanguínea. A produção destas células (eritropoiese) é controlada por uma intrincada relação entre vários fatores humorais e citocinas. Uma citocina específica, uma sialoglicoproteína conhecida como eritropoietina (EPO), age diretamente nas células progenitoras de eritrócitos e precursores da medula óssea, controlando a proliferação, diferenciação e maturação das células vermelhas do sangue (Ng et al., 2003).

A EPO age em uma via fisiológica clássica de *feedback* pela ligação ao seu receptor (EPO-R) e subsequente ativação de uma via de transdução de sinal intracelular (Graber & Kranz, 1978; Kranz & Goldwasser, 1984; Cheung & Miller, 2001). Após a liberação na circulação, ela se liga ao receptor das células progenitoras de eritrócitos e estimula a produção das células vermelhas sanguíneas. Um aumento na massa das células vermelhas no sangue, por sua vez, alivia a hipóxia, conseqüentemente diminuindo a produção de EPO.

A EPO é produzida primeiramente nos rins, sendo posteriormente secretada na circulação dos tecidos hematopoiéticos, assim como no fígado de fetos, particularmente em resposta ao estresse por hipóxia e a  $\text{CoCl}_2$ . Adicionalmente, a EPO é produzida no fígado de adultos e, apesar desta quantidade ser menos de 10% da produção de EPO do corpo, ela é suficiente para manter a produção de células vermelhas do sangue (embora em um nível muito mais baixo que o normal) mesmo após a nefrectomia total (Zhu et al., 2002). Entretanto, a expressão da EPO pode não estar confinada somente nos rins e fígado, sendo que seu mRNA é detectado em pulmões, testículos e cérebro, mas não em músculos, intestinos e medula óssea de roedores (Tan et al., 1992).

A hipóxia é o principal estímulo fisiológico para o aumento da expressão do gene da EPO. Esta relação foi primeiramente observada como a existência de um fator humoral que regula a produção de células vermelhas do sangue já em 1882 por P. Bert, que percebeu um aumento destas células em grandes altitudes (Goldwasser et al., 1958), mas foi em 1906 que a primeira descrição foi feita, baseada em experimentos de transfusão de

sangue em coelhos no trabalho de Carnot & DeFlandre (1906). Em 1948, Bonsdorff & Jalavisto batizaram este fator humoral como EPO (Fischer 1998). Em 1950, o ainda não conhecido fator responsável pela eritropoiese foi identificado por ser estimulado na respiração de ratos em baixa atmosfera de oxigênio, estabelecendo os elementos de sua regulação biológica. Na década de 1960, a sua fonte foi identificada como sendo nos rins, mas foi apenas no ano de 1977 que a EPO humana foi purificada pela primeira vez por T. Miyake, C.K. Kung e E. Goldwasser na Universidade de Chicago (Miyake et al., 1977). A partir daí, quantidades limitadas desta proteína humana nativa foram usadas para tratar doentes com anemia.

O oxigênio é um componente primordial para manutenção da vida, pois é requerido para a respiração aeróbica celular, que tem como objetivo principal produzir energia a partir da decomposição de carboidratos, gorduras e aminoácidos. As reações químicas de decomposição envolvidas com a produção de energia para a célula estão baseadas em um mecanismo eletroquímico caracterizado pela transferência de elétrons entre os substratos degradados participantes da reação. O oxigênio funciona como um reagente responsável justamente por esse transporte de elétrons, de modo a garantir que algumas substâncias recebam elétrons e outras, os percam (são as chamadas reações de óxido-redução, em que um substrato recebe elétrons, portanto, fica reduzido, e outro que perde elétrons, o oxidado). Uma vez iniciadas essas reações, a energia liberada é imediatamente armazenada em moléculas contendo, como elemento principal, o fósforo. São as famosas moléculas de ATP. Os ATPs podem ser considerados os protagonistas da fosforilação oxidativa; fosforilação por dar origem a moléculas de ATP, ou a outras contendo fósforo, e oxidativa por haver participação do oxigênio. A fosforilação oxidativa é responsável pela produção de 90% do ATP dos organismos aeróbicos. O excesso de oxigênio, entretanto, causa danos oxidativos de múltiplos componentes celulares, superando a capacidade antioxidante e conduzindo a um desequilíbrio redox, causando a morte celular. Por isso, 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 (Koury, 2005).

A adaptação à hipóxia é um tópico de considerável relevância clínica, pois ela influencia a patofisiologia da anemia, da policitemia, da isquemia tissular e do câncer (Bunn & Poyon, 1996; Ratcliffe et al., 1998). Diversos genes fisiologicamente relevantes são conhecidos por ter sua expressão aumentada em resposta a mudanças na tensão de

oxigênio intracelular. Estes incluem a EPO, que regula a produção de células vermelhas, o fator de crescimento endotelial de vasos (VEGF), o qual tem a expressão aumentada em tumores e em isquemia tissular, a tirosina hidroxilase, uma enzima crítica para síntese de dopamina nos corpos carotídeos e enzimas glicolíticas, que respondem de forma a manter a produção de ATP apesar da baixa disponibilidade de oxigênio. Este e outros genes biologicamente importantes têm em comum o promotor ou elementos de *enhancer* que respondam a hipóxia (Ebert & Bunn, 1999).

O gene da EPO humana está situado no cromossomo 7q11-22 e consiste de cinco éxons e quatro íntrons, os quais produzem um único polipeptídeo contendo 193 aminoácidos. Após sua síntese, este polipeptídeo sofre as seguintes modificações: glicosilação com a adição de três ligações *N* (na Asn-24, Asn-38 e Asn-83) e um oligossacarídeo ácido ligado a *O* (na Ser-126), a formação de duas pontes dissulfeto da Cys-7 a Cys-161 e da Cys-29 a Cys-33, concomitante com a remoção da seqüência secretora do aminoácido hidrofóbico 27. Além disso, acredita-se que o resíduo Arg-166 na porção C-terminal seja clivado antes da liberação da EPO na circulação, com a estrutura primária da EPO madura contendo 165 aminoácidos (Fig.1). A massa molecular do polipeptídeo e da sua forma glicosilada é estimado em 18 kD e 30 kD respectivamente (Ng et al., 2003).

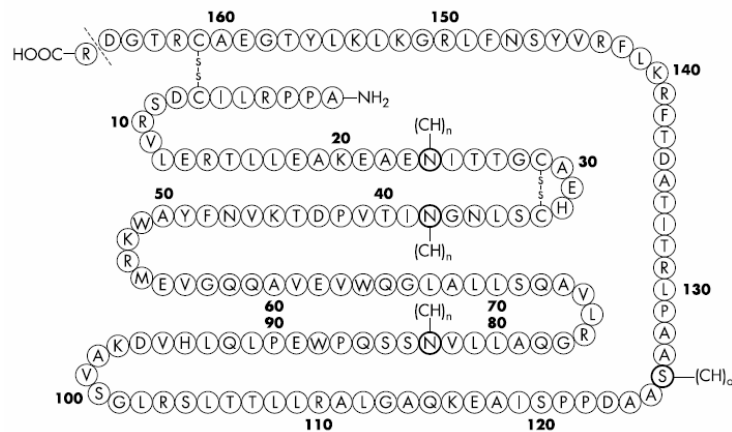


Figura 1: Estrutura primária da EPO. (CH)<sub>n</sub>, sítio de glicosilação *N*-ligado aos resíduos aspartil 24, 38, 83; (CH)<sub>o</sub>, sítios de glicosilação *O*-ligado ao resíduo seril 126; tracejado, ARG-166 na extremidade carboxi-terminal que é removida antes da liberação da EPO na circulação (Ng et al.,2002).

O elemento crucial que determina o aumento da expressão do gene da EPO durante a hipóxia reside em um *enhancer* na região 3' do gene. Este *enhancer* pode ligar um fator de transcrição, o fator de transcrição induzido por hipóxia (HIF-1), que forma um complexo com receptores nucleares altamente conservados HNF-4, e um adaptador transcricional crítico, o p300 (Zhu et al., 2002). Após o estímulo de HIF-1 e o aumento da expressão de EPO, ocorre a secreção da EPO no plasma e, após sua chegada na medula óssea, a mesma se liga ao receptor de EPO-R sobre a superfície de células progenitoras de eritróides. Essa associação dispara uma mudança conformacional que aproxima moléculas de uma proteína-quinase tirosina 2 (JAK2) da família Janus associadas ao EPO-R, estimulando sua ativação por transfosforilação. Subseqüentemente, moléculas de JAK2 fosforilam oito resíduos de tirosina no domínio citoplasmático do EPO-R, o qual então serve como sítio de depósito para várias proteínas de sinalização intracelular. Estas proteínas são tirosinas fosforiladas e ativas, sendo uma delas um sinal transdutor e ativador de transcrição (STAT5) que, sob fosforilação por JAK2, dissocia-se de EPO-R, dimeriza e depois transloca-se para o núcleo para ativar numerosos genes alvos, incluindo o inibidor de apoptose *Bcl-x* (Weiss, 2003). A inibição da apoptose pela via JAK2/STAT5/*Bcl-x* ativada por EPO é muito importante para a diferenciação de eritrócitos. A EPO pode também reprimir a morte celular pela ativação de genes anti-apoptóticos ou pela supressão de caspases, como é o caso nas células precursoras de eritróides, onde a EPO ativa a expressão dos genes anti-apoptóticos *bcl-2* e *bcl-xL* (Silva et al., 1996).

Em adição a STAT-5, a EPO induz a ativação de diversas outras proteínas intracelulares. Exemplos incluem a Shc, que pode ativar a via de sinalização envolvida na proliferação celular; a fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K), que pode promover a sobrevivência de células eritróides; e a fosfolipase C- $\gamma$ 1, que pode desempenhar um papel na proliferação de células eritróides (Weiss, 2003).

A EPO é amplamente utilizada na medicina, no tratamento de anemias devido a doenças renais crônicas, na manutenção da diálise, pré-diálise e transplante renal, na anemia de crianças em decorrência de nascimento prematuro, anemia associada à malignicências como tumores sólidos, cânceres hematológicos, desordens de células tronco pré-leucêmicas, anemias ligadas a transplante de medula óssea e células tronco, anemia devido a cirurgias e associadas à infecção por HIV. Antes da utilização da EPO

recombinante, em avaliações realizadas há 18 anos, 25% dos pacientes renais em diálise necessitavam de transfusões sanguíneas regulares para reposição de células vermelhas (Jelkman, 2004). Há ainda outras aplicações potenciais como em doenças auto-imunes, hemólise, insuficiência renal aguda, pacientes críticos com necessidade de transfusão sanguínea, possui também atividade neuroprotetora, evitando os danos de isquemia cerebral, injúrias na medula espinhal e auxilia na recuperação neurológica, além de participar na recuperação de doenças cardíacas congestivas (Winearls, 1998; Weiss, 2003; Ng et al., 2005). O melhor marcador para o benefício da introdução da EPO recombinante na prática clínica é a redução da necessidade de transfusões sanguíneas regulares (Sundal, 1991), o que acarreta na diminuição de possíveis contaminações e aumenta a qualidade de vida destes pacientes (Ng et al., 2005).

## 2.2 Plantas Transgênicas

As plantas têm sido utilizadas para o benefício humano de forma discriminada desde o início da civilização, abastecendo populações com alimentos, fibras, madeira e substâncias terapêuticas. Assim, as plantas foram, além dos animais, o sistema básico de bioprodução mais importante para geração de substâncias.

O uso de plantas e seus extratos para tratamentos medicamentosos pré-datam os primeiros registros de civilizações, que remete pelo menos ao período Neanderthal. Até o século 16, jardins botânicos forneceram uma riqueza de matérias primas para a medicina, tanto para o ensino quanto para o uso terapêutico. No século 17, as ervas medicinais foram descobertas e amplamente usadas para produzir remédios. Posteriormente a estas descobertas, muitos princípios ativos de plantas medicinais foram identificados e, em muitos casos, purificados para uso terapêutico (Goldstein & Thomas, 2004).

Mas é na biotecnologia moderna que residem as maiores expectativas para a produção de substâncias de interesse farmacêutico em plantas e em outros organismos, levando a um aumento na busca pela obtenção de novos agentes medicinais, sejam eles de origem botânica ou animal. Uma das colaborações para este aumento tem sido o advento da engenharia genética, onde plantas podem ser utilizadas para a produção de uma

variedade de proteínas que incluem anticorpos de mamíferos, substituintes do sangue, vacinas e outras entidades terapêuticas (Goldstein & Thomas, 2004).

Especialmente no setor dos produtos farmacêuticos, as plantas oferecem uma enorme variedade de metabólitos secundários com efeitos terapêuticos. Estas substâncias, desenvolvidas evolutivamente pelas plantas para se proteger contra patógenos e predadores ou para atrair polinizadores, apresentam propriedades na cura de ferimentos, anti-inflamatórias, anti-microbianas ou psico-ativas, contribuindo para a manutenção da saúde humana e animal (Boehm, 2006).

Métodos biotecnológicos modernos podem produzir estas substâncias terapêuticas de uma maneira controlada e previsível em culturas de células derivadas das respectivas plantas medicinais. Mas muitas vezes, a produção em larga escala é dificultada porque a espécie vegetal original é de difícil cultivo ou rara na natureza. Exemplos bem sucedidos para este tipo de bioprodutos são os alcalóides (Verpoorte et al., 2002), paclitaxel (Zhong, 2002) e chiconina (do inglês, *shikonin*; Yazaki et al., 1999).

Com o advento da tecnologia genética, tornou-se também viável alterar o genoma vegetal pela adição ou substituição de genes específicos e sua seqüência de DNA reguladora como, por exemplo, no tabaco (Horsch et al., 1985) ou no girassol (Everett et al., 1987), primeiros modelos de estudo de sucesso. Isto, em primeira instância, foi usado para melhorar ou modificar os produtos secundários de valor terapêutico que já eram produzidos por culturas de células vegetais. Ao mesmo tempo, foram produzidos os primeiros relatos de que células vegetais também eram capazes de expressar anticorpos de maneira correta e biologicamente ativa. Isso abriu um novo campo de aplicação para as plantas transgênicas. Então, a melhoria das substâncias derivadas de plantas ou as plantas, não são mais o centro de interesse mas, sim, o uso delas como uma ferramenta exclusiva para a produção de proteínas recombinantes de praticamente qualquer origem. Estas proteínas podem ser purificadas após a colheita das plantas e aplicadas para benefício humano (Boehm, 2006).

Deve-se salientar que a escala temporal para a comercialização de culturas transgênicas ainda é bastante lenta como, aliás, qualquer outra variedade. No caso dos tomates de amadurecimento tardio e denominados FLVR-SAVR, vendidos primeiramente no Reino Unido em 1996, que foram desenvolvidos a partir de um projeto acadêmico que remonta ao início de 1980 (Dunwell, 1999).

## 2.3 Utilização de Plantas na Geração de Biofármacos

Um novo conceito foi introduzido na ciência com o advento das técnicas de DNA recombinante e com a transformação celular com DNA exógeno visando a produção comercial de proteínas de interesse industrial, a denominada “agricultura molecular”. Por definição, a agricultura molecular é a identificação de uma proteína com atividade terapêutica ou envolvida em diagnóstico, cuja seqüência de DNA ou proteína esteja disponível e possa ser expressa em hospedeiro heterólogo (Fischer & Emans, 2000; Ma et al., 2003).

Um exemplo clássico de agricultura molecular é a expressão da insulina recombinante em bactérias. A atividade anti-diabética da insulina foi identificada em 1921, e em 1951 sua seqüência completa de aminoácidos já havia sido determinada. A insulina foi um alvo atraente para a expressão em um microrganismo, pois seu pequeno polipeptídeo requer um processamento pós-transcricional mínimo para que a mesma seja funcional. A expressão em bactérias foi um sucesso e em 1982 a primeira proteína de interesse terapêutico havia sido aprovada para uso (Walsh, 1998).

O potencial para o uso de plantas como um sistema para produção de fármacos recombinantes foi estabelecido entre 1986 e 1990 com o sucesso da expressão da proteína de fusão do hormônio de crescimento humano, de um interferon e da albumina sérica humana (Barta et al., 1986; De Zoeten et al., 1989; Sijmons et al., 1990). Outro avanço crucial foi o sucesso da expressão de anticorpos humanos em plantas em 1989 (Hiatt et al., 1989) e 1990 (Düring et al., 1990). Este foi um importante passo para provar o potencial de plantas para produção de proteínas complexas de mamíferos de forma correta, segura, barata e em grande escala (Fischer & Emans, 2000).

O sistema de expressão ideal deve produzir material seguro (livre de contaminações), ser biologicamente ativo e de baixo custo. Kusnadi *et al* (1997) por exemplo, tem estimado que o custo de produção de proteínas recombinantes em plantas pode ser entre 10 e 50 vezes menor que o custo da mesma proteína produzida em *Escherichia coli*.

O uso de células de mamíferos modificadas com técnicas de DNA recombinantes apresenta a vantagem de resultar em produtos que são idênticos àqueles da origem natural.

Entretanto, a cultura de células é cara e permite somente uma escala de produção limitada (Fischer & Emans, 2000; Ma et al., 2003).

O uso de microrganismos como bactérias e leveduras permite a produção em larga escala, mas possui a desvantagem dos produtos apresentarem diferenças acentuadas se comparadas ao produto de origem. Um exemplo são as proteínas humanas usualmente glicosiladas, atividade que as bactérias não são capazes de realizar. Adicionalmente, as proteínas humanas expressas em altos níveis em *E. coli* frequentemente adquirem uma conformação não natural acompanhada por precipitação intracelular devido à falta de dobramentos e pontes dissulfeto (Daniell, 2001).

Além das vantagens econômicas, existem benefícios qualitativos favorecendo o uso de plantas transgênicas como fábricas para a produção de proteínas recombinantes, em especial para produtos farmacêuticos. Sistemas de expressão em células animais sintetizam produtos de mamíferos corretamente, mas são caros e particularmente sensíveis a alterações ambientais, especialmente quando cultivados em escala industrial. Um cuidadoso controle da cultura é necessário para garantir as condições de pureza do produto. Culturas microbianas e fúngicas são mais resilientes, mas podem não necessariamente sintetizar proteínas de mamíferos corretamente, devido a diferenças no uso de códons e modificações pós-traducional. Síntese protéica, secreção e modificações pós-traducionais são processos semelhantes em células vegetais e animais, havendo apenas pequenas diferenças na glicosilação das proteínas. Pequenas diferenças no uso de códons das plantas podem ser compensadas ajustando a seqüência do transgene permitindo a montagem correta das proteínas de mamíferos multiméricas. Além disso, os produtos a partir de plantas transgênicas são improváveis alvos de contaminação por patógenos animais, micróbios, toxinas ou seqüências oncogênicas (Giddings, 2001).

Porém, ainda são muitos os desafios presentes nesta área da ciência, com muitos pontos a serem melhorados. Um deles é o nível de proteínas farmacêuticas produzidas por plantas transgênicas, que tem sido baixo (menos de 1% do total de proteínas solúveis), mas que geralmente é suficiente para produzir moléculas farmacêuticamente ativas de interesse comercial (Goldstein & Thomas, 2004).

A maioria das proteínas de interesse comercial é produzida em quantidades extremamente pequenas em suas fontes nativas. A síntese química é possível para alguns peptídeos pequenos, mas não é possível para proteínas grandes ou complexas (Brandle *et*



al, 2001). A produção de algumas das proteínas terapêuticas mais complexas em plantas tem representado um grande desafio. Os desafios técnicos a serem superados são numerosos, mas podem ser sumarizados pelas seguintes perguntas: (1) Poderemos obter níveis suficientes de proteínas recombinantes em plantas para obter um sistema de produção economicamente viável? (2) As plantas poderão sintetizar proteínas funcionalmente equivalentes? Em caso negativo, poderemos manipular a maquinaria de modificações pós-transcricionais das células vegetais? (3) Poderá a proteína recombinante produzida pela planta ser purificada em sua forma fisiológica ativa e funcional? Isto poderá ser feito para satisfazer alvos comercialmente importantes? Estas perguntas visam o desenvolvimento de métodos para o processamento da proteína recombinante visando o aumento de produção, purificação e processamento *in vitro* (Howard, 2005; Kermode, 2006).

A viabilidade comercial de purificação de certas proteínas algumas vezes desencoraja pesquisadores e empresas, pois seus níveis em extratos são bastante baixos, como observado nos exemplos da albumina sérica humana, onde esta compreendia apenas 0,020% das proteínas solúveis totais (Kusnadi et al., 1997); da proteína C humana, um anticoagulante, que representou 0,001% das proteínas solúveis totais (Cramer et al., 1999); da própria EPO produzida em células vegetais, com cerca de 0,003% do total de proteínas solúveis; do interferon humano, com menos de 0,001% (Kusnadi et al., 1997), assim como um gene sintético que codifica um fator de crescimento epidérmico humano, o qual foi expresso e resultou em apenas 0,001% do total de proteína solúvel em tabaco transgênico. Apesar de vários relatos de sucesso de alto nível de expressão em proteínas não-humanas (por exemplo, fitase, glucanase) por intermédio da transformação do genoma nuclear de plantas (Daniell et al., 2001), no caso de proteínas sanguíneas humanas ainda é necessário aumentar os níveis de expressão das mesmas para permitir a produção comercial em vegetais.

Resta ainda outro desafio, no entanto, devido a uma parte significativa da sociedade não aceitar estas novas tecnologias e argumentar fervorosamente contra a produção e uso de organismos geneticamente modificados (OGMs), independentemente de se tratar de plantas, micróbios ou animais. Entre as preocupações levantadas pelos opositores aos OGMs e plantas GMs, em particular, está o potencial de o transgene “escapar” e contaminar o ambiente, o aumento potencial de reações alérgicas resultantes da presença

do transgene ou seu produto, alterações inesperadas resultantes da manipulação genética na introdução de novos antígenos em plantas e incertezas em geral sobre como o crescimento e testes de plantas utilizadas na produção de compostos bioativos para humanos seria monitorado (Teli & Timko, 2004).

O cultivo de plantas transgênicas ou geneticamente modificadas tem sido agora uma atividade comum na agricultura da América do Norte, mas em certos países da Europa ainda há grande relutância na aceitação de sua introdução. Mas apesar destas incertezas, o potencial desta tecnologia é muito evidente para o comércio mundial, e uma extensa gama de material experimental tem sido testada, em laboratório e em campo (Dunwell, 1999).

Alguns exemplos de proteínas recombinantes de mamíferos produzidos à base de vegetais têm sido relatados, essencialmente em nível de escala de laboratório, em tabaco, incluindo proteínas do sangue (Cramer et al. 1996; Dieryck et al. 1997), proteínas lácteas (Salmon et al. 1998), proteínas estruturais (Ruggiero et al. 2000), anticorpos (Ma and Hiatt 1996; Hood and Jilka 1999), antígenos e vacinas (Mason et al. 1992; Haq et al. 1995), fatores de crescimento (Higo et al. 1993) e enzimas (Grill 1997; Ma et al. 1997).

Até o momento, não há produtos farmacêuticos oriundos de proteínas recombinantes obtidos a partir de plantas transgênicas no mercado (Boehm, 2006). Vários produtos estão em ensaios clínicos em humanos, essencialmente anticorpos, mas também há algumas plantas transformadas com genes codificadores de peptídeos vacinais comestíveis, principalmente contra uma enterotoxina de *E. coli* e do vírus da hepatite B (Gruber, 2001).

Durante as últimas duas décadas, aproximadamente 95 produtos biofarmacêuticos foram aprovados por uma ou mais agências reguladoras para o tratamento de várias doenças humanas, incluindo diabetes Mellitus, perturbações do crescimento, problemas neurológicos e genéticos, condições inflamatórias, e discrasias do sangue. Acredita-se que cerca de 500 agentes estão em desenvolvimento em todo o mundo, com cerca de 370 biofármacos nos E.U.A., incluindo 178 agentes dirigidos ao tratamento contra o câncer ou condições relacionadas, 47 contra as doenças infecciosas, e o restante contra importantes variedades de condições médicas (Goldstein & Thomas 2004).

## 2.4 Produção de EPO recombinante

A produção recombinante da EPO tem sido realizada em diversos sistemas, os quais incluem células de mamíferos, como COS-1 (Jacobson et al., 1985) e CHO (Lin et al., 1985). De forma experimental, a EPO foi introduzida em células de insetos (Quelle et al., 1989), bactérias (Lee-Huang, 1984), e leveduras (Elliott et al., 1989). Nenhum dos sistemas testados, com exceção das células de mamíferos, teve sucesso em produzir EPO recombinante ativa devido à incapacidade destes sistemas em processar corretamente as glicosilações, que possuem importante papel na atividade da proteína.

A EPO foi expressa com sucesso de forma transgênica em leite de porcos (Park et al., 2006), apresentando atividade funcional na eritropoiese, apresentando apenas pequenos problemas fisiológicos nos animais, como baixa qualidade do esperma, disfunção erétil em alguns machos e elevadas quantidades de reticulócitos e hematócritos em ambos os sexos.

Experimentos conduzidos em plantas para expressão da EPO recombinante foram realizados em cultura de células de tabaco BY2, que apresentaram aproximadamente 0,0026% do total de proteínas de extrato bruto, mas as proteínas foram ativas apenas *in vitro* e não *in vivo* (Matsumoto et al., 1995).

Em outro esforço para produzir EPO recombinante em plantas, tabaco e *Arabidopsis* foram transformadas. A super-expressão do gene causou efeitos pleiotrópicos no tabaco, incluindo crescimento vegetativo retardado, nanismo, arranjo das folhas em roseta e tanto o tabaco quanto *Arabidopsis* apresentaram esterilidade masculina (Cheon et al. 2004). A proteína expressa apresentou um tamanho de aproximadamente 1,5 kDa menor que a proteína controle, não tendo sido feitas análises da viabilidade e atividade da mesma. No entanto, nenhuma explicação conclusiva foi atribuída para esclarecer estes problemas apresentados pelas plantas.

## **Capítulo 3**

**Transgenic expression of human erythropoietin in plants**

**(Manuscrito a ser submetido a *Transgenic Research*)**

## **Transgenic expression of human erythropoietin in plants**

Fernanda Sperb<sup>1</sup>; Isabel C.R.Werlang<sup>2</sup>; Márcia Margis-Pinheiro<sup>3</sup>; Luiz A. Basso<sup>2</sup>; Diógenes S. Santos<sup>2</sup> and Giancarlo Pasquali<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS; <sup>2</sup>Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS; <sup>3</sup>Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

\* Corresponding author. C.P. 15.005, CEP 91501-970. Tel.: +55 51 3316 9410. *E-mail address:* pasquali@cbiot.ufrgs.br

## Abstract

Erythropoietin (EPO) is a hormone that belongs to a group of growth hematopoietic factors, which control the proliferation and differentiation of marrow bone's cells. It acts inducing the elevation of the production of blood red cells, increasing the amount of circulating hemoglobin and oxygen. In the present work we intend to evaluate the expression of human EPO in plants such as rice (*Oryza sativa*) and tobacco (*Nicotiana tabacum*). The EPO gene was synthesized based on the nucleotide "overlapping" technique. A fragment of 582 bp correspondent to cDNA of EPO was cloned, a mutation on nucleotide 252 (G→A) was identified. It did not modify the encoded amino acid, a glycine. This fragment was transferred to the expression vector pWUbi.tml, armed with the promoter of the ubiquitin gene and the terminator tm1'. This expression cassette was transferred to the binary vector pWBVec4a, which was then transformed into strains ALG1 and LB4404 of *Agrobacterium tumefaciens*. These strains were employed in the genetic transformation of rice and tobacco, respectively. Transgenic integration into plant genomes was evaluated by PCR and Southern blot hybridization. The expression of EPO in plants was detected performing RT-PCR and Real-Time PCR analysis and the presence of the protein was evaluated by SDS-PAGE and Western blot, successfully proving the obtainance of transgenic plants expressing EPO. By self-fecundation, it was obtained Generation T1, which has presented mendelian segregation, and none of the plants had presented any kind of miss-formation or deformity. It was not possible to obtain rice transgenic plants due to the deficiency of them in the regeneration process, possibly due to the overexpression of the transgene.

Keywords: Erythropoietin, transgenic expression, ubiquitin promoter, tobacco, rice, biopharmaceutical protein.

## Introduction

Oxygen is required by the cells of mammals for oxidative respiration and other biochemical reactions. The excess of oxygen, however, leads to an oxidative damage of multiple cellular components resulting, at the end, in cellular death. The hemoglobin in red cells loads the oxygen from the lungs and makes it available to others tissues. The number of circulating red cells is the main determinant of tissue oxygenation. Each day a normal human being removes 1% of the red cells of the circulation and restitutes them in equal number of reticulocytes. However, this daily production of red cells is strictly regulated, and the mediator of this perfect homeostatic control of the number of red cells for oxygenation of the tissues is EPO (Koury, 2005).

The erythropoietin (EPO) is an endogenous cytokine essential for the development and maturation of red cell ancestors, capable to regulate the circulating levels of red cells in the blood. Its production occurs in the kidneys as well as in the livers of embryos, being secreted in the circulation of hematopoietic tissues as a consequence of some states of hypoxia and in response to cobalt chloride (CoCl<sub>2</sub>). Hypoxia is the main physiological stimulation to increase the expression of the EPO gene (Jelkmann, 1992).

The human EPO gene is located in chromosome 7q11-22, consisting of five exons and four introns. Post-transcriptionally, it generates one single mature transcript, which produces a polypeptide that contains 193 amino acids. During post-translational modifications, glycosylation occurs with the addition of three *N*-linked oligosaccharides to Asn-24, Asn-38 and Asn-83, and an acidic *O*-linked oligosaccharide to Ser-126. Additionally, two disulphide bonds are formed between Cys-7 and Cys-161 and between Cys-29 and Cys-33, concomitantly to the removal of the 27 amino acid hydrophobic secretory sequence. It is given credit that the Arg-166 in the COOH-terminal portion is cleaved off before the release of EPO in the circulation, with the primary structure of this mature protein containing 165 amino acids. The molecular mass of the polypeptide and its glycosylated form is esteemed in 18 kD and 30 kD, respectively (Ng et al., 2003).

Under clinical purposes, EPO is used in the treatment of anemia caused by chronic renal diseases, in the maintenance of the dialysis and renal transplant, anemia associated to malignance such as tumors and cancers, those related to marrow bone and stem cells transplants, anemia resulting from surgeries and those associated to infections

by the Human Immunodeficiency Virus (HIV). There are still other potential applications of EPO like in auto-immune diseases, haemolysis, acute renal insufficiency, patients in critical health state and with the need of sanguineous transfusion, cerebral ischemic damages, injuries in the spinal marrow and neurological recovery, beyond congestive cardiac diseases (Winearls, 1998; Weiss, 2003; Ng, 2005).

The EPO gene has already been transgenically expressed with success in cells of mammals of type COS-1 (monkey kidney; Jacobs et al., 1985), CHO (chinese hamster ovary; Lin et al., 1985), COS-7 and BHK (baby hamster kidney; Jerry et al., 1986). Other systems have already been used for the production of recombinant EPO, for instance, milk of pigs. However, such transgenic expression resulted in a high tax of mortality, besides sterility of animals (Park et al., 2006). There are also works that mentioned the expression of EPO in cells of insects (Quelle et al., 1989), bacteria (Lee-Huang, 1984) and yeasts (Elliott et al., 1989), but these systems are incapable to execute the correct post-transcriptional and pos-translational processing necessary for the activity of the protein *in vivo*.

An alternative to reduce costs and to facilitate EPO production is the expression of the recombinant protein in plant systems. Similar to other animal proteins of pharmacological importance expressed in plants (Ma et al, 2003; Fischer & Emans; 2000), transgenic plants are one of the feasible alternatives for the production of EPO. The production of recombinant proteins in plants presents several advantages in relation to the other methods. It is esteemed that the production cost of recombinant proteins in plants could be 10 to 50 times lesser if compared with the same protein produced in *Escherichia coli*. Classic methods of protein expression require significant investments in the purification steps of due amounts of the recombinant protein or in the employment of expensive media for cell or tissue culture (Fischer & Emans, 2000).

The expression of genes in animal cell cultures allows the correct synthesis of human and other mammal products. However, besides being expensive systems of production, the products and the cells in culture are very sensible to ambient changes, especially when cultivated under industrial scale (Giddings, 2001). Transgenic plants, however, produce high levels of functional and safe recombinant proteins that can be cultivated in agricultural scale and requires only the transgenic plant, water, minerals and sun light (Fischer & Emans, 2000), having advantages in relation to all expression systems



already established in terms of capacity, flexibility, scale and cost of production. Besides, the area where transgenic plants are planted can be adapted and altered according to the demand of the product per year, without additional costs (Boehm, 2006).

Matsumoto *et al.* (1995) had produced EPO in plant cells in culture, but the activity of the proteins was detected only *in vitro*, not demonstrating results of activity of the recombinant protein *in vivo*.

The work of Cheon *et al.* (2004) describes the expression of EPO in plants, but morphologic deformities and masculine sterility were also mentioned in tobacco and *Arabidopsis thaliana* plants as a result of strong expression of the EPO gene in the tissues.

In the present work we tested the expression of a sequence of cDNA corresponding to the mRNA of the human EPO in transgenic plants using *Nicotiana tabacum* (tobacco) and *Oryza sativa* (rice) as models. Differently from the previous mentioned works, we tested a different promoter sequence with known mild expression in plant tissues. The resulting transgenic tobacco plants expressed the EPO gene as well as accumulated the recombinant protein in leaves and other tissues. Additionally and equally important, transgenic tobacco plants were morphologically normal in relation to the control, non-transgenic plants, and generated descendants with the proven presence of transgene.

## Materials and Methods

### Construction, cloning and sequencing of a human EPO cDNA clone

The full coding sequence of the human erythropoietin (EPO) cDNA was synthesized using the oligonucleotide “overlapping” technique (Santos et al., 2005). Sequences of the synthetic oligonucleotides (Invitrogen) are represented in Figure 1. The final PCR product with 582 bp was cloned into pCR-Blunt vector (Invitrogen) according to manufacturer’s instructions. Recombinant plasmid clones were fully sequenced in an ABI3100 Automatic Sequencer (Applied Biosystems) platform (ACTGene, Centro de Biotecnologia, UFRGS), confirming the identity of the synthetic human EPO cDNA sequence (Figure 2).

### Construction of the EPO expression cassette for plant transformation

The corresponding EPO cDNA sequence was excised from pCR-Blunt using the endonuclease *EcoRI*, and transferred to pWUbi.tml (Wang et al., 2002) cut with *EcoRI*. In doing so, the EPO cDNA was ligated between the promoter followed by the first intron of the maize ubiquitin gene and the terminator *tm1'*. The expression cassette was then transferred to the pWBVec4a binary vector (Wang et al., 2002) using the *EcoRI* and *NotI* endonucleases. The resulting recombinant plasmid was introduced in *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 or LBA4404 by heat shock (Sambrook & Russell; 2001). Transformed agrobacteria were selected in LB medium containing 50 µg/mL spectinomycin and 50 µg/mL rifampicin.

### Tobacco leaf transformation

The genetic transformation of leaf disks of *Nicotiana tabacum* cultivar SR1 'Little Havana' was carried out in accordance with the protocol established by Horsch et al. (1991). About 100 leaf disks had been placed in infection plates containing MS medium,

100  $\mu$ M acetoseringone and 0.75 mL of a stationary-stage culture of *A. tumefaciens* LBA4404::pWBVec4a-EPO, for about 20 min. After infection by agrobacteria, leaf disks were transferred to the co-culture medium (MS medium, 0.1  $\mu$ g/mL naftalaenoacetic acid and 1  $\mu$ g/mL benziladenine purine), being kept in the dark for 48 h at 26 °C and under a photoperiod of 16 h. After that, tissues were placed on selection and regeneration medium (MS medium, 100 mg/L cefotaxime and 10 mg/L Basta) for a period of 40 days under the same conditions. Regenerated seedlings were transferred to isolated bottles containing complete MS medium increased by cefotaxime and the herbicide Basta. After the elimination of residual agrobacteria and reaching the expected size, plants were transferred to vases containing vermiculite and black soil (1: 1) in a green house at 26 °C and photoperiod of 16 h.

#### Rice callus transformation

The transformation of *Oryza sativa* cultivar Nipponbare calli was carried in accordance with the protocol established by Hiei et al. (1994). About 120 calli were placed in Erlenmeyer flasks containing liquid NB, 100  $\mu$ M acetoseringone and bacteria emptied from one Petri dish with LB medium and *A. tumefaciens* AGL1::pWBVec4a-EPO grown for 3 days. After incubation at room temperature for approximately 10 minutes, infected calli were transferred to co-culture medium (NB medium and 100  $\mu$ M acetoseringone), being kept in the dark for 48 h at 28°C. After that, tissues were washed with sterile water containing 150 mg/L timetine, dried on sterile filter paper and placed on selection and regeneration medium (NB medium, 100 mg/L cefotaxime, 150 mg/L timetine and 10 mg/L Basta) for a period of 40 days. Proliferating calli were transferred to isolated plates containing complete NB medium increased by cefotaxime, timetine and Basta to fully eliminate resident agrobacteria. Established transformed callus lines were transferred to pre-regeneration medium for 10 days, followed by 30 more days in regeneration medium at 25 °C under a photoperiod of 16 h. Regenerated seedlings were transferred to vases with black soil and vermiculite (1:1) under the same conditions of temperature and light regime.

## Analysis of transgenic plants by PCR

Plant DNA extraction was carried out in accordance to the protocol established by Doyle & Doyle (1987). Approximately 50 ng of genomic DNA from each potential transgenic plant as well as from control untransformed plants were used in polymerase chain reaction (PCR) analyses. Reactions were carried in a total volume of 25  $\mu$ l containing 1X reaction buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 10 pmol of corresponding EPO primers E1 and E16, and 2.5 U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Reaction conditions were 94 °C for 5 min followed by 30 cycles of 94 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, 72 °C for 45 s, and a final step of 72 °C for 10 min. PCR products were horizontally electrophoresed in 1% agarose gels and visualized by ethidium bromide staining under UV light (254 nm). Best specific primer pairs were designed with the employment of the GenScript Corporation's Real-Time PCR Primer Design Tool ([www.genscript.com/ssl-bin/app/primer](http://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer)). Primers were synthesized by the Integrated DNA Technologies Inc.

## Southern blot hybridization

Twenty  $\mu$ g of genomic DNA were digested with *Eco*RI and *Hind*III separately, and resolved by electrophoresis in 0.8% agarose gel. A fragment corresponding to the ~580 bp human EPO cDNA was used as probe, derived from the endonuclease digestion of pCR-Blunt-EPO. Southern blot, probe labeling and hybridization, stringency washings and probe detection were carried out essentially according to the specifications of the AlkaPhos Direct Labeling kit (GE Healthcare).

## Reverse-transcription PCR

Total RNA was extracted using the Purelink Plant RNA Reagent (Invitrogen) in accordance with the miniprep protocol of the manufacturer instructions. RNA samples were then treated with DNase I (Invitrogen) at 25 °C for 15 min. One  $\mu$ g of DNase I-treated total RNA was used for cDNA first-strand synthesis using the Superscript III RT Pre-amplification System (Invitrogen) and the VT<sub>25</sub>-primer. The following amplification

by PCR was performed using the pair of primers E1 and E16, specific to the EPO sequence, as well as RT5.1 (5'-CATGTGGATAAAGCCGTCAG-3') and RT3.1 (5'-AGCAGTGATTGTTTCGGAGTG-3'), specific to a tobacco tubulin gene TUB FOR (5'-GCAAGTACATGGCTTGCTGT-3') and TUB REV (5'-CACACTTGAATCCTGTTGGG-3'). PCR products of 500 bp and 125 bp are respectively expected after amplification under the same conditions described above.

### Quantitative RT-PCR

Quantitative reverse-transcription PCR (qRT-PCR) was carried out in an Applied Biosystems 7500 Real-time cycler. Reaction settings were composed of an initial denaturation step of 5 min at 94 °C followed by 45 cycles of 10 s at 94 °C, 15 s at 60 °C, and 15 s at 72 °C. Samples were kept for 2 min at 40 °C for reannealing and then heated from 55 to 99 °C with a ramp of 0.1 °C/s to acquire data to produce the denaturing curve of the amplified products. qRT-PCRs were performed in 20 µl final volume composed of 10 µl of each RT-sample diluted 50 times in 2 µl of 10X Platinum Taq PCR buffer (Invitrogen), 1.2 µl of 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 µl of 5 mM dNTPs, 0.4 µl of primer pairs at 10 µM each, 4.95 µl ultra pure water, 1.0 µl of SYBR Green (1:100,000, Molecular Probes), and 0.05 µl of Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen). The melting temperatures of all primers were adjusted to 60 °C. Tubulin gene sequences were used as internal controls to normalize the amount of mRNA present in each sample.

### SDS-PAGE and Western blot

Leaf total proteins were prepared according to Jefferson & Wilson (1994) with the following modifications: protein samples were extracted with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, 10 mM EDTA, 0.1% (w/v) Sarcosyl, 0.1% (v/v) Triton X-100 and 10 mM β-mercaptoethanol. After centrifugation (10 min at 13,000 rpm), the supernatant was collected and dialyzed against 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, exceeding 100 times sample volume. Total protein was determined using the BCA Protein Assay Kit (Pierce). Twenty µg of protein were separated in denaturing (SDS) 12% polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE). Other 20 µg of total protein and 2.5 ng of recombinant EPO were

resolved in a second SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane (GE Healthcare) by gravity according to Memelink et al., 1994. The membrane was blocked with 5% skim milk dissolved in 1X PBS. The membrane was incubated with anti-EPO antibody (1:10,000) and secondary antibody (1:5,000) in TPBS. After, the membrane was revealed essentially according to the specifications of the ECL Western Blot Detection and Analysis System (GE Healthcare) and exposed to an X-ray film.

#### Molecular and genetic analysis of T1 plants

Control and EPO-transformed tobacco plants were self-pollinated and corresponding seeds were superficially sterilized with 1% hypochlorite for 20 min and 70% ethanol for 1 min, followed by 3 washings with sterile distilled water. Seed germination and viability were evaluated by incubation of 100 seeds in triplicates in Petri dishes containing MS medium with or without 10 mg/L Basta for approximately one month at 25 °C with a photoperiod of 16 h. Viable T1 (or F1-control) plants were transferred to individual jars containing MS medium and 10 mg/L Basta. T1 (and F1) plant leaves, stems and roots were analyzed by PCR and qRT-PCR to evidence the presence of the EPO transgene and mRNA

## Results

### Cloning of the human erythropoietin (HsEPO) gene

Based on HsEPO gene sequence available at the GenBank (NM\_000799 and NM\_000799.2 [gi:62240996]), a cDNA version of it was synthesized employing the nucleotide overlapping technique (Santos et al., 2005). One PCR fragment product of 582 bp was cloned into the pCR-Blunt vector (Invitrogen; Figure 1A). The resulting full coding sequence of the HsEPO was submitted to automatic sequencing in order to confirm its integrity and fidelity (Figure 2A, B and C). In this process, a single mutation at nucleotide 252 (G→A) was identified and, since this modification (GGG → GGA) did not change the encoded amino acid (glycine), the identity of the sequence was confirmed.

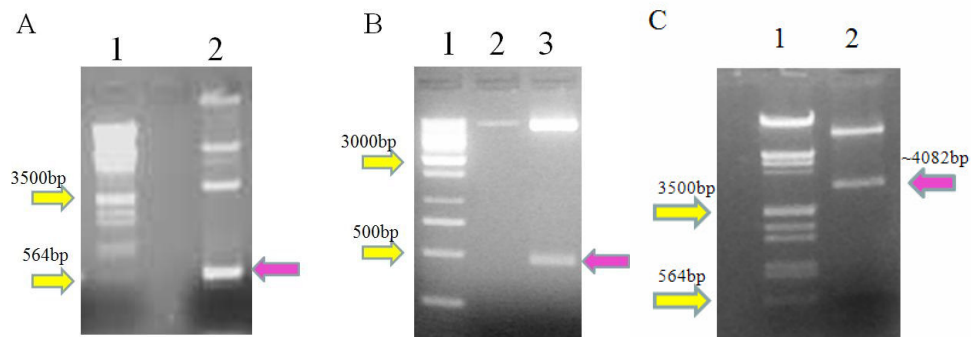


Figure 1: (A) Lane 1,  $\lambda$  DNA cleaved with *EcoRI/HindIII* as molecular size marker; lane 2: pCR-Blunt::HsEPO exhibited the expected 582 bp fragment corresponding to the HsEPO cDNA. (B) Lane 1, GeneRule 1 kb DNA Ladders as molecular size marker; lane 2, pWUbi-tm1'; lane 3, pWUbi-tm1'::HsEPO exhibited the expected fragment corresponding to the HsEPO cDNA. (C) Lane 1,  $\lambda$  DNA cleaved with *EcoRI/HindIII* as molecular size marker; lane 2: pWBVec4a::HsEPO exhibited the expected 4082 bp fragment corresponding to the  $P_{ubi}$ -HsEPO- $T_{tm1'}$  expression cassette.

A

gatgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttctcctgtccc  
gtcctgggcgccccaccagcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggtacctctggaggccaaggagg  
ccgagaatatcacgacggctgtgctgaacactgcagcttgaatgagaatatcactgtcccagacaccaagt  
taatttctatgcctggaaggatggaggtcgggcagcaggccgtagaagtctggcagggcctggcctgctg  
tcggaagctgtcctgcggggccaggccctgttggtcaactcttcccagccgtgggagcccctgcagctgcatg  
tggataaagccgtcac  
tggccttcgcagcctcaccactctgcttcgggctctgcgagcccagaaggaagccat  
ctccctccagatgcggcctcagctgctc  
cactccgaacaatcactgctgacacttccgcaaacctctccga  
gtctactccaatttccctcggggaagctga  
agctgtacacaggggaggcctgcaggacaggggacagatga

B

ref|NM\_000799.2| Homo sapiens erythropoietin (EPO), mRNA  
Length=1340  
GENE ID: 2056 EPO | erythropoietin [Homo sapiens] (Over 100 PubMed links)  
Score = 1062 bits (575), Expect = 0.0  
Identities = 581/582 (99%), Gaps = 0/582 (0%)  
Strand=Plus/Plus

Query	1	ATGGGGGTGCACGAATGTCCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCTGCTGTCTGCTCCCT	59
Sbjct	182	ATGGGGGTGCACGAATGTCCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCTGCTGTCTGCTCCCT	241
Query	60	CTGGGCCTCCCAGTCTGGGCGCCCCACCACGCCTCATCTGTGACAGCCGAGTCTGGAG	119
Sbjct	242	CTGGGCCTCCCAGTCTGGGCGCCCCACCACGCCTCATCTGTGACAGCCGAGTCTGGAG	301
Query	120	AGGTACCTCTTGAGGCCAAGGAGGCCGAGAATATCACGACGGGCTGTGCTGAACACTGC	179
Sbjct	302	AGGTACCTCTTGAGGCCAAGGAGGCCGAGAATATCACGACGGGCTGTGCTGAACACTGC	361
Query	180	AGCTTGAATGAGAATATCACTGTCCCAGACACCAAAGTTAATTTCTATGCCTGGAAGAGG	239
Sbjct	362	AGCTTGAATGAGAATATCACTGTCCCAGACACCAAAGTTAATTTCTATGCCTGGAAGAGG	421
Query	240	ATGGAGGTCGGAACAGCAGGCCGTAGAAGTCTGGCAGGGCCTGGCCCTGCTGTCTCGGAAGCT	299
Sbjct	422	ATGGAGGTCGGGACAGCAGGCCGTAGAAGTCTGGCAGGGCCTGGCCCTGCTGTCTCGGAAGCT	481
Query	300	GTCTGCGGGGCCAGGCCCTGTGGTCAACTCTTCCCAGCCGTGGGAGCCCCTGCAGCTG	359
Sbjct	482	GTCTGCGGGGCCAGGCCCTGTGGTCAACTCTTCCCAGCCGTGGGAGCCCCTGCAGCTG	541
Query	360	CATGTGGATAAAGCCGTCAGTGGCCTTCGCAGCCTCACCCTCTGCTTCGGGCTCTGGGA	419
Sbjct	542	CATGTGGATAAAGCCGTCAGTGGCCTTCGCAGCCTCACCCTCTGCTTCGGGCTCTGGGA	601
Query	420	GCCCAGAAGGAAGCCATCTCCCTCCAGATGCGGCCTCAGCTGCTCCACTCCGAACAATC	479
Sbjct	602	GCCCAGAAGGAAGCCATCTCCCTCCAGATGCGGCCTCAGCTGCTCCACTCCGAACAATC	661
Query	480	ACTGCTGACACTTTCGCAAACCTTCCGAGTCTACTCCAATTTCTCCGGGGAAAGCTG	539
Sbjct	662	ACTGCTGACACTTTCGCAAACCTTCCGAGTCTACTCCAATTTCTCCGGGGAAAGCTG	721
Query	540	AAGCTGTACACAGGGGAGGCCTGCAGGACAGGGGACAGATGA	581
Sbjct	722	AAGCTGTACACAGGGGAGGCCTGCAGGACAGGGGACAGATGA	763



## C

[GENE ID: 2056 EPO](#) | erythropoietin [Homo sapiens] (Over 100 PubMed links)

Score = 271 bits (693), Expect = 2e-71  
Identities = 193/193 (100%), Positives = 193/193 (100%), Gaps = 0/193 (0%)  
Frame = +2

```
Query 2   MGVHECPawlwlllslslplglpvlgapprLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHC 181
          MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHC
Sbjct 1   MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPR LICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHC 60

Query 182 SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQA VEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQL 361
          SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQA VEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQL
Sbjct 61   SLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQA VEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQL 120

Query 362  HVDKAVSGlrslltllralraQKEa isppdaasaapLRTITADTFRK LFRVYSNFLRGK L 541
          HVDKAVSGLRSLTLLRALRAQKEAISP PDAASAAPLRTITADTFRK LFRVYSNFLRGK L
Sbjct 121  HVDKAVSGLRSLTLLRALRAQKEAISP PDAASAAPLRTITADTFRK LFRVYSNFLRGK L 180

Query 542  KLYTGEACRTGDR 580
          KLYTGEACRTGDR
Sbjct 181  KLYTGEACRTGDR 193
```

Figure 2: (A) mRNA sequence of the EPO. Start codon (underline), primer E1 (yellow), primer E16 (green), primer RT5.1 (pink), primer RT3.1 (blue) and stop codon (dotted) are represented. (B): Alignment of the sequence of clone containing EPO by Blastn. Mutate codon in red. (C): Alignment of the sequence of clone containing EPO by Blastx.

The corresponding sequence of the HsEPO cDNA was transferred to the pWUbi.tml1 vector (Wang et al., 1998), between the promoter of a maize ubiquitin gene (Christensen & Quail, 1996) with its first intron and the terminator *tml1'* that is part of the *Agrobacterium* tumor morphology large gene terminator. This expression cassette named “P<sub>ubi</sub>-HsEPO-T<sub>tml1'</sub>” was transferred to the pWBVec4a binary vector (Wang et al., 1998), between right and left borders of the T-DNA. As shown in Figure 2C, cloning of the correct cassette into both vectors was proved to be correct by endonuclease digestion followed by agarose gel electrophoresis. Binary vector pWBVec4a contains the plant selectable marker phosphinothricin acetyltransferase gene (*ppt*) from *Actinomyces coelicolor*, also under the control of the 35S promoter and the *tml1'* terminator, capable to confer tolerance to the Basta herbicide. Finally, the resulting recombinant binary plasmid was introduced into *A. tumefaciens* AGL1 and LBA4404 in order to respectively transform rice (*Oryza sativa*) and tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants.

## Generation of transgenic plants containing the HsEPO and DNA analysis

Using the protocol defined by Hiei et al. (1994) for rice callus transformation, 30 primary transformed calli were clearly tolerant to 40mg/L Basta. These calli were isolated and transferred to the regeneration medium in the presence of Basta, but only few plants did survive. At the end, only two plants were successfully regenerated and transferred to soil in order to set seeds. Although DNA extracted from leaf tissues of these plants proved to be transformed by the HsEPO cDNA when PCR analysis was carried out (results not shown), both plants were morphologically normal but did not survive after transfer to the soil.

Using the traditional tobacco leaf disc transformation method described by Horsch *et al.* (1991), only two transgenic tobacco plants were recovered after transformation and selection under 40 mg/L of Basta. Considering that 100 leaf discs were initially treated with *A. tumefaciens*, such efficiency of 2% was considered very low when compared to our previous experiences with transformation efficiencies of up to 45%. In those cases, we employed binary vectors containing the kanamycin resistance gene (*nptII*) like pMOG402 (Kern, 2003) and pCAMBIA2300 (Felippes 2005).

Primary PCR analysis of the two regenerated tobacco plants proved their transgenic state since a band of approximately 600 bp was generated with the HsEPO specific 5'- and 3'-flanking primers, and no band was visualized when DNA from the wild-type, untransformed tobacco plant was assayed (Figure 3).

Southern blot analysis was further carried out in order to confirm the integration of the transgene into the genome of tobacco plants as indicated by the PCR result. After many trials to hybridize the HsEPO probe (~600 bp) to the endonuclease-digested tobacco DNA, the only visible signal perceived was the positive control (cold-probe; results not shown). Therefore, we could not prove unequivocally the transgenic state of the regenerated plants by Southern blot analysis.

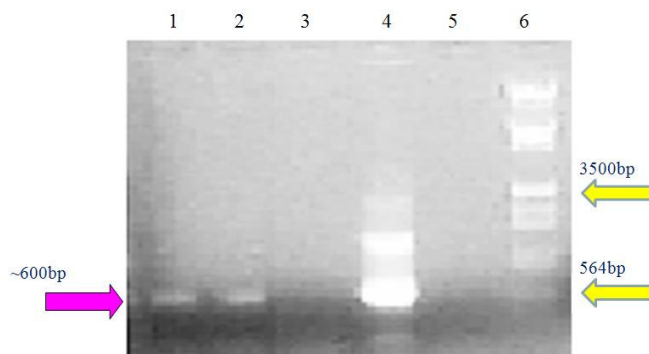


Figure 3: PCR analysis of HsEPO-transgenic and wild-type tobacco plants. The image represents the result of an agarose gel electrophoresis where products of PCR employing the HsEPO 5'- and 3'-flanking primers were resolved. Lanes 1 and 2: HsEPO-transgenic plants 1 and 2; lane 3: wild-type tobacco (negative control); lane 4: pCR-Blunt::HsEPO (positive control); line 5: PCR mix without template DNA (negative control); line 6:  $\lambda$  DNA cleaved with *EcoRI/HindIII* as molecular size marker. DNA samples derived from transgenic plants and pCR-Blunt::HsEPO exhibited the expected 582 bp fragment corresponding to the HsEPO cDNA.

#### RNA and protein expression of tobacco transgenic plants containing the HsEPO cDNA

The transcriptional expression of the HsEPO transgene in tobacco plants was confirmed by RT-PCR and qRT-PCR. The amplified HsEPO cDNA presented the expected product size of 600 bp when assayed by RT-PCR employing the two 5'- and 3'-flanking primers (Figure 4A) and 125 bp when using internal primers). The electrophoresis analysis of the RT-PCR products revealed that transgenic tobacco plant “2” accumulate about twice the amount of HsEPO compared to the plant “1”. In order to confirm such assumption, quantitative (real-time) RT-PCR was carried out using the pair of internal primers. Results shown in Figure 4B proved that plant “2” presented 2.15 times more HsEPO mRNA than plant “1”.

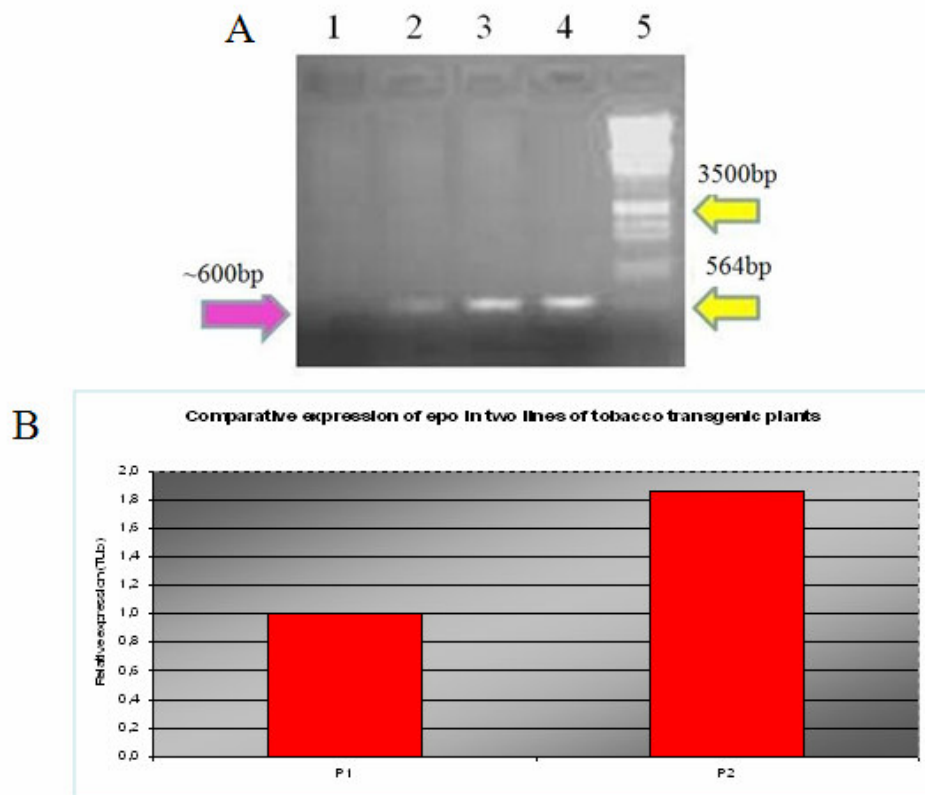


Figure 4: (A) RT-PCR analysis for transgenic tobacco plants. The transgenic samples showed the amplified 500 bp fragment with epo specific primers. Lane 1, wild-type tobacco as a negative control, lanes 2 and 3 transgenic plants 1 and 2 respectively; lane 4, positive control; line 5, molecular marker  $\lambda$ /EcoRI/HindIII. (B): Quantitative (real-time) RT-PCR analysis of the HsEPO relative expression from total RNA isolated from transgenic and control tobacco plants. Results are expressed as the relative quantitation of HsEPO amplification products against the independent internal tubulin control gene and the control, untransformed tobacco plant. To establish a comparison between the level of expression of the two plants, the plant 1 was determined as 1.

Transgenic tobacco plants were also tested for the presence of the HsEPO protein by SDS-PAGE and western blot. After many SDS-PAGE assays employing different amounts of total protein extracts resulted from different extraction procedures, it was not possible to clearly visualize distinguishing bands of around 20-30 kDa among transformed and wild-type plants (Figure 5A). Such results indicated that the HsEPO protein, if present,

may accumulate in very low concentrations in leaf, stem or root tissues of the transgenic tobacco plants.

Nevertheless, the employment of anti-HsEPO antibody in western blot assays allowed us to visualize a 30 kDa band corresponding to the HsEPO protein in comparison to the positive, commercially available control HsEPO protein (Figure 5B). Interestingly, the tobacco-derived HsEPO seemed to be heavier than the control sample.

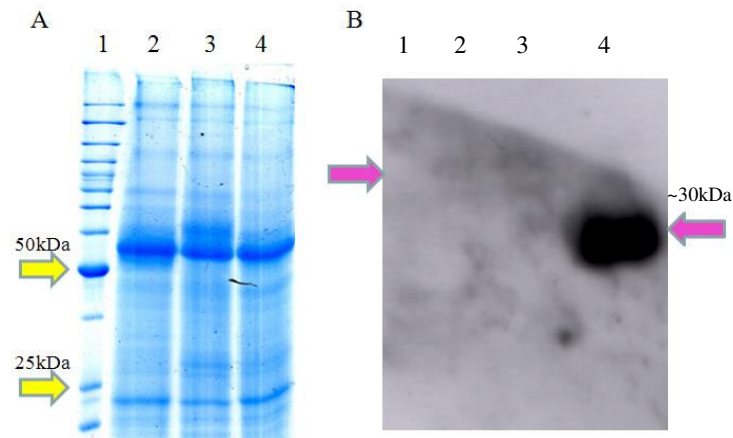


Figure 5: (A) SDS-PAGE analysis of HsEPO transgenic and control tobacco plants. Twenty micrograms of total proteins extracted from leaves of transgenic lines 1 (Lane 2), 2 (Lane 3) and wild-type (Lane 4) tobacco. Lane 1 corresponds to the weight molecular marker (Invitrogen). A band of 20-30 kDa corresponding to the HsEPO protein could not be clearly visualized in the figure. (B) Western blot analysis of transgenic and control tobacco plants. Twenty micrograms of total proteins extracted from leaves of wild-type (Lane 1), transgenic lines 1 (Lane 2), 2 (Lane 3) tobacco and positive control (Lane 4) using commercial HsEPO.

#### Morphology and viability of HsEPO-transgenic tobacco plants

Earlier trials to express the HsEPO gene in plants resulted in either abnormal phenotypes or infertility (Cheon et al., 2004). Transgenic tobacco plants generated in the present work kept *in vitro*, as well as plants transferred and maintained on soil in greenhouse presented no morphological modifications in comparison with control plants of the same age and under identical conditions (Figure 6A). The HsEPO transgenic plants blossomed at the

same time as wild-type tobacco with normal appearance and visible floral structures (Figure 6B and 6C). They were allowed to self-fertilize and set seeds like wild-type plants. A T<sub>1</sub> progeny sample of 12 individuals from each transgenic plant were grown on selective MS medium containing Basta. Only two plants of each transgenic line presented recessive for the *ppt* transgene. Such result was also confirmed by detection of the HsEPO cDNA and mRNA respectively by PCR (Figure 6) and qRT-PCR.

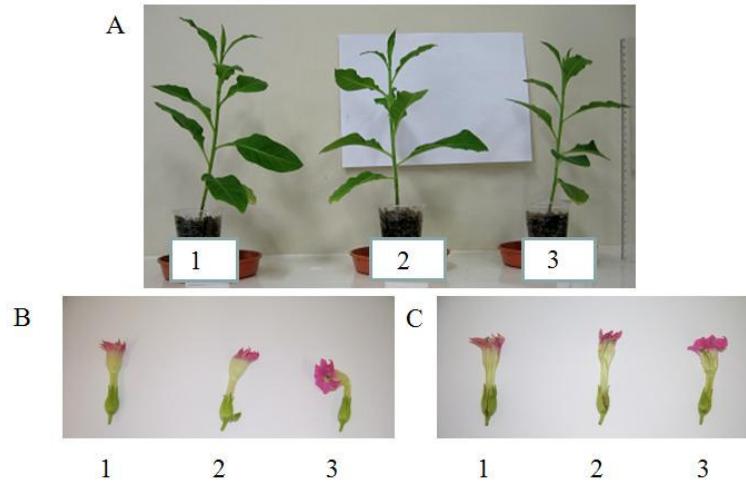


Figure 6: Plants and flowers from transgenic tobacco lines expressing HsEPO and a wild-type line. (A) 2-month old plants kept on soil in a greenhouse. General phenotypes of transgenic and untransformed plants were indistinguishable. (B) Entire and (C) longitudinally-cut flowers showed no clear anatomical or morphological modifications.

Table 1: Efficiency of germination

Medium	Descendants of	n. of seeds	A (30 seeds)	B (30 seeds)	C (30 seeds)	Media	Standart deviation	Total of germination	Efficiency %
Without basta	control	90	28	30	30	29,33	1,15	88	97
	1	90	26	28	24	26	2	78	86
	2	90	17	21	18	22	2,08	56	62
With 40 mg/L Basta	control	90	0	0	0	0	0	0	0
	1	90	23	25	21	23	2	69	76
	2	90	12	10	7	9,66	2,51	29	32

The plants 1 and 2 were self-fertilization and seeds have germinated in MS medium for testing the efficiency of germination and analysis of F1 generation (Table 1). For each

line 90 seeds were placed to germinate. A, B and C represent different experiments. 97% of the descendants of the control plant germinated, of the seed germinated, 86% of the plant 1 germinated and 62% of the plant 2 germinated. When BASTA was added to the medium the efficiency of germination decreased for plants 1 and 2 for respectively 76% and 32%.

Only 3 plants did not show the segregation of the gene for erythropoietin and all positive plants for the presence of the gene showed some level of expression.

In preliminary results, the plants 1/1 and 1/10 descendants of the plant 1 and plants 2/10 and 2/11 descendants of the plant 2 were those that had higher levels of expression of the erythropoietin gene for Real-Time PCR (results not shown).

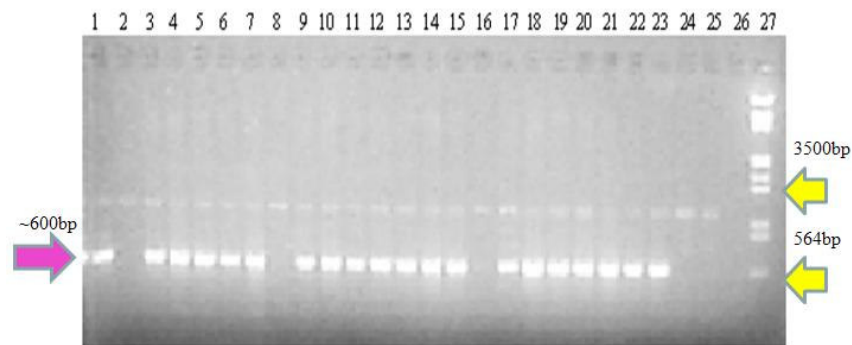


Figure 7: PCR analysis of T<sub>1</sub> and F<sub>1</sub> tobacco plants. Agarose gel electrophoresis of PCR products employing the HsEPO 5'- and 3'-flanking primers. Lanes 1-12: T<sub>1</sub> samples derived from the self-pollination of transgenic plant "1"; lanes 13-23: T<sub>1</sub> samples derived from the self-pollination of transgenic plant "2"; lanes 24-26: F<sub>1</sub> samples of wild-type tobacco; lane 27: molecular size marker  $\lambda$  *EcoRI/HindIII*. Transgenic samples exhibited the 582 bp fragment corresponding to the HsEPO cDNA.

## Discussion

Since the first experiments lead by Paul Berg (Jackson et al., 1972) and Stanley Cohen & Herbert Boyer (Cohen et al., 1973) proving the feasibility of heterologous expression of proteins, scientists have promised and struggled with the dream of producing high valuable medicines in the most straightforward way possible. Human genes encoding pharmacologically-active peptides were among these valuable medicines, and plants, essentially depending on sun and water, the very cheapest vectors for genetic engineering (reviewed by Ma et al., 2003; Stoger et al., 2005; Boehm, 2006). After 36 years of continuous research, it is surprising that only a few recombinant human proteins produced by transgenic plants are commercially available (see, for instance, Daniell, 2001; Goldstein & Thomas, 2004). Reasons for such poor applicable results span from basic difficulties concerning trustable expression systems to biosafety and regulation policies to plant, commercialize and consume genetically modified organisms and their derivatives. Nevertheless, confident that genetic engineering will also prove itself in the area of molecular farming, we tested the expression capabilities of a cDNA sequence encoding the human erythropoietin (HsEPO) peptide in transgenic *Nicotiana tabacum* (tobacco) and *Oryza sativa* (rice) plants.

Although HsEPO-transgenic rice plants could not be unambiguously regenerated and kept in culture, we successfully generated two transgenic lines of tobacco containing the HsEPO cDNA integrated in their genomes. The expression of HsEPO in transgenic plant systems has already been previously published. In 1995, Matsumoto et al. generated BY2-tobacco cells in suspension producing the EPO peptide up to 0.0026% of total protein. That recombinant EPO was proved to have only *in vitro* activity. According to the authors, no plants were regenerated from those cells, which forbids us to draw more comparisons to our work. To our knowledge, after 1995 only one single paper, published by Cheon et al. in 2004, described EPO gene expression in transgenic plants. In that work, Cheon et al. (2004) were able to transform and regenerate *Arabidopsis* and tobacco plants containing a HsEPO cDNA. Unfortunately, all T<sub>0</sub> plants showed malformations and male sterility. It was shown in that study that the over-expression of EPO causes pleiotropic effects in plants including vegetative growth retardation, arrangement of leaves in rosette,



and boom slowed, in addition to the sterility and deformation of flower buds. Details of the real causes for such abnormal phenotypes were not specified.

Differently from the previous mentioned work, the plants obtained in the present work did not show any type of malformation when compared to wild-type plants, both in the two T<sub>0</sub> tobacco lines as well as in both T<sub>1</sub> progenies. Vegetative growth and general leaf, stem, leaf, root and flower organ anatomy were identical to control plants. Additionally, our transgenic and control plants flourished, set seeds after self-fertilization and generated viable descendants, showing that they were perfectly fertile. Seed germination rates were similar for all plants and the fertilization rate of transgenic plants performed even better than control plants when counting the number of fruits and seeds per fruit (results not shown).

Our failure to obtain HsEPO-transgenic rice plants and the low efficiency of our tobacco plant transformation (2 plants out of 100 leaf discs) might be due to some negative effect of the HsEPO gene product over plant cells. In addition to the results here presented, two other transformation attempts were performed in our laboratory with 200 tobacco leaf discs in total and not a single plant was regenerated under Basta selection (results not shown). As mentioned before, such low efficiency is not usual in our experiences. When selecting transgenic events, only those plantlets with clear healthy phenotypes were collected from Petri dishes and, therefore, we mostly believe that the HsEPO proteins does have a negative effect on plant cells, as previously described by Cheon et al. (2004). This was later corroborated by the observation that very low amounts of HsEPO are present in leaves of the two transgenic lines obtained, and only and faintly detectable by anti-HsEPO antibodies.

Some differences between the work done by Cheon et al. (2004) and ours are worth to mention. First, we used a different version of the HsEPO cDNA, which contained a silent mutation point. Both sequences are available at the GenBank under the access numbers NM\_000799 and NM\_000799.2 [gi:62240996]. Secondly, we worked with different varieties of tobacco. While we used the *N. tabacum* SR1 Little Havana, Cheon et al. (2004) employed variety Xanthi. But the most important difference was the gene constructions used. Our construction contained the ubiquitin (*ubi*) promoter and the *tm1'* terminator from maize controlling the HsEPO cDNA expression. The maize *ubi* 5'-sequence is known to be a very strong promoter in monocotyledonous (monocot) cells, but

not so effective in dicotyledonous (dicot) cells (Hauptmann et al, 1988; Christensen et al, 1992; Takumi et al., 1994; Christensen & Quail, 1996; Tyagi et al., 1999; Upadhyaya et al., 2000; Jeoung et al., 2002; Abumhadi et al., 2005). We employed this promoter to control the expression of the HsEPO cDNA in rice (a monocot) and tobacco (a dicot). Again, this may explain, at least partially, the fact that we obtained two normal tobacco plants expressing HsEPO mRNA and its protein, but none for rice. The higher expression of EPO in the rice tissues might have resulted in toxic effects, not allowing the regeneration of viable plants. Cheon et al. (2004) employed the Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35S promoter to drive the HsEPO cDNA expression, which is a promoter for high-level transcription in dicot plants (Ma et al. 2003). Their results with such a strong expression in both dicots tested (*Arabidopsis* and tobacco) were sterile and morphologically affected phenotypes.

Although not always comparable due to differences in many other variables involved, the scientific literature is rich in examples of works employing both *ubi* and 35S promoters. For instance, Upadhyaya et al. (2000) demonstrated that the Ubi-1 promoter produced 30-fold higher  $\beta$ -glucuronidase (GUS) activity in transgenic rice plants than the 35S promoter. In the optimization of sorghum transformation parameters using genes encoding the green fluorescent protein (GFP) and the GUS protein as visual markers, Jeoung et al. (2002) also tested the *ubi* and 35S promoters, proving that for both reporter genes, the expression driven by the *ubi* promoter was higher than the expression driven by the 35S 5'-end sequence. These works show how important is the choice of promoters. According to Ma et al. (2003), the advantages of such strong promoters to drive gene expression in transgenic plants include the increased stability of the encoded protein and the protein accumulation in vegetative organs. This is true for non-toxic proteins, but it seems not to be the case for the HsEPO peptide.

One of the prospects of this work will be introduce in the construction containing the *epo* gene a promoter seed-specific such as the zein promoter of maize, which demonstrably leads to gene expression only for the grain, testing the effectiveness of this construction in maize (Sherthaner et al 1988; Fromm & Russell, 2004). We also want to find ways to increase the percentage of recombinant protein produced, testing new constructions or even trying determine whether some type of post-transcriptional or post-traducional silencing can be reversed.

The objectives of this study were achieved, proving that it is possible to get plants expressing epo with normal morphology and reproduction capability. We believe that the levels of recombinant proteins can be quite improved, not only for epo, but for various human proteins expressed in plants, where there were found similarly low levels of expression, in order to contribute to the progress in the production of human proteins of pharmacological interest on a large scale.

### **Acknowledgements**

We thank Dr. C.R.R.S. Carlini and Ms. A.H.S. Martinelli for assistance with western blot analysis, Dr. R. Margis and M.T. Jahns for their assistance with qRT-PCR. This research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil).

## References

- Abumhadi N, Kameranova K, Todorovska E, Dimov G, Takumi S, Nakamura C, Anzai H and Atanassov A (2005) Effects of three promoters in barley transformation by particle bombardment of mature and immature embryos *Biotechnol & Biotechnol Eq* 19.
- Boehm R (2006) The Use of Plants and Plant Cell Cultures for the Bioproduction of Proteins *J Verbr Lebensm* 1 (Suppl 1): 120–125.
- Cheon BY, Hae Kim J, Oh KH, Bahn SC, Ahn JH, Choi JW, Ok SH, Bae JM and Shin JS Overexpression of human erythropoietin (EPO) affects plant morphologies: retarded vegetative growth in tobacco and male sterility in tobacco and Arabidopsis *Transgenic Research* 13: 541–549.
- Christensen AH and Quail PH (1996) Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants *Transgenic Res* 5: 213–218.
- Christensen AH, Sharrock RA and Quail PH (1992) Maize polyubiquitin genes: Structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation *Plant Mol Biol* 18:675-689.
- Cohen Stanley N, Chang ACY, Boyer HW, Helling RB (1973) Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro *Proc Nat Sci USA* 70 (11): 3240-3244.
- Daniell H, Streatfield S J and Wycoff K (2001) Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants *Trends in Plant Science* 6:219-226.
- Doyle JJ and Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue *Phytochem Bull* 19: 11-15.
- Elliott S, Giffin J, Suggs S, Lau EP and Banks AR (1989) Secretion of glycosylated human erythropoietin from yeast directed by the *a*-factor leader region *Gene* 79: 167–180.
- Fischer R and Emans N (2000) Molecular farming of pharmaceutical proteins *Transgenic Res* 9: 279-299.
- Felipe Fenselau de Felippes (2005) *Obtenção de plantas com níveis de ligninas mais apropriados à produção de papel* Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Genética e Molecular, UFRGS, Porto Alegre 127 f.
- Fischer R and Emans N (2000) Molecular farming of pharmaceutical proteins *Transgenic Res* 9: 279-299.
- Giddings G (2001) Transgenic plants as protein factories *Curr Opin Biotechnol* 12: 450–454.

- Goldstein DA and Thomas JA (2004) Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants *QJM: An International Journal of Medicine* 97:705-716.
- Hauptmann, RM, Vasil V, Ozia-Akins P, Tabaeizadeh Z, Rogers SG, Fraley RT, Horsch RB and Vasil IK (1988) Evaluation of selectable markers for obtaining stable transformants in the Gramineae *Plant Physiology* 86:602-606.
- Hiei Y, Ohta S, Komari T and Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and sequence analysis of boundaries of the T-DNA *plant J* 6: 271-282.
- Horsch RB, Fry J, Hoffmann N, Neidermeyer J, Rogers SG and Fraley RT (1991) Leaf disc transformation. In: Gelvin SB, Schilperoort RA and Verma DPS (eds) *Plant Molecular Biology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, B3, 1-9.
- Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, KaufmanRJ, Mufson A et al. (1985) Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin *Nature* 313: 806–810.
- Jackson DA, Symons RH and Berg P (1972) A Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into SV40 DNA: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and Galactose Operon of *E. coli* *Proc Nat Sci USA* 69: 2904.
- Jefferson RA and Wilson KJ (1994) The *gus* gene fusion system. In: Gelvin SB, Schilperoort RA, Verma DPS (eds), *Plant Molecular Biology Manual* (section B14/ 9-33) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Jelkmann (1992) Erythropoietin: Structure, control of production, and function *Physiol Rev* 72: 449-489.
- Jeoung et al (2002) Optimization of sorghum transformation parameters using genes for green fluorescent protein and  $\beta$ -glucuronidase as visual markers *Hereditas* 137: 20–28.
- Jerry SP, Berkner KL, Lebo RV and Adamson JW (1986) Human Erythropoietin Gene: High Level Expression in Stably Transfected Mammalian Cells and Chromosome Localization *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 6465-6469.
- Kern MF (2003) Expressão de uma quitinase de *Metarhizium anisopliae* em *Nicotiana tabacum*: Obtenção de plantas transgênicas resistentes a doenças fúngicas. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, 84 p.
- Koury MJ (2005) Erythropoietin: the story of hypoxia and a finely regulated hematopoietic hormone *Experimental Hematology* 33:1263–1270.
- Lee-Huang S (1984) Cloning and expression of human erythropoietin cDNA in *Escherichia coli* *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 2708–2712.

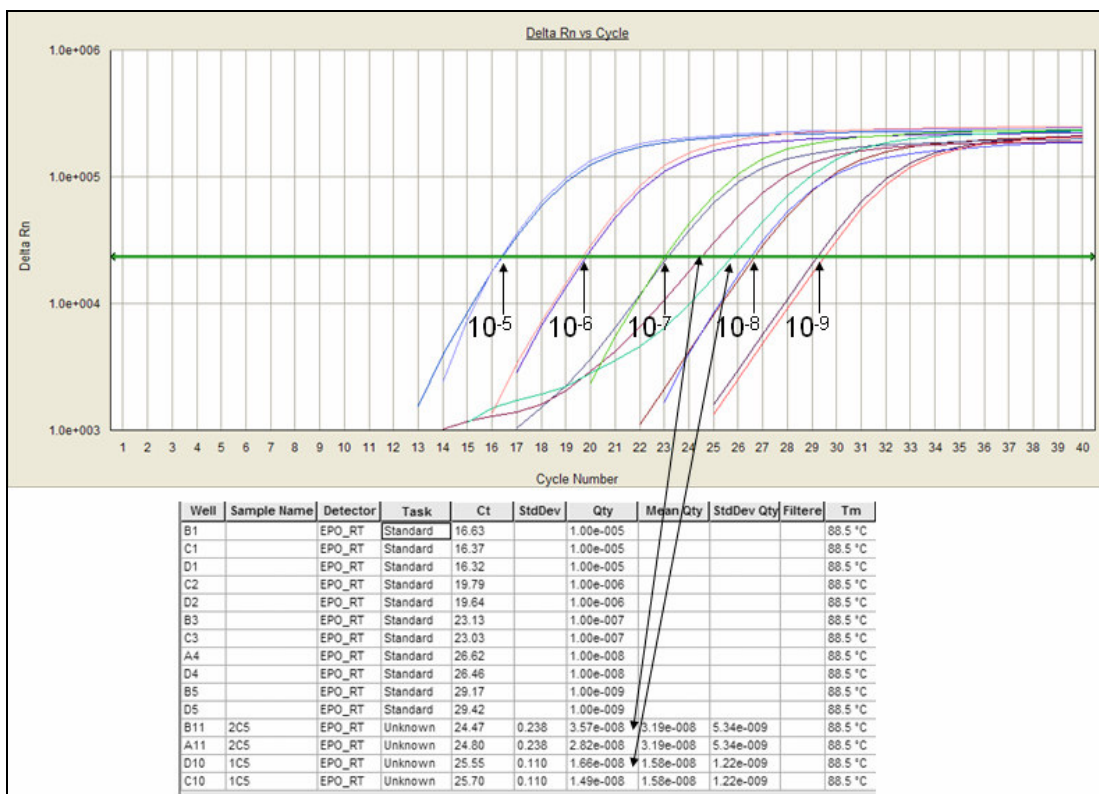
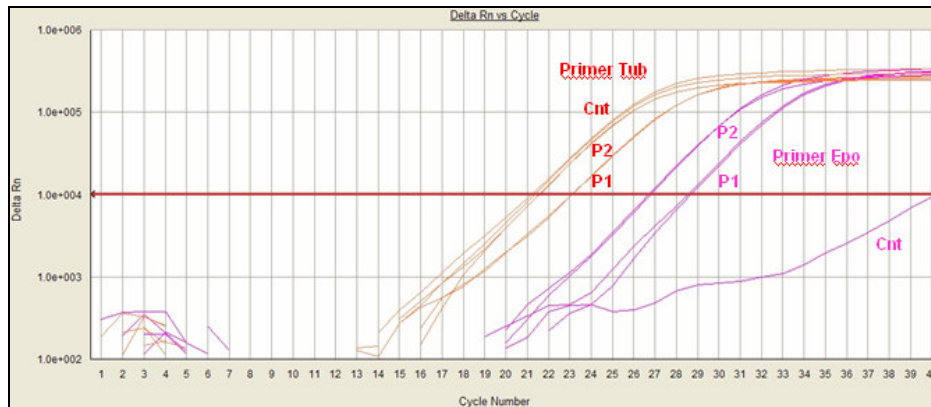
- Lin F, Suggs S, Lin C, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, Chen K, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z, Badrawi S, Lai P and Goldwasser E (1985) Cloning and expression of the human erythropoietin gene *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 7580-7584.
- Ma JK, Drake PM and Christou P (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants *Nat Rev Genet* 4: 794–805.
- Matsumoto S, Ikura K, Ueda M and Sasaki R (1995) Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells *Plant Mol Biol* 27: 1163–1172.
- Memelink J, Swords KMM, Staehelin LA and Hoge JHC (1994) Southern, Northern and Western Blot Analysis. In: Gelvin SB and Schilperoort RA (eds) *Plant Molecular Biology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, F1, 1-23.
- Ng T, Marx G, Littlewood T and Macdougall I (2003) Recombinant erythropoietin in clinical practice *Postgrad Med J* 79:367–376.
- Park J, Lee Y, Lee P, Chung H, Kim S, Lee H, Seo M, Han J, Park C, Kim H, Kim Y, Min K, Kim J, Lee H, Chang W (2006) Recombinant human erythropoietin produced in milk of transgenic pigs *Journal of Biotechnology* 122 : 362–371.
- Quelle FW, Caslake LF, Burkert RE and Wojchowski DM (1989) High-level expression and purification of a recombinant human erythropoietin produced using a baculovirus vector *Blood* 74: 652–657.
- Russell DA and Fromm ME (2004) Tissue-specific expression in transgenic maize of four endosperm from maize and rice *Transgenic Research* 6(2): 157-168.
- Santos DS, Basso LA, Renard G, Fonseca IO and Chies JM (2005) Método de Obtenção de Sequências Nucleotídicas Quiméricas e Sequência Nucleotídica Quimérica ( INPI: PI0506047-8).
- Sambrook J and Russell D (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Shernthaner JP, Matzke MA and Matzke JM (1988) Endosperm-specific activity of a zein gene promoter in transgenic tobacco plants *EMBO J* 7(5): 1249-1255.
- Takumi S, Otani M and Shimada T (1994) Effect of six promoter-intron combinations on transient reporter gene expression in einkorn, emmer and common wheat cells by particle bombardment of scutellar tissue: frequency is influenced by culture duration *Plant Sci* 103:161-166.
- Tyagi AK, Mohant A, Bajaj S, Chaudhury A and Maheshwari SC (1999) Transgenic rice: a valuable monocot system for crop improvement and gene research *Critical Rev Biotech* (19): 41 - 79.

Upadhyaya NM, Surin B, Ramm K, Gaudron J, Schunmann PHD, Taylor W, Waterhouse PM, Wang MG (2000) *Agrobacterium* mediated transformation of Australian rice cultivars Jarrah and Amaroo using modified promoters and selectable markers *Australian Journal of Plant Physiology* 27(3): 201-210.

Wang M-B, Li Z, Mathews PR, Upadhyaya NM, Waterhouse PM (1998) Improved vectors for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of monocot plants *Acta Hort* 461:401-407.

Weiss NJ (2003) New insights into Erythropoietin and Epoetin Alpha: Mechanisms of Action, Target Tissue and Clinical Applications *The Onchologist* 8(3):18-29.

Winearls, CG (1998) Recombinant human erythropoietin: 10 years of clinical experience *Nephrol Dial Transplant* 13(2): 3-8.



Annex 1: Quantitative (real-time) RT-PCR analysis of the HsEPO relative expression from total RNA isolated from transgenic and control tobacco plants. Results are expressed as the relative quantization of HsEPO amplification products against the independent internal tubulin control gene and the control, untransformed tobacco plant.



## **Capítulo 4**

### **Discussão Geral**

## Discussão Geral

Neste trabalho, foram obtidas plantas transgênicas contendo o gene (cDNA) da EPO humana. Para obter estas plantas, foram transformados por *A. tumefaciens* discos foliares de tabaco e calos de arroz. Obtivemos apenas duas plantas transgênicas de tabaco contendo o gene de interesse. Plântulas de arroz também foram obtidas, mas as mesmas morreram antes que o ciclo de regeneração se completasse. A expressão do gene *epo* nas duas plantas de tabaco obtidas foi comprovada por RT-PCR convencional e quantitativa, evidenciando-se que a planta denominada 2 apresentou maior expressão que a planta 1.

A baixa eficiência de transformação para as duas espécies vegetais levantaram a questionamentos, visto que os protocolos de transformação utilizados em nossos laboratórios estão bem estabelecidos, assim como as cultivares utilizadas, com ótimos resultados obtidos para outros genes de interesse (Kern, 2003; Fellipes, 2005; Korbes, 2006), sugerindo que o problema deveria estar na construção utilizada.

Em uma ampla revisão bibliográfica realizada, foram encontrados alguns trabalhos demonstrando grandes diferenças na expressão de genes devido aos promotores escolhidos, com especificidade desta eficiência relacionada ao fato de as plantas serem monocotiledôneas ou dicotiledôneas (Christensen et al., 1992; Christensen & Quail, 1996; Tyagi et al., 1999). Como estas diferenças já eram previamente conhecidas, escolhemos cultivares pertencentes aos dois grupos para as transformações: arroz, representando as monocotiledôneas, e tabaco, representando as dicotiledôneas para a expressão do gene *epo*. No presente trabalho, foi utilizado o promotor do gene da ubiquitina de milho (Ubi-1), juntamente com o primeiro íntron do gene, promotor este conhecido por apresentar altos níveis de expressão em monocotiledôneas e também ser eficiente em dicotiledôneas, apesar de apresentar níveis de expressão mais baixos (Christensen & Quail, 1996; Tyagi et al., 1999). Foram relatadas construções baseadas no promotor do gene da ubiquitina de milho (Ubi1) capazes de produzir um aumento de 10 vezes na expressão gênica transiente em protoplastos de milho eletroporados quando comparados a construções baseadas no promotor CaMV 35S (Christensen et al., 1992), e de 3 a 50 vezes maior do que construções utilizando o promotor e o primeiro íntron do gene da álcool desidrogenase (Adh1) de milho (Taylor et al., 1993). No entanto, o promotor 35S é de 10 a 100 vezes

menos eficaz em monocotiledôneas em comparação com dicotiledôneas, como cenoura e petúnia (Hauptmann et al., 1988).

A eficácia das construções contendo os promotores de 35S, Ubi1 e Act1 (actina) foi analisada em células de trigo cultivado. A construção pAHC27 contendo o promotor Ubi1 teve atividade transiente com 39,9 a 46,4 vezes mais elevados que a construção pBI221 contendo o promotor 35S (Takumi et al., 1994). Em um trabalho realizado por Jeoung et al. (2002), que visou a otimização dos sistemas de transformação de sorgo utilizando os genes *gfp* e *gus* sob ação dos promotores Ubi1, 35S, Act1, Adh1 e HBT (promotor do gene HOBBIT, essencial para a formação do meristema da raiz), os autores demonstraram resultados em que o promotor Ubi1 foi o mais efetivo, e mostrou maior número de pontos fluorescentes quando comparado com as construções com os promotores 35S e também HBT. Estes resultados foram comprovados em três linhas de sorgo testadas. Quando os testes foram conduzidos com o gene *gus*, o promotor Ubi1 também apresentou maior número de pontos de expressão transiente quando comparados ao promotor 35S. A ordem de força dos promotores analisados neste trabalho foi estabelecida como Ubi1 > 35S > Act1 > Adh1.

Considerando tais trabalhos, é possível que a superexpressão, gerada em maior escala nas plantas de arroz, tenha levado as plantas à morte devido a um elevado comprometimento da maquinaria celular e ao possível efeito tóxico da EPO expressa (veja adiante), assim como nas plantas de tabaco, que por apresentarem um nível de expressão um pouco menor, ainda permitiu a regeneração de apenas duas plantas com anatomia e capacidade de reprodução normais.

Proteínas foliares derivadas das plantas de tabaco foram submetidas a SDS-PAGE e Western blot para a detecção da EPO recombinante. As análises por SDS-PAGE não permitiram visualizar a presença de uma banda que diferenciasse as plantas transgênicas da planta controle. Porém, por intermédio do Western blot, foi possível visualizar as bandas que, apesar de muito fracas, estavam presentes nas plantas 1 e 2 mas não na planta controle. O fraco sinal pode ser devido à baixa expressão do gene e, conseqüentemente, baixo acúmulo desta proteína, o que permitiu que essas plantas sobrevivessem.

Em diversos trabalhos em que foram realizados esforços para a super-expressão de genes humanos em plantas, uma baixa quantidade de proteínas geradas por estas plantas foi observada, o nível de proteínas de interesse farmacêutico produzido em plantas

transgênicas tem sido menor que 1% das proteínas solúveis totais das plantas (Daniell, 2001; Goldstein & Thomas, 2004). Conforme apresentado na Revisão Bibliográfica desta Dissertação, entre os exemplos observados, pode-se citar a albumina sérica humana, com 0,002% do total de proteínas solúveis, a proteína C humana, que apresentou apenas 0,001% das proteínas solúveis totais e, mesmo Matsumoto et al. (1995), que obtiveram 0,0026% ao tentar produzir EPO em células de tabaco em suspensão. Estes dados mostram que os níveis de síntese das proteínas farmacologicamente ativas necessitam ser otimizados para a comercialização das mesmas (Daniell 2001).

Alguns fatores que podem explicar o baixo índice de proteínas recombinantes produzidas por nossas plantas são os efeitos de silenciamento transcricional, silenciamento pós-transcricional, inativação em *trans* e co-supressão (Finnegan & McElroy, 1994; Grant, 1999; Meyer, 1999). Estes mecanismos representam um sistema de defesa para a detecção e inativação de DNAs invasivos como transgenes, transposons e vírus, os quais poderiam comprometer a viabilidade de células que expressam elevados níveis das proteínas e mRNAs associados a estes elementos exógenos (Matzke & Matzke, 1998; Fu et al., 2000). De modo geral, quando o transgene está presente como cópia única e a quantidade do seu transcrito permanece abaixo de certo limiar, seu padrão de expressão não é afetado. No entanto, ao transpor este limiar, o gene, o mRNA ou a proteína produzidos por ele tornam-se alvos potenciais para a inativação em qualquer um destes níveis (Wassenegger, 2002). No silenciamento gênico transcricional, a síntese do mRNA correspondente ao transgene é inibida devido à estrutura da cromatina associada e a metilações de resíduos de citosinas nas regiões promotoras das seqüências de DNA introduzidas. No silenciamento pós-transcricional, as regiões codificadoras estão sujeitas a metilações e este processo está associado à hidrólise de mRNAs produzidos de maneira aberrante (Grant, 1999). Na inativação em *trans*, genes contidos em um T-DNA podem ser inativados por metilação quando um segundo T-DNA é introduzido no genoma da célula vegetal, enquanto na co-supressão ocorre o silenciamento de genes endógenos que compartilham um alto grau de homologia com o transgene inserido, resultando na inativação de ambos (Finnegan & McElroy, 1994; Grant, 1999; Meyer, 1999; Kumar & Fladung, 2001, Kern, 2003).

Adicionalmente, quando há a integração simultânea de mais de uma cópia do transgene no genoma de uma célula vegetal, a orientação física de cada cópia dentro do loco transgênico também pode ser considerada uma fonte de variação na expressão do gene

exógeno. A introdução de cópias inversamente repetidas resulta em silenciamento por orientação complementar das cadeias de mRNA produzidas, caracterizando o fenômeno de silenciamento por RNA antisenso (Senior, 1998).

Uma vez ocorridos tais processos, a expressão do transgene pode ser restaurada após a segregação do mesmo em gerações subseqüentes, embora esta reversão ocorra com uma freqüência bastante pequena e sejam necessárias várias gerações para obter uma desmetilação total ou mesmo parcial do transgene (Finnegan & McElroy, 1994; Deineko et al., 2000). Por outro lado, há evidências de que o silenciamento gênico pode ocorrer *de novo* em qualquer geração, mesmo na descendência de plantas expressando ativamente o transgene e que efeitos de silenciamentos alternativos podem acontecer independentemente em transgenes heterólogos adjacentes (Fu et al., 2000).

Estes fenômenos podem fornecer possíveis justificativas para os casos em que a presença do transgene é detectada no DNA de plantas transformadas, mas nenhuma ou pequena quantidade de seu produto é sintetizada. Inúmeros trabalhos relatam grande variação nos níveis de expressão de transgenes codificadores de proteínas farmacologicamente ativas, o que reforça esta característica como propriedade inerente aos protocolos de transformação genética vegetal. Não raro, esta variabilidade é detectada nas diferentes etapas do processo de expressão gênica, como nas quantidades de mRNA do transgene e no conteúdo de proteína recombinante produzida.

Cheon et al. (2004) também realizaram uma tentativa de obter plantas transgênicas expressando *epo*, utilizando como modelo de estudo plantas de tabaco e *Arabidopsis*. Este trabalho se constitui no único relato de tentativa de expressar *epo* em plantas, segundo nossos conhecimentos. Estes autores também obtiveram plantas contendo o gene da *epo* para os dois modelos de estudo, mas todas as plantas regeneradas apresentaram malformações, como baixa estatura, inserção das folhas em rosetas, deformações nas flores e esterilidade masculina, indicando um efeito tóxico da proteína EPO codificada. Nossos dados contrastam com os obtidos pelo referido grupo, visto que nossas plantas apresentaram-se normais e viáveis, provavelmente devido a utilização de uma construção diferente da utilizada por eles. Conforme já discutido, nossa opção de seqüência promotora foi o de um promotor de milho (Ubi1), com expressão mais forte em monocotiledôneas, e eles utilizaram o promotor 35S, conhecido por ser mais eficiente em dicotiledôneas. Outro fator que diferenciou os dois trabalhos foi a escolha da variedade de tabaco utilizada para a

transformação, que no nosso caso foi a cultivar SR1 Little Havana e, no caso deles, a cultivar Xhanti. Outra diferença encontrada foi na seqüência de *epo* utilizada nas construções. No presente trabalho foi utilizada uma seqüência de cDNA construída por *overlapping* de DNA, contendo uma base diferente no nucleotídeo 252 (G→A), mas que não modifica o aminoácido codificado, sendo esta a nomeada versão 2.0 do gene da EPO. Não é possível determinar qual destes fatores influenciou para que fossem obtidas plantas de morfologia e viabilidade normais, mas é possível que o principal fator tenha sido a escolha do promotor utilizado.

A obtenção de plantas de tabaco contendo e expressando o gene *epo* é um fato bastante promissor, visto que o tabaco é a planta mais utilizada para a produção de espécies de proteínas recombinantes farmacêuticas em laboratórios de pesquisa em nível 4. As principais vantagens do tabaco incluem a tecnologia madura para a transferência genética e expressão, a alta produção de biomassa (100.000 kg por hectare de folhas de tabaco), o potencial para o rápido aumento de escala devido à prolífica produção de sementes, bem como a disponibilidade de infra-estrutura de grande escala para processamento de proteínas. Embora muitas cultivares de tabaco produzam altos níveis de alcalóides tóxicos, há variedades com baixo conteúdo de alcalóides que podem ser utilizadas para a produção de proteínas de produtos farmacêuticos.

Visando explorar todas as vantagens das plantas como hospedeiros para a expressão heteróloga de proteínas descritas em “Revisão Bibliográfica”, uma das perspectivas deste trabalho será introduzir na construção contendo o gene da *epo* um promotor de expressão específica de sementes como, por exemplo, o promotor das zeínas de milho, que comprovadamente leva a expressão gênica apenas para os grãos, testando a efetividade da expressão desta construção em milho (Sherthaner et al 1988; Russell & Fromm, 2004). Também pretendemos encontrar meios de aumentar o percentual final de proteína recombinante produzida, testando novas construções ou mesmo buscando determinar se algum tipo de silenciamento pós-transcricional ou pós-traducional possa ser revertido. Outra intenção é gerar métodos de purificação da EPO recombinante mais fáceis e baratos, aliando, por exemplo, a fusão do gene *epo* com o gene da oleosina, como proposto por Rooijen & Moloney (1995), onde com apenas alguns passos de centrifugação e a clivagem da porção protéica de interesse, se obtém o produto desejado purificado.

Os objetivos deste trabalho, portanto, foram atingidos, comprovando-se que é possível obter-se plantas expressando *epo* com morfologia e capacidade de reprodução normais. Acreditamos que os níveis de proteínas recombinantes possam ser bastante melhorados, não só para *epo*, mas para as diversas proteínas humanas expressas em plantas, onde se observaram níveis similarmente baixos de expressão, de forma a contribuir para o avanço na produção em grande escala de proteínas humanas de interesse farmacológico.

### 3 Referências Bibliográficas dos Capítulos 1, 2 e 4

Barta A, Sommergruber K, Thompson D, Hartmuth K, Matzke M and Matzke A (1986) The expression of a nopaline synthase human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue *Plant Mol Biol* 6: 347–357.

Boehm R (2006) The Use of Plants and Plant Cell Cultures for the Bioproduction of Proteins *J Verbr Lebensm* 1(1): 120–125.

Bonsdorff E and Jalavisto E (1948) A humoral mechanism in anoxic erythrocytosis. *Acta. Physiol. Scand.* 16:150–70.

Brandle JE, Rymerson R and Menassa R (2001) Perspectives on the production of recombinant proteins in plants *Ag Biotech Net* 3:1-4.

Bunn HF and Poyon RO (1996) Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia *Physiol Rev* 76: 839–885.

Carnot P and DeFlandre C (1906) Sur l'activité hématopoïétique des différents organes au cours de la régénération du sang. *C. R. Acad. Sci. Paris* 143:432–35.

Cheon BY, Hae Kim J, Oh KH, Bahn SC, Ahn JH, Choi JW, Ok SH, Bae JM and Shin JS (2004) Overexpression of human erythropoietin (EPO) affects plant morphologies: retarded vegetative growth in tobacco and male sterility in tobacco and Arabidopsis *Transgenic Research* 13: 541–549.

Cheung JA and Miller BA (2001) Molecular mechanisms of erythropoietin signaling *Nephron* 87: 215-222.

Christensen AH, Sharrock RA and Quail PH (1992) Maize polyubiquitin genes: Structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation *Plant Mol Biol* 18:675-689.

Christensen AH and Quail PH (1996) Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants *Transgenic Res* 5: 213–218.

Cramer CL, Weissenborn DL, Oishi KK, Grabau EA, Bennett S, Ponce E, Grabowski GA and Radin DN (1996) Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco. In: Collins G.B. and Shepherd R.J. *Engineering Plants for Commercial Products and Applications*. New York Academy of Sciences, New York, 62–71.

Cramer, C. *et al.* (1999) Transgenic plants for therapeutic proteins: linking upstream and downstream technologies *Curr Top Microbiol Immunol* 240: 95–118.

Daniell H, Streatfield S J and Wycoff K (2001) Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants *Trends in Plant Science* 6:219-226.



- Deineko EV, Novoselya TV, Zagorskaya AA, Filipenko EA, Shumnyi VK (2000) Expression instability of the marker *nptII* gene in transgenic tobacco plants *Russ J Plant Physiol* 47: 394-399.
- De Zoeten GA, Penswick JR, Horisberger MA, Ahl P, Schultze M and Hohn T (1989) The expression, localization, and effect of a human interferon in plants. *Virology* 172: 213–222.
- Dieryck W, Pagnier J, Poyart C, Marden MC, Gruber V, Bournat P, Baudino S and Merot B (1997) Human haemoglobin from transgenic tobacco *Nature* 385: 29–30.
- Dunwell JM (1999) Transgenic crops: the next generation, or an example of 2020 vision *Annals of Botany* 84: 269-277.
- Düring K, Hippe S, Kreuzaler F and Schell J (1990) Synthesis and self-assembly of a functional monoclonal antibody in transgenic *Nicotiana tabaccum* *Plant Molecular Biology* 15: 281-293.
- Ebert BL and Bunn HF (1999) Regulation of erythropoietin gene *Blood* 94: 1864–1877.
- Elliott S, Giffin J, Suggs S, Lau EP and Banks AR (1989) Secretion of glycosylated human erythropoietin from yeast directed by the *a*-factor leader region *Gene* 79: 167–180.
- Everett NP, Robinson KEP and Mascarenhas D (1987) Genetic Engineering of Sunflower (*Helianthus Annuus* L.) *Bio/Technology* 5: 1201 - 1204 .
- Felippes FF (2005) Obtenção de plantas com níveis de ligninas mais apropriados à produção de papel. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Giancarlo Pasquali. Porto Alegre. 127 p.
- Finnegan J and McElroy D (1994) Transgene inactivation: plants fight back! *BioTechnol* 12: 883-888.
- Fischer JW (1998) A quest for erythropoietin over nine decades *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:1–20.
- Fischer R and Emans N (2000) Molecular farming of pharmaceutical proteins *Transgenic Res* 9: 279-299.
- Fu X, Duc LT, Fontana S, Bong BB, Tinjuangjun P, Sudhakar D, Twyman RM, Christou P and Kohli A (2000) Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns *Transg Res* 9: 11-19.
- Giddings G (2001) Transgenic plants as protein factories *Curr Opin Biotechnol* 12: 450–454.

- Goldstein DA and Thomas JA (2004) Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants *QJM: An International Journal of Medicine* 97:705-716.
- Goldwasser E, Jacobson LO, Fried W and Plzak LF (1958) The effect of cobalt on the production of erythropoietin *Stud Erythrop* 13: 55–60.
- Graber SE and Kranz SB (1978) Erythropoietin and the Control of Red Cell Production *Ann Rev Med* 29:51-66.
- Graber SE and Kranz SB (1989) Erythropoietin: biology and clinical use *Hematol Oncol Clin North Am* 3:369–400.
- Grant SR (1999) Dissecting the mechanisms of post-transcriptional gene silencing: divide and conquer *Cell* 96: 303-306.
- Grill LK (1997) Viral-vectored, large scale production of drugs and pharmaceuticals in plants. Presentation at IBCs 3rd Annual International Symposium on Producing the Next Generation of Therapeutics: Exploiting Transgenic Technologies, West Palm Beach, FL.
- Gruber V, Berna PP, Thierry Arnaud<sup>1</sup>, Bournat P, Clement C, Mison D, et al (2001) Large-scale production of a therapeutic protein in transgenic tobacco plants : effect of subcellular targeting on quality of a recombinant dog gastric lipase *Molecular Breeding* 7: 329–340.
- Haq TA, Mason HS, Clements JD and Arntzen CJ (1995) Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants *Science* 268: 714–716.
- Hauptmann, RM, Vasil V, Ozia-Akins P, Tabaeizadeh Z, Rogers SG, Fraley RT, Horsch RB and Vasil IK (1988) Evaluation of selectable markers for obtaining stable transformants in the Gramineae *Plant Physiology* 86:602-606.
- Hiatt A, Cafferkey R and Bowdish K (1989) Production of antibodies in transgenic plants *Nature* 342: 76–78.
- Higo K, Saito Y and Higo H (1993) Expression of a chemically synthesized gene for human epidermal growth factor under the control of cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic tobacco *Biosci Biotechnol Biochem* 57: 1477–1481.
- Hood EE (2004) Bioindustrial and biopharmaceutical products from plants Proceedings of the 4th International Crop Science Congress, 26 Sep – 1 Oct 2004, Brisbane, Australia. Published on CDROM. [www.cropscience.org.au](http://www.cropsscience.org.au).
- Hood EE and Jilka JM (1999) Plant-based production of xenogenic proteins *Curr Opin Biotechnol* 10: 382–386.
- Horn ME, Woodard SL and Howard JA (2004) Plant molecular farming: systems and products *Plant Cell Rep* 22:711–720.

- Howard JA (2005) Commercialization of Biopharmaceutical and Bioindustrial Proteins from Plants *Crop Science* 45:468-472.
- Horsch R, Fry JE, Hoffman N, Eicholtz D, Rogers S and Fraley R (1985) A simple and general method for transferring genes into plants *Science* 227: 1229–1231.
- Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, KaufmanRJ, Mufson A et al. (1985) Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin *Nature* 313: 806–810.
- Jelkmann (1992) Erythropoietin: Structure, control of production, and function *Physiol Rev* 72: 449-489.
- Jeoung et al (2002) Optimization of sorghum transformation parameters using genes for green fluorescent protein and  $\beta$ -glucuronidase as visual markers *Hereditas* 137: 20–28.
- Jerry SP, Berkner KL, Lebo RV and Adamson JW (1986) Human Erythropoietin Gene: High Level Expression in Stably Transfected Mammalian Cells and Chromosome Localization *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 6465-6469.
- Kermode AR (2006) Plants as factories for production of biopharmaceutical and bioindustrial proteins: lessons from cell biology *Can J Bot* 84: 679-694.
- Kern MF (2003) Expressão de uma quitinase de *Metarhizium anisopliae* em *Nicotiana tabacum*: obtenção de plantas transgênicas resistentes a doenças fúngicas. 2003. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Giancarlo Pasquali. Porto Alegre, 84 p.
- Körbes AP (2006) Avaliação da capacidade de genes de *Eucalyptus grandis* em conferir tolerância à deficiência hídrica. 143 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Orientador: Giancarlo Pasquali. Porto Alegre, 143 p.
- Koury MJ (2005) Erythropoietin: the story of hypoxia and a finely regulated hematopoietic hormone *Experimental Hematology* 33:1263–1270.
- Kranz SB and Goldwasser E (1984) Specific binding of erythropoietin to spleen cells infected with the anemia strain of Friend virus *Proc Natl Acad Sci USA* 81:7574-7578.
- Kumar S, Fladung M (2001) Controlling transgene integration in plants *Trends Plant Sc* 6: 155-159.
- Kusnadi A, Nikolov ZL and Howard JA (1997) Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations *Biotechnol Bioeng* 56:473-484.

- Lee-Huang S (1984) Cloning and expression of human erythropoietin cDNA in *Escherichia coli* *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 2708–2712.
- Lin F, Suggs S, Lin C, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, Chen K, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z, Badrawi S, Lai P and Goldwasser E (1985) Cloning and expression of the human erythropoietin gene *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 7580-7584.
- Ma JK & Hein MB (1995) Immunotherapeutic potential of antibodies produced in plants *Trends Biotechnol* 13: 522-527.
- Ma JK, Drake PM and Christou P (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants *Nat Rev Genet* 4: 794–805.
- Ma JKC and Hiatt A (1996) Expressing antibodies in plants for immunotherapy. In: Owen MRL and Pen J. *Transgenic Plants: a Production System for Industrial and Pharmaceutical Proteins*. Wiley, Chichester, UK. 229–243.
- Ma S, Zhao D, Yin A, Mukherjee R, Singh B, Qin H, Stiller CR and Jevnikar AM (1997) Transgenic plants expressing autoantigens fed to mice to induce oral immune tolerance *Nat Med* 3: 793–796.
- Mascarenhas F (2007) Renais têm pouca opção de tratamento *A Tarde* Salvador. Bahia. 11/05/2007.
- Mason HS, Lam DM and Arntzen CJ (1992) Expression of hepatitis-B surface antigen in transgenic plants *Proc Natl Acad Sci USA* 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 Mol Biol* 27: 1163–1172.
- Matzke AJM and Matzke MA (1998) Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes *Curr Op Plant Biol* 1: 142-148.
- Meyer P (1999) The role of chromatin remodeling in transgene silencing and plant development *In Vitro Cell Develop Biol Plant* 35: 29-36.
- Miyake T, Kung CK-H and Goldwasser E (1977) Purification of human erythropoietin *J Biol Chem* 252:5558–64
- Ng T, Marx G, Littlewood T and Macdougall I (2003) Recombinant erythropoietin in clinical practice *Postgrad Med J* 79:367–376.
- Park J, Lee Y, Lee P, Chung H, Kim S, Lee H, Seo M, Han J, Park C, Kim H, Kim Y, Min K, Kim J, Lee H, Chang W (2006) Recombinant human erythropoietin produced in milk of transgenic pigs *Journal of Biotechnology* 122 : 362–371.

- Quelle FW, Caslake LF, Burkert RE and Wojchowski DM (1989) High-level expression and purification of a recombinant human erythropoietin produced using a baculovirus vector *Blood* 74: 652–657.
- Ratcliffe PJ, O'Rourke JF, Maxwell PH and Pugh CW(1998) Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression *J Exp Biol* 201: 1153–1162.
- Rooijen GJH and Moloney MM (1995) Structural requirements of oleosin domains for subcellular targeting to the oil-body *Plant Physiology* 109: 1353-1361.
- Ruggiero F Exposito J-Y Bournat P, Gruber V, Perret S, Comte J, Olganier B. Garrone R and Theisen M (2000) Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants *FEBS Lett* 469: 132–136.
- Russell DA and Fromm ME (2004) Tissue-specific expression in transgenic maize of four endospermfrom maize and rice *Transgenic Research* 6(2): 157-168.
- Salmon V, Legrand D, Slomianny MC, El Yazidi I, Spik G, Gruber V, Bournat P, Olganier B, Mison D, Theisen M, and Merot B (1998) Production of human lactoferrin in transgenic tobacco plants *Protein Expr Purif* 13, 127–135.
- Senior IJ (1998) Uses of plant gene silencing *Biotechnol Genetic Eng Rev* 15: 79-119.
- Shernthaner JP, Matzke MA and Matzke JM (1988) Endosperm-specific activity of a zein gene promoter in transgenic tobacco plants *EMBO J* 7(5): 1249-1255.
- Silva M, Grillot D, Benito A, Richard C, Nunez G and Fernandez-Luna J L (1996) Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through bcl-xL and bcl-2. *Blood* 88: 1576-1582.
- Sijmons PC, Dekker BMM, Schrammeijer B, Verwoerd TC, van den Elzen PJM and Hoekema A (1990) Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants *Bio/Technol* 8: 217–221.
- Stoger E, Sack M, Fischer R and Christou P (2002) Plantibodies: applications, advantages and bottlenecks *Current Opinion in Biotechnology* 13:161–166.
- Sundal E (1991) Treatment of transfusion-dependent anaemia of chronic renal failure with recombinant human erythropoietin. A European multicentre study in 142 patients to define dose regimen and safety profile *Nephrol Dial Transplant* 6(12): 955-65
- Tan C C, Eckardt K-U, Firth J D and Ratcliffe PJ (1992) Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia *Am J Physiol* 263: F474-F481.

Takumi S, Otani M and Shimada T (1994) Effect of six promoter-intron combinations on transient reporter gene expression in einkorn, emmer and common wheat cells by particle bombardment of scutellar tissue: frequency is influenced by culture duration *Plant Sci* 103:161-166.

Teli N P and Timko MP (2004) Recent developments in the use of transgenic plants for the production of human therapeutics and biopharmaceuticals *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79: 125–145.

Tyagi AK, Mohant A, Bajaj S, Chaudhury A and Maheshwari SC (1999) Transgenic rice: a valuable monocot system for crop improvement and gene research *Critical Rev Biotech* (19): 41 - 79.

Taylor MG, Vasil V and Vasil IK (1993) Rapid Production of Transgenic Wheat Plants by Direct Bombardment of Cultured Immature Embryos *Plant Cell Rep* 12:491–495.

Valadares C (2007) Doença renal avançada no país *Jornal de Brasília* Brasília. Distrito Federal. 10/05/2007.

Verpoorte R, Contin A, Memelink J (2002) Biotechnology for the production of plant secondary metabolites *Phytochem Ver* 1:13–25.

Walsh G (1998) Pharmaceuticals, biologics and biopharmaceuticals In: *Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology* (1–35) Wiley, Chichester, UK.

Wassenegger M (2002) Gene silencing-based disease resistance *Transgenic Res* 11:639-653.

Weiss NJ (2003) New insights into Erythropoietin and Epoetin Alpha: Mechanisms of Action, Target Tissue and Clinical Applications *The Oncologist* 8(3):18-29.

Winearls, CG (1998) Recombinant human erythropoietin: 10 years of clinical experience *Nephrol Dial Transplant* 13(2): 3–8.

Yazaki K, Matsuoka H, Ujihara T and Sato F (1999) Shikonin biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon*: light-induced negative regulation of secondary metabolism *Plant Biotechnol* 16: 335–342.

Zhong JJ (2002) Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes *J Biosci Bioeng* 94: 591-599.

Zhu H, Jackson T and Bunn HF (2002) Detecting and responding to hypoxia *Nephrol Dial Transplant* 17(1): 3–7.