



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

# **Expressão de Cyanovirin-N, um Microbicida Anti-HIV, em plantas**

Dissertação de mestrado apresentada à banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB).

Luisa de Moraes Madeira

Orientador: Elíbio Leopoldo Rech Filho, PhD  
Co-orientador: Cristiano Lacorte, PhD

Brasília

2008

Dedico este trabalho às mulheres e crianças da África Subsaariana, que são as principais vítimas da epidemia da AIDS no mundo. Que ele venha a ter algum significado para essas vidas no futuro.

## **Agradecimentos**

Agradeço aos meus pais, Maria Ormy e Eduardo, por serem os responsáveis pela minha educação, por todo amor e carinho, pelo companheirismo e amizade. Por serem a minha base nas horas mais difíceis e por sorrirem comigo nos momentos felizes, pela admiração e apoio e pelo crédito que sempre tiveram em mim. Amo muito vocês.

Ao meu irmão, Felipe, pela amizade e apoio.

A toda minha família, de Vitória e de Porto Alegre, pela amizade, pela força e por estarem sempre torcendo por mim.

Ao meu orientador, Dr. Elíbio Rech, pela oportunidade de trabalhar em um grupo de tamanha importância e por ter me presenteado com o projeto desta dissertação. Pelos ensinamentos, pelos conselhos, pelo apoio e incentivo, por acreditar em mim e pelo entusiasmo.

Ao meu co-orientador, Dr. Cristiano Lacorte, por todo o acompanhamento e direcionamento, pelas discussões, pelas idéias, pelas conversas, pela amizade, pelo estímulo e por me ajudar com a dissertação lá do Laos, quando devia estar passeando.

Ao Dr. Francisco Aragão, por ter sido meu primeiro orientador e por ter me recebido no mundo da biologia molecular. Por participar da minha banca de qualificação e por todos os ensinamentos, conselhos sempre disponíveis, idéias e discussões sobre resultados.

Ao Dr. Julian Ma, do St. George's University of London, pela cooperação, por ter me recebido em seu laboratório e me ensinado técnicas valiosas para realização deste trabalho.

Ao Dr. Giovanni Vianna por toda a disponibilidade de ajuda com experimentos, pelas dicas, pelos planejamentos do projeto e pela amizade.

Ao Dr. Bergmann Morais Ribeiro, por participar da minha banca de qualificação e contribuir com comentários valiosos.

Aos técnicos de laboratório Luís, pelos experimentos de biobalística, Warley, pelo cuidado com as plantas, e Elsa, pela amizade e pela organização, que tornaram o laboratório um lugar melhor de se trabalhar.

A todos os amigos do Laboratório de Transferência de Genes, em especial a Paula, a Natália, o Nicolau e o Gustavo, pela amizade e pelos momentos de alegria no laboratório, pela ajuda com experimentos e pelas dicas. E também Emanuel, Sharon, Maria Laine, Kenny, Andréa, Bárbara, Aisy, Érica, Thaís, Sérgio, Fábio, Welcimar, Hugo, Angélica, Lívia, Daniela,

Gabriela, Aline, Nayche, Cristina, Renata, Raquel e André, por fazerem do laboratório um lugar tão agradável.

Às minhas amigas da Biologia, Larissa, Betúlia e Nadinni, por toda a amizade ao longo desses anos, pela força e estímulo nos momentos difíceis e pelas alegrias dos momentos de diversão.

Aos Drs. Marcelo de Macedo Brígido e Luciano Paulino da Silva e à Dra. Andrea Queiroz Maranhão por aceitarem o convite para participação na minha banca examinadora.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por prover o local e materiais para realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília pela oportunidade de fazer o mestrado.

Ao CNPq pela bolsa de estudos.

**Resumo**

O *Vírus da imunodeficiência humana* (HIV) é um vírus envelopado e as proteínas do seu envelope, em especial a gp120, controlam os eventos necessários para a sua entrada em células suscetíveis. A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é a manifestação clínica da infecção por HIV. Apesar dos esforços globais de combate à AIDS, o número de portadores de HIV no mundo continua crescendo. O contato heterossexual é a principal forma de transmissão e tem acarretado no aumento alarmante do número de mulheres infectadas. Os microbicidas são medicações antimicrobianas capazes de prevenir a transmissão do HIV quando aplicadas na vagina ou reto antes da relação sexual, e surgiram como uma ferramenta adicional de combate à AIDS direcionada às mulheres. Cyanovirin-N (CV-N) é uma proteína candidata à microbicida capaz de inativar várias linhagens do HIV se ligando irreversivelmente à gp120 viral. A produção de CV-N, assim como de qualquer microbicida, para ser economicamente viável e suprir a demanda mundial deve ser alcançada em níveis muito altos. Dessa forma, plantas geneticamente modificadas oferecem um sistema adequado para a produção de CV-N. Neste trabalho, plantas de soja transgênicas para a expressão de CV-N sob o controle do promotor da  $\beta$ -conglucina  $\alpha'$  foram produzidas e a análise das sementes  $R_1$  mostrou que CV-N está acumulando a 6% do total de proteínas solúveis da semente, um nível significativamente alto quando comparado a outros trabalhos semelhantes. Adicionalmente, foi testado o sistema de expressão transiente de CV-N e CV-N mutada (Asn30Gln/Pro51Gly) em folhas de *Nicotiana benthamiana*, com três diferentes tipos de endereçamento celular. Os resultados demonstraram que todas as construções produziram CV-N capaz de se ligar à gp120, com níveis de expressão de aproximadamente 0,1%, sendo assim bastante inferiores aos observados em soja. Este trabalho é um exemplo das vantagens de produção de proteínas recombinantes em sementes quando comparada a folhas.

**Abstract**

The *Human immunodeficiency virus* (HIV) is covered by an envelope from which proteins, specially the gp120, control its entering into susceptible cells. The HIV infection results in the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS), and in spite of the global efforts against its pandemic, the number of people with HIV increases every year. Heterosexual intercourse is currently the main way of transmission, which implicates on the growing number of infected women. Topical microbicides are products that can be applied to the vagina or rectum prior to intercourse to prevent the sexual transmission of HIV, and emerged as an additional tool directed for women to prevent AIDS. Cyanovirin-N (CV-N) is a microbicide candidate that can inactivate a wide range of HIV strains by binding irreversibly to gp120. Production of CV-N, or any microbicide, needs to be at extremely high levels to supply the demand, and genetically modified plants offer a suitable system. Transgenic soybean plants to express CV-N in seeds under the control of  $\beta$ -conglitinin  $\alpha$ ' promoter were produced. Analyses of R<sub>1</sub> seeds showed that CV-N is expressed at 6% of total soluble seed protein, which is considerable high when compared to other similar publications. Additionally, transient expression of CV-N and mutated CV-N (Asn30Gln/Pro51Gly) in *Nicotiana benthamiana* leaves was tested with three different sorting signals. All tested constructions produced CV-N capable of binding to gp120, although the expression levels were about 0,1%. This work illustrates the advantage of producing recombinant proteins in seeds rather than in leaves.

## Lista de Figuras

**Figura 1.** Representação esquemática do vírus HIV.

**Figura 2.** Ilustração esquemática dos passos para entrada do HIV na célula CD4<sup>+</sup>. A gp120 se liga primeiro ao CD4 e depois ao co-receptor quimiocina, o que permite então que a gp41 promova a fusão do envelope viral à membrana celular.

**Figura 3.** Processo de transformação de plantas por *Agrobacterium*. As proteínas de virulência VIR processam o T-DNA do plasmídeo Ti, produzindo uma fita-T. Após a ligação da bactéria à célula da planta, a fita-T e diversas proteínas VIR são transferidas para a planta através de um canal de transporte. Dentro da célula, as proteínas VIR se associam à fita-T formando o complexo-T, o qual vai para o núcleo e promove a integração do T-DNA ao genoma da planta.

**Figura 4.** Representação esquemática do cassete de expressão utilizado para transformação de soja.

**Figura 5.** Representação esquemática da seqüência sintetizada, CVNPSV.

**Figura 6.** Representação esquemática das clonagens realizadas na construção dos vetores para agroinfiltração. A seqüência CVNPSV foi clonada no vetor pCam35SNos digerido com as enzimas *NcoI* e *SacI*, resultando no vetor pCamCVNPSV (a), o qual foi então digerido com as enzimas *Sall* e *SacI* (b), para que as outras seqüências amplificadas por PCR pudessem ser clonadas para obtenção dos vetores finais (c). Para simplificação, as seqüências mutadas não estão representadas em c, mas também foram utilizadas.

**Figura 7.** Representação esquemática da recombinação utilizada para a construção do vetor para expressão em *E. coli*, pDESTCVNm.

**Figura 8. A.** Membrana revelada com NBT/BCIP do Western blot dos extratos protéicos de bactéria BL21 DE3 expressando CV-N e GFP. 1) marcador Kaleidoscope<sup>TM</sup> (Bio-Rad); 2,3,4 e 5) extratos protéicos após 0, 2, 3 e 4 horas, respectivamente, de indução com IPTG; 8) extrato protéico lisado após 2 horas de indução; 9) extrato protéico lisado após 4 horas de indução; 10) extrato protéico contendo GFP. **B.** Gel utilizado no Western blot após a transferência para a membrana de nitrocelulose, corado com Coomassie blue.

**Figura 9.** Resultado do PCR das plantas de soja bombardeadas. 1) marcador 1kb ladder; 2) branco; 3) controle negativo; 4) controle positivo; 5 a 20) amostras de folhas.

**Figura 10.** Resultado do PCR das sementes  $\beta$ CongICVN R<sub>1</sub>. a) Primeiro PCR realizado com 10 sementes de cada planta-mãe. b) Segundo PCR realizado em mais algumas sementes de 5 plantas-mãe. Cada planta-mãe está indicada por chaves e os números das sementes estão indicados nas figuras. B: amostra em branco; C+: controle positivo (resultado da amplificação do plasmídeo pET30bCVN).

**Figura 11.** Ligação dos extratos protéicos de sementes transgênicas à gp120 medida por ELISA. Como controle positivo foi utilizada CV-N recombinante purificada de *E. coli*, na concentração inicial de 125 ng/ml.

**Figura 12.** Ligação dos extratos protéicos de sementes da planta 10 à gp120 medida por ELISA (sobrenadante e pellet dos extratos protéicos).

**Figura 13.** Ligação dos extratos protéicos de sementes da planta 10 à gp120 medida por ELISA (sobrenadante e pellet dos extratos protéicos).

**Figura 14.** Ligação do extrato protéico da semente 10/17 à gp120 medida por ELISA. Os resultados estão representados em gráfico de dispersão (esquerda), e de colunas (direita).

**Figura 15.** Western blot dos extratos totais de sementes  $\beta$ CongICVN. 1) CV-N purificada produzida em *E. coli*; 2) Semente não transformada; 3) Semente 10/11; 4) Semente 10/13, 5) Semente 10/17, 6) Semente 10/22 e 7) Semente 10/25.

**Figura 16.** Ligação dos extratos de folhas de *N. benthamiana* agroinfiltradas à gp120 medida por ELISA.

**Figura 17.** Ligação dos extratos de folhas de *N. benthamiana* agroinfiltradas à gp120 medida por ELISA. A concentração inicial dos extratos é de 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , e do controle positivo, de 125 ng/ml.

**Figura 18.** Western blot dos extratos totais de folhas agroinfiltradas de *N. benthamiana*. 1) CV-N purificada produzida em *E. coli*.; 2) Extrato de folha não-infiltrada; 3) Extrato de folha infiltrada com a construção pCamCVN; 4) Extrato de folha infiltrada com a construção pCamCVNm; 5) Extrato de folha infiltrada com a construção pCamCVNKdel; 6) Extrato de folha infiltrada com a construção pCamCVNmKdel; 7) Extrato de folha infiltrada com a construção pCamCVNPSV; 8) Extrato de folha infiltrada com a construção pCamCVNmPSV.

**Lista de tabelas**

**Tabela 1.** Análise de segregação de 8 plantas transgênicas da geração R<sub>1</sub>.

**Tabela 2.** Percentagem de CV-N nos extratos de proteínas totais de folhas agroinfiltradas com *Agrobacterium* contendo as construções especificadas.

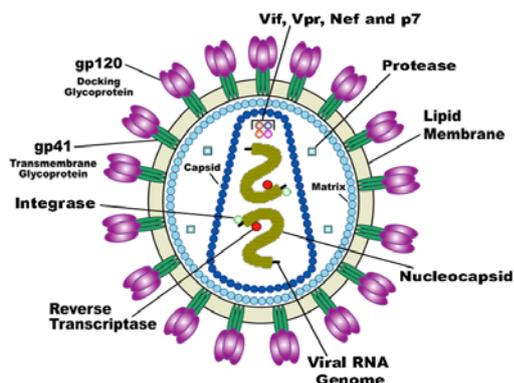
## Índice Geral

Agradecimentos .....	ii
Resumo .....	iv
Abstract .....	v
Lista de Figuras .....	vi
Lista de tabelas .....	viii
1. Introdução .....	1
1.1. O vírus HIV e a epidemia da AIDS .....	1
1.2. Cyanovirin-N como um microbicida .....	4
1.3. Plantas como biorreatores .....	8
1.3.1. Espécies de plantas utilizadas .....	8
1.3.2. Tipos de transformação .....	10
2. Justificativas .....	15
3. Objetivos .....	15
4. Materiais e Métodos .....	16
4.1. Construção dos vetores de expressão .....	16
4.1.1. Vetor para expressão em soja .....	16
4.1.2. Vetores para expressão em <i>N. benthamiana</i> .....	16
4.1.3. Vetor para expressão em <i>E. coli</i> .....	19
4.2. Expressão de CV-N em <i>E. coli</i> e Western blot .....	20
4.3. Transformação de soja .....	21
4.3.1. Bombardeamento dos explantes de soja .....	21
4.3.2. Análises por PCR das plantas regeneradas .....	22
4.3.3. Análise da progênie por PCR .....	23
4.3.4. Análise da progênie por Western Blot .....	23
4.3.5. Análise da ligação dos extratos de sementes à gp120 por <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> (ELISA) .....	24
4.4. Transformação transiente de folhas de <i>N. benthamiana</i> .....	24
4.4.1. Transformação de células de <i>A. tumefaciens</i> .....	24
4.4.2. Preparação da suspensão bacteriana e agroinfiltração .....	25
4.4.3. Detecção da expressão de GFP por microscopia de fluorescência .....	25
4.4.4. Análise da ligação à gp120 de CV-N produzido em <i>N. benthamiana</i> por ELISA .....	25
4.4.5. Análise da expressão de CV-N em <i>N. benthamiana</i> por Western blot .....	26
5. Resultados .....	27
5.1. Expressão de CV-N em <i>E. coli</i> .....	27
5.2. Expressão de CV-N em soja .....	28
5.2.1. PCR das plantas de soja transformadas .....	28
5.2.2. PCR das sementes $\beta$ CongICVN .....	28
5.2.3. ELISA gp120 das sementes $\beta$ CongICVN .....	30
5.2.4. Western blot das sementes $\beta$ CongICVN .....	32
5.3. Expressão transiente de CV-N em folhas de <i>N. benthamiana</i> .....	33
5.3.1. ELISA gp120 das folhas agroinfiltradas .....	33
5.3.2. Western blot das folhas agroinfiltradas .....	34
6. Discussão .....	36
7. Conclusões e Perspectivas .....	43
8. Referências Bibliográficas .....	44

## 1. Introdução

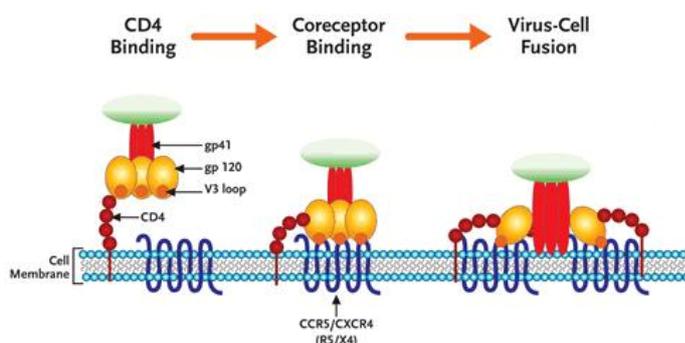
### 1.1. O vírus HIV e a epidemia da AIDS

O *Vírus da Imunodeficiência Humana* (HIV) é um vírus envelopado e as proteínas do seu envelope controlam os eventos necessários para a sua entrada em células suscetíveis, sendo assim responsáveis pelo tropismo viral. O complexo de proteínas do envelope do HIV é inicialmente produzido como o precursor gp160, o qual é extensivamente glicosilado e proteoliticamente clivado em duas subunidades por uma convertase celular (The gender and the development group, 2004; Chan e Kim, 1998). Da clivagem resultam uma subunidade de superfície (gp120) e uma subunidade transmembrânica (gp41) (Chan e Kim, 1998). Um trímero de gp120 então associa-se não-covalentemente a um trímero de gp41 na superfície do



**Figura 1.** Representação esquemática do vírus HIV. Fonte: [http://www.web-books.com/eLibrary/Medicine/Infectious/AID\\_S\\_HIV.htm](http://www.web-books.com/eLibrary/Medicine/Infectious/AID_S_HIV.htm)

vírião (figura 1), formando a estrutura responsável para sua entrada na célula hospedeira (Poignard et al., 2001). Para isso, a gp120 deve se ligar à proteína de superfície CD4 das células-T CD4<sup>+</sup> ou macrófagos ou à proteína DC-SIGN das células dendríticas (DCs) (Balzarini e Van Damme, 2007. A ligação da gp120 ao CD4 faz com que ela sofra alterações conformacionais que promovem sua ligação a receptores quimiocina específicos (CCR5 nos macrófagos, e CXCR4 nas células T) (Chan e Kim, 1998; Greene e Peterlin, 2002). Subseqüentemente, a gp41 altera-se conformacionalmente provocando a fusão do envelope viral à membrana celular, o que resulta na liberação do vírião no citoplasma (figura 2) (Chan e Kim, 1998).



**Figura 2.** Ilustração esquemática dos passos para entrada do HIV na célula CD4<sup>+</sup>. A gp120 se liga primeiro ao CD4 e depois ao co-receptor quimiocina, o que permite então que a gp41 promova a fusão do envelope viral à membrana celular. Fonte: [http://www.aidsreagent.org/program\\_info.cfm](http://www.aidsreagent.org/program_info.cfm).

A ligação da gp120 ao DC-SIGN é de alta afinidade, no entanto, não provoca as alterações conformacionais necessárias para a fusão do vírus com a célula dendrítica, mas faz com que as partículas virais ligadas sejam internalizadas para um compartimento ácido, e então apresentadas na superfície celular após a maturação e a migração das células dendríticas para os nódulos linfáticos, onde elas encontram as células T (Kwon et al., 2002). Dessa forma, as células dendríticas agem na dispersão da infecção viral das superfícies mucosas para os órgãos linfáticos (Greene e Peterlin, 2002).

As células de Langerhans (LCs) são um subtipo de células dendríticas, que não expressam DC-SIGN, mas Langerinas, às quais a gp120 do HIV também é capaz de se ligar (de Witte et al., 2007). Estas células estão presentes na epiderme e na maioria das mucosas epiteliais, como os tecidos ectocervicais, da vagina e do prepúcio, enquanto as células DC-SIGN<sup>+</sup> residem na camada subepitelial (de Witte et al., 2007). Dessa forma, as LCs são as primeiras células às quais o HIV se liga quando atinge a mucosa epitelial, e por algum tempo, assumiu-se que elas mediavam o espalhamento do HIV pelo corpo após a transmissão sexual, assim com as DCs, só que mais precocemente na infecção (Kawamura et al., 2005; Schwartz, 2007). No entanto, foi recentemente demonstrado que a captura do vírus pela Langerina promove sua internalização para os grânulos de Birbeck das LCs e subsequente degradação (de Witte et al., 2007). Os autores concluíram então que, ao invés de mediar a infecção do HIV, as LCs funcionam como uma barreira natural ao vírus.

As proteínas do envelope também podem promover a fusão de células infectadas com células vizinhas não-infectadas, um fenômeno denominado formação de sincício, o que pode ser observado em cultura de células (Chan e Kim, 1998) e é um dos primeiros sinais da infecção por HIV *in vitro*.

Possíveis fontes de infecção de HIV por contato sexual são partículas virais livres e células linfóides infectadas presentes no sêmen, nas secreções cervicovaginais, sangue ou outros fluidos resultantes de trauma físico ou infecções genitais (Stone, 2002). Após a exposição sexual ao HIV, o vírus pode entrar pelo epitélio estratificado vaginal ou pelas células da camada única do epitélio colunar cervical (Balzarini e Van Damme, 2007) atingindo a lâmina própria e estabelecendo a infecção.

Uma vez dentro da célula, o vírus dá início ao seu ciclo de replicação, podendo seguir dois caminhos diferentes: permanecer latente com o seu genoma integrado ao genoma do hospedeiro, ou prosseguir com a transcrição de seu genoma para a produção de novos vírions. A segunda opção resulta na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), pois destrói

grande parte das células linfóides do hospedeiro deixando-o imunologicamente suscetível a infecções oportunistas, que podem então levá-lo a morte.

Um esforço global tem sido aplicado para a diminuição da epidemia da AIDS, incluindo o aumento do acesso a tratamentos efetivos e programas de prevenção. No entanto, o número de portadores de HIV continua a crescer, assim como o número de óbitos em razão da AIDS. Em 2006, um total de 39,5 milhões de pessoas eram portadoras do vírus da AIDS, um número 2,6 milhões maior que em 2004 (UNAIDS/WHO, 2006). Já em 2007, foram registradas 33,2 milhões de pessoas infectadas pelo HIV, um número 16% menor que em 2006 (UNAIDS/WHO, 2007). Entretanto as diferenças entre as estimativas publicadas em 2006 e 2007 resultam muito mais dos refinamentos da metodologia aplicada para a estimativa, do que da diminuição da pandemia (UNAIDS/WHO, 2007). Todos os dias mais de 6800 pessoas são infectadas pelo HIV no mundo e mais de 5700 morrem de AIDS, principalmente devido ao acesso inadequado à prevenção da doença e aos tratamentos disponíveis (UNAIDS/WHO, 2007).

É na África Subsaariana que está o epicentro da pandemia, com a AIDS sendo a principal causa de morte. Mais de dois terços dos adultos (68%) e quase 90% das crianças infectados com HIV estão na África Subsaariana. O número estimado de mortes causadas pela AIDS no mundo em 2007 foi de 2,1 milhões, das quais 76% ocorreram nessa região (UNAIDS/WHO, 2007).

A relação heterossexual continua a ser o principal modo de transmissão do vírus, sendo responsável por 85% de todas as infecções por HIV no mundo (Simon et al., 2006). Esse tipo de transmissão é particularmente preocupante devido ao número crescente de mulheres com AIDS, o que tem implicações adicionais na transmissão mãe-filho, e conseqüentemente, no número de crianças infectadas (Quinn e Overbaugh, 2005).

Em 2007 foram estimadas 15,4 milhões de mulheres vivendo com HIV no mundo, 1,6 milhões a mais do que em 2001 (UNAIDS/WHO, 2006). Em 2006, 49% dos infectados eram mulheres, hoje são 50% (UNAIDS/WHO, 2006; UNAIDS/WHO, 2007). Esse fenômeno tem sido denominado “feminização da pandemia do HIV” e reflete a vulnerabilidade biológica e social da mulher ao vírus da AIDS (The gender and the development group, 2004). A vulnerabilidade biológica está relacionada a alterações hormonais que têm efeito no afinamento da mucosa vaginal devido ao estágio reprodutivo e/ou ao uso de contraceptivos hormonais (Quinn e Overbaugh, 2005). A vulnerabilidade social envolve a submissão sexual da mulher, o que ainda ocorre em várias regiões do mundo, principalmente na África

Subsaariana, onde 61% dos adultos vivendo com HIV são mulheres (UNAIDS/WHO, 2007). Nesta região, mulheres jovens na idade de 15 a 24 anos têm três vezes mais chances de contrair o vírus do que homens da mesma idade (Quinn e Overbaugh, 2005).

Mesmo que o uso apropriado de preservativos represente uma alta taxa de proteção (80-90%) contra a transmissão do HIV, muitas mulheres não estão em posição de persuadir seus parceiros a usá-los. Nesse contexto, o desenvolvimento de tecnologias que coloquem a prevenção da AIDS nas mãos das mulheres é crucial (Lancet Editorial, 2007).

## **1.2. Cyanovirin-N como um microbicida**

Medicações vaginais contendo o espermicida surfactante nonoxynol-9 têm sido usadas por mais de 50 anos para reduzir o risco de uma gravidez não-desejada (Stone, 2002). A demonstração de que o nonoxynol-9, além de destruir o esperma, podia também destruir o HIV, forneceu o estímulo inicial para a pesquisa dos microbicidas – medicações antimicrobianas capazes de prevenir a transmissão do HIV e de outras doenças sexualmente transmissíveis quando aplicadas na vagina ou reto antes da relação sexual (Stone, 2002). É importante ressaltar que a maioria dos agentes microbicidas mais promissores não são microbicidas no sentido literal, isto é, não matam microorganismos, mas bloqueiam a infecção.

O desenvolvimento de um microbicida efetivo contra o HIV é de especial interesse devido ao aspecto pandêmico da doença e a dificuldade de se desenvolver uma vacina efetiva contra o HIV, principalmente porque o vírus tem alta mutabilidade (Lancet Editorial, 2007). No momento não existem vacinas em vista que sejam capazes de induzir imunidade esterilizadora e de proteger contra a infecção (Lederman et al., 2006). Maiores expectativas se baseiam em vacinas capazes apenas de atenuar a replicação do vírus em pessoas “imunizadas” (Lederman et al., 2006). De acordo com Lederman e colegas (2006), um microbicida bem-sucedido diminuiria o aumento da epidemia, principalmente entre as mulheres, enquanto uma vacina efetiva não é encontrada. Diferentemente do preservativo sexual, os microbicidas não criarão uma barreira física ao contato íntimo, sendo mais aceitos por homens e mulheres. Além disso, as mulheres poderão aplicá-lo anteriormente à relação sexual, sem a necessidade do consentimento do parceiro.

Atualmente existem diversos candidatos a microbicidas que já foram testados ou em modelos de explantes cervicais ou em modelos de desafio vaginal contra SHIV em macacos,

ou já estão em fases de testes clínicos. Eles podem ser inespecíficos, moderadamente específicos e altamente específicos.

Entre os inespecíficos estão os detergentes, que destroem a membrana do vírus (Nonoxynol-9 - falhou nos testes clínicos; Savvy da Cellegy Pharmaceuticals, testes clínicos descontinuados na fase III em 2006) e os diminuidores de pH, uma vez que o vírus é inativado em pH menor que 4,5 (BufferGel, da ReProtect – fase III de testes clínicos) (Balzarini e Van Damme, 2007; Lederman et al., 2006).

Os moderadamente específicos englobam uma variedade de polímeros aniônicos, que se ligam ao envelope viral por meio das cargas negativas e bloqueiam a entrada do vírus nas células hospedeiras (Balzarini e Van Damme, 2007). Entre eles estão o Ushercell (sulfato de celulose), da CONRAD, que teve os testes de fase III descontinuados em 2007 após a verificação de que a sua utilização aumentou discretamente a susceptibilidade das mulheres ao HIV; o *carrageenan* (polissacarídeo ligado a galactose), utilizado na composição do gel Carraguard, do Population Council, que falhou nos testes clínicos no início de 2008; e o PRO-2000, polímero sintético de sulfonato de naftaleno, da Indevus Pharmaceuticals, que continua em fase III de testes clínicos (Balzarini e Van Damme, 2007; Klasse et al., 2008; Sanderson, 2008).

Os microbicidas altamente específicos podem ter como alvo qualquer um dos passos que leve a incorporação do genoma viral nas células hospedeiras como um DNA pró-viral (adsorção ou fusão, transcrição reversa e integração) (Balzarini e Van Damme, 2007). Entre os inibidores da transcrição reversa, o Tenofovir, da CONRAD, composto de um nucleosídeo terminador da transcrição reversa, encontra-se em fase II de testes clínicos (Klasse et al., 2008). Os inibidores de fusão ou entrada especificamente impedem o vírus de entrar nas células, eles são particularmente atrativos porque inibem a infecção no primeiro passo. Cada estágio do processo de fusão pode ser bloqueado por compostos específicos que se ligam às proteínas Env ou aos receptores celulares (Klasse et al., 2008). Os glicanos ricos em manose das proteínas do envelope do HIV são alvo de várias lectinas com atividade anti-HIV, assim como do anticorpo monoclonal humano 2G12, que neutraliza várias linhagens do vírus (Klasse et al., 2008).

A mais conhecida entre essas lectinas é Cyanovirin-N (CV-N), que foi descoberta e isolada a partir de um extrato da alga azul *Nostoc ellipsosporum* pertencente ao U.S. National Cancer Institute's Natural Products Repository, em um programa de prospecção de moléculas com atividade anti-HIV (Boyd et al., 1997; Lederman et al., 2006). CV-N é uma proteína de

11 kDa capaz de inativar irreversivelmente uma grande variedade de HIVs, além de prevenir a fusão e a transmissão do vírus entre células infectadas e não-infectadas (Boyd et al., 1997). Ela age se ligando com alta afinidade aos oligossacarídeos ricos em manose da glicoproteína de envelope gp120, interferindo nas interações essenciais para a fusão e entrada do vírus nas células suscetíveis (Shenoy et al., 2001).

Além de suas propriedades antivirais, CV-N apresenta alta estabilidade. Mesmo fora de solução de tamponação, a proteína é capaz de resistir a ciclos de congelamento e derretimento e a dissolução em solventes orgânicos, como CH<sub>3</sub>CN, MeOH e dimetil sulfóxido (Shenoy et al., 2001). Nem o tratamento de CV-N com alta concentração de sal (8M HCl guanidina), detergente (SDS 0,5%), solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5% ou alta temperatura (água fervente por 15 minutos) provoca perda significativa de sua atividade (Boyd et al., 1997). A baixa toxicidade da proteína também foi constatada por meio da incubação com células controle não-infectadas (Boyd et al., 1997).

As propriedades físicas e antivirais de CV-N revelam uma proteína com grande potencial para o desenvolvimento de um microbicida tópico para prevenir a transmissão do HIV. Tsai et al. (2004; 2003) demonstraram a eficácia *in vivo* de CV-N formulado como um gel e usado como um microbicida tópico vaginal ou retal, expondo macacas (*Macaca fascicularis*) tratadas com o microbicida ao vírus quimérico SHIV89.6P (*Simian immunodeficiency virus* com envelope de HIV). Adicionalmente, os mesmos autores mostraram que CV-N bloqueia a infecção de HIV-1<sub>Ba-L</sub> em explantes ectocervicais humanos.

A dificuldade de se produzir uma vacina contra o vírus da AIDS resulta da alta mutabilidade do mesmo, por ser um vírus de RNA. Dessa forma, a utilização de qualquer medicamento contra o HIV, incluindo os microbicidas, pode resultar no surgimento de variedades resistentes do vírus, e assim, na falha do medicamento.

Estudos da mutabilidade do vírus sob pressão seletiva de CV-N mostraram que o vírus eliminou oligossacarídeos N-ligados da gp120 por meio de mutações nos sítios de glicosilação, ficando assim resistentes a CV-N (Hu et al., 2007; Witvrouw et al., 2005). No entanto os oligossacarídeos presentes na gp120, que representam 50% do total de sua massa, têm sido vistos como barreiras que escondem os epítomos altamente imunogênicos da gp120, e dessa forma são utilizados como estratégia de evasão do sistema imune do hospedeiro, uma vez que os oligossacarídeos são pouco imunogênicos (Karlsson Hedestam et al., 2008; Kwong et al., 2002; Kwong et al., 1998; Wyatt et al., 1998; Wyatt e Sodroski, 1998). Portanto é de se esperar que a perda dos oligossacarídeos da gp120 resulte em uma maior

vulnerabilidade do vírus à neutralização mediada por anticorpos do hospedeiro. E foi exatamente isso que Hu e colaboradores (2007) observaram após a geração de linhagens de HIV-1 resistentes a CV-N. Os autores demonstraram que o HIV mutante resistente a CV-N ficou mais suscetível a imunoglobulinas e ao soro de pacientes de HIV. Esse fato soma mais uma vantagem para a utilização de microbicidas que têm como alvo as glicoproteínas do envelope viral.

A possibilidade de produção de CV-N recombinante com atividade biológica foi inicialmente demonstrada por Boyd et al. (1997), com a expressão em *Escherichia coli*. Mais tarde, vários sistemas de expressão em procariotos foram testados, incluindo a expressão em *E. coli* (Colleluori et al., 2005; Mori et al., 2002; Mori et al., 1998), na superfície da bactéria comensal *Streptococcus gordonii* (Giomarelli et al., 2002), assim como nas linhagens de *Lactobacillus* colonizadoras da mucosa vaginal (Liu et al., 2006; Pusch et al., 2005). O primeiro sistema eucariótico usado para a expressão de CV-N foi *Pichia pastoris* (Mori et al., 2002). Por meio deste sistema de expressão, os autores verificaram que CV-N foi glicosilada na posição Asn30, perdendo assim a capacidade de se ligar à gp120. Por esse motivo, foram produzidos mutantes nos quais foram substituídas a Asn30 para remover o sítio de N-glicosilação, assim como a Prolina na posição 51 para impedir a dimerização por mal-dobramento mediado por prolina (Mori et al., 2002). Segundo Barrientos et al. (2004), a substituição da Prolina51 estabiliza CV-N em sua forma monomérica, mas a dimerização não compromete a atividade antiviral da proteína.

De acordo com Shattock e Moore (2003), a quantidade de proteína necessária para a produção de um gel microbicida em quantidades suficientes para suprir a demanda mundial é muito além da capacidade de qualquer sistema de cultura celular atualmente disponível. Apenas plantas geneticamente modificadas, cultivadas em uma área de no mínimo 5000 acres, poderiam suprir tais necessidades (Shattock e Moore, 2003). Nesse contexto, Sexton et al. (2006), num trabalho pioneiro, produziram plantas transgênicas de fumo expressando o mutante Asn30Gln/Pro51Gly de CV-N na concentração de 0,85% de proteína solúvel total. Este é o único estudo da expressão de CV-N em plantas disponível na literatura.

### 1.3. Plantas como biorreatores

As plantas sempre foram uma importante fonte de várias moléculas com propriedades medicinais e nutritivas para o homem, mas apenas nas duas últimas décadas se tornou possível a sua utilização para a produção de proteínas recombinantes.

Tradicionalmente, a produção de proteínas recombinantes se baseia na utilização de fermentadores microbianos ou de linhagens de células de mamíferos, mas esses sistemas apresentam grandes desvantagens, como elevados custos, capacidade limitada e perigo de contaminação por patógenos (Fischer et al., 2004). Por outro lado, as plantas apresentam pequeno perigo de contaminação, custos reduzidos e grande capacidade de produção, mesmo quando há a necessidade de confinamento em casas de vegetação (Ma et al., 2005). Estima-se que proteínas recombinantes podem ser produzidas em plantas por 2 a 10% do custo da fermentação microbiana e 0,1% do custo da cultura de células de mamíferos (Giddings et al., 2000).

A primeira proteína recombinante de interesse farmacêutico a ser produzida em planta transgênica, foi o hormônio do crescimento humano em tabaco, em 1986 (Barta et al., 1986). Hoje, diversas proteínas produzidas em plantas já estão sendo comercializadas, como anticorpos, fatores sangüíneos, citocinas, fatores de crescimento, hormônios, enzimas e vacinas, o que demonstra a viabilidade desse sistema de expressão e a capacidade de produzir moléculas heterólogas corretamente montadas (Twyman et al., 2005).

Um dos principais determinantes da viabilidade comercial de uma molécula produzida em plantas é o alcance de adequadas taxas de produção, o que depende da espécie da planta, da construção do cassete de expressão e do tipo de transformação aplicado (Twyman et al., 2003).

#### 1.3.1. Espécies de plantas utilizadas

O fumo (*Nicotiana tabacum*) tem uma longa história como sistema bem-sucedido de expressão de moléculas recombinantes, e, por esse motivo, sempre foi um forte candidato quando o objetivo é produção comercial (Fischer et al., 2004; Twyman et al., 2003). Esse fato se deve à tecnologia bem estabelecida de transferência e expressão de genes, alta produção de biomassa, potencial de aumento da massa devido à produção de sementes férteis e

disponibilidade de infra-estrutura de processamento em larga escala (Ma et al., 2003; Twyman et al., 2003).

Algumas desvantagens estão relacionadas com a alta concentração de alcalóides; no entanto, existem cultivares com baixa produção de alcalóides que podem ser utilizadas para a produção de proteínas de interesse farmacêutico (Twyman et al., 2003). Outra desvantagem é a instabilidade do produto recombinante produzido em folhas, que apresenta um ambiente celular com alta concentração de água. Isso significa que o tecido deve ser congelado ou liofilizado para o transporte (Fischer et al., 2004; Ma et al., 2003; Twyman et al., 2003). Em contraste, a expressão de proteínas recombinantes em sementes como a soja (*Glycine max*), feijão (*Phaseolus vulgaris*) e milho (*Zea mays*), permite o armazenamento a longo prazo, pois apresentam o ambiente bioquímico apropriado para o acúmulo estável de proteínas (Ma et al., 2003). Tem sido demonstrado que anticorpos produzidos em sementes permanecem estáveis por pelo menos três anos à temperatura ambiente sem perda de atividade detectável (Stoger et al., 2000).

Diferentes tipos de culturas têm sido investigados para a produção de proteínas em sementes, como cereais (arroz, trigo e milho) e legumes (ervilha e soja) (Hood et al., 2002; Ma et al., 2003; Stoger et al., 2002). Sementes de arroz (*Oryza sativa*) já foram demonstradas como o melhor sistema de expressão para um anticorpo de cadeia única quando comparados com fumo, trigo (*Triticum aestivum*) e ervilha (*Pisum sativum*), apresentando as maiores concentrações do recombinante por unidade de biomassa, muito embora o fumo tenha apresentado a maior produção final devido ao acúmulo superior de biomassa por hectare (Stoger et al., 2002).

O milho é atualmente a principal cultura utilizada para a produção comercial de proteínas recombinantes (Ma et al., 2003). Diversas proteínas comercialmente importantes, como  $\beta$ -glucuronidase, avidina, lacase, tripsina e peroxidase de manganês estão sendo produzidas por meio desse sistema (Clough et al., 2006; Hood et al., 1999; Hood et al., 2002; Kusnadi et al., 1998). A produção de anticorpos, como a imunoglobulina A, e de vacinas, como contra *Escherichia coli* enterotoxigênica, também tem sido bem sucedida em milho (Hood et al., 2002; Streatfield, 2006). Recentemente, o anticorpo monoclonal anti-HIV, 2G12, foi expresso em sementes de milho (Rademacher et al., 2008).

A semente de soja é particularmente rica em proteínas, ela contém de 35 a 40% do total de massa em proteínas, dos quais 70% são conglicininas e  $\beta$ -conglicininas (Krishnan, 2000). Em contraste, o milho apresenta de 8 a 10% de massa em proteínas e a folha de fumo,

de 1 a 2% (Moravec et al., 2007). Apesar disso e do domínio das técnicas de transformação de soja, demonstrado pela produção de diversas linhagens transgênicas resistentes a herbicidas e pragas, essa cultura quase não tem sido explorada para a produção de biofarmacêuticos. No entanto, em duas recentes publicações, a semente de soja foi utilizada como um eficiente sistema de expressão para a produção destas moléculas. No primeiro, o fator de crescimento do fibroblasto (bFGF), acumulou em 2,3% do total de proteína da semente, utilizando-se o promotor e o peptídeo-sinal da glicinina (Ding et al., 2006). E, mais recentemente, a semente de soja foi utilizada para a produção da toxina termo-lábil de *Escherichia coli* enterotoxigênica (LTB), acumulando em 2,4% do total de proteínas da semente (Moravec et al., 2007). Para isso, também foi utilizado o promotor da glicinina, com o peptídeo sinal da quitinase e a seqüência de retenção no retículo endoplasmático C-terminal, KDEL. Outros trabalhos também demonstram a viabilidade da soja para a produção de proteínas recombinantes, como o anticorpo monoclonal contra a herpes genital (Zeitlin et al., 1998) e a fitase de *Aspergillus* (Denbow et al., 1998).

A planta de soja apresenta diversas vantagens para a produção de moléculas de interesse farmacêutico quando comparada a outras culturas, como a de milho. Primeiramente, ela é uma planta autógama, e a frequência de polinização cruzada não ultrapassa 1%, uma vez que o seu grão de pólen alcança a distância de apenas 6,5 metros (Abud et al., 2003; Abud et al., 2007). Isso implica no baixo risco de contaminação de culturas não-transgênicas por pólen de culturas transgênicas. O milho, por sua vez, é uma planta alógama e como sua polinização é feita pelo vento, o pólen atinge distâncias superiores a 500 metros (Iowa State University, 1993). Outra vantagem da soja é a sua capacidade de simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, como *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, por meio de seu sistema radicular (de Castro et al., 1993). Essa característica diminui os custos da cultura de soja uma vez que quase não há necessidade de utilização de fertilizantes nitrogenados. Além disso, por ser extremamente sensível ao fotoperíodo, o número de ramos e folhas, e, conseqüentemente, o de vagens, pode ser bastante aumentado em casa de vegetação em condições de fotoperíodo prolongado (Kantolic e Slafer, 2007).

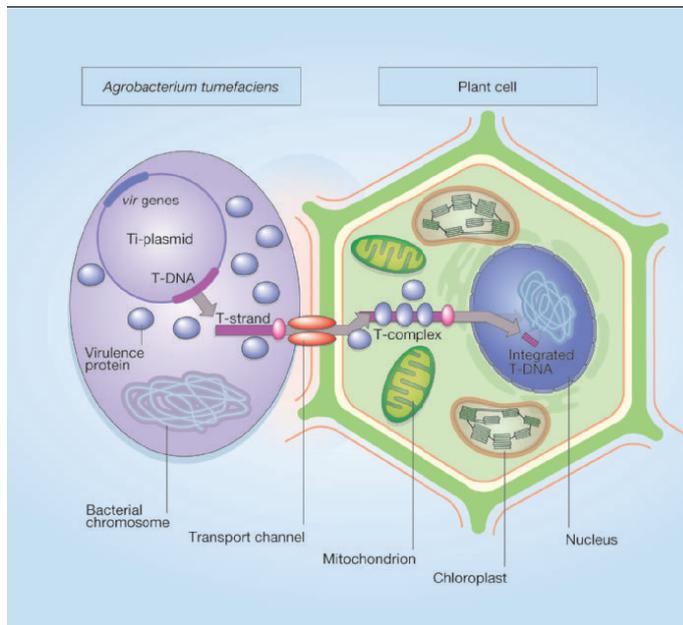
### 1.3.2. Tipos de transformação

A maioria dos biofarmacêuticos recombinantes derivados de plantas foram produzidos por transformação nuclear e regeneração das linhagens transgênicas, seguidas de

extração e purificação da proteína recombinante (Fischer et al., 2004). A transformação nuclear acarreta na integração do gene heterólogo no genoma da planta e na transmissão do mesmo para a progênie, o que caracteriza uma expressão estável (Lacorte, 2006; Sharma et al., 2005). Esse tipo de expressão também pode ser alcançado por meio da transformação de cloroplastos, que apresenta algumas vantagens quando comparada à transformação nuclear, e tem demonstrado marcantes níveis de expressão em trabalhos recentes (Fernandez-San Millan et al., 2003; Molina et al., 2004; Staub et al., 2000; Tregoning et al., 2003).

Os principais métodos utilizados para a transformação estável de plantas são a transformação mediada por *Agrobacterium*, a qual utiliza o mecanismo natural de transferência de genes para plantas de *Agrobacterium tumefaciens*, e o bombardeamento de partículas, no qual microprojéteis cobertos de DNA são acelerados sobre o tecido vegetal (Brasileiro e Carneiro, 1998; Rech et al., 2008).

A base molecular da transformação genética de plantas por *Agrobacterium* reside na transferência para a planta de uma região de um plasmídeo indutor de tumor (Ti) (Gelvin, 2003). Essa região é denominada T-DNA e é definida por seqüências de borda, de 25 pb, onde atuam endonucleases produzidas pela região *vir* do plasmídeo Ti (Gelvin, 2003; Yadav et al., 1982). O processamento do T-DNA e a sua transferência da bactéria para o genoma da célula da planta hospedeira resultam em grande parte da atividade dos produtos dos genes de virulência (*vir*) contidos no plasmídeo Ti (Gelvin, 2003; Gelvin, 2005), os quais têm expressão ótima sob pH ácido e na presença de indutores fenólicos, como acetoseringona, que são liberados por fermentos do tecido vegetal (Hansen e Wright, 1999). O T-DNA é manipulado para conter os genes de seleção e os genes de interesse, e então o plasmídeo Ti é inserido em *A. tumefaciens* e utilizado para transformação de plantas (Hansen e Wright, 1999). A figura 3 ilustra o processo de transferência do T-DNA da bactéria para o genoma da célula vegetal.



**Figura 3.** Processo de transformação de plantas por *Agrobacterium*. As proteínas de virulência VIR processam o T-DNA do plasmídeo Ti, produzindo uma fita-T. Após a ligação da bactéria à célula da planta, a fita-T e diversas proteínas VIR são transferidas para a planta através de um canal de transporte. Dentro da célula, as proteínas VIR se associam à fita-T formando o complexo-T, o qual vai para o núcleo e promove a integração do T-DNA ao genoma da planta. Fonte: Gelvin, 2005.

Os protocolos de transformação estável de plantas por *Agrobacterium* geralmente envolvem a co-cultura da bactéria contendo o plasmídeo Ti recombinante com pedaços do tecido vegetal *in vitro* (e.g. pedaços de folha estéreis, cotilédones, segmentos do caule, culturas de suspensão de células e sementes germinando), e posterior regeneração do tecido em meio de seleção (Hansen e Wright, 1999). A transformação por esse método depende da integração do T-DNA ao genoma das células vegetais. As células transformadas são selecionadas e se multiplicam, podendo se diferenciar e dar origem à planta transgênica. Na maioria das células infectadas, as cópias de T-DNA não são integradas e permanecem no núcleo por um curto período de tempo antes de serem degradadas pela maquinaria de defesa do hospedeiro, podendo ser transcritas, o que leva à expressão transiente dos genes do T-DNA (Kapila et al., 1997).

Baseado nesse fenômeno, foi desenvolvido um sistema de transformação transiente denominado “*Agrobacterium tumefaciens* transient assay” (ATTA), no qual uma suspensão de *Agrobacterium* contendo um vetor é infiltrada em folhas intactas de uma planta por meio de uma seringa ou vácuo. Toda a parte aérea da planta pode ser infiltrada e o tecido pode ser coletado para análise após 3-6 dias (Lacorte, 2006). Por meio desse método, um grande número de células é transformado podendo expressar o gene de interesse, o que o faz viável para a produção de proteínas recombinantes em pequena ou média escala. Além disso, devido à vantagem de ser extremamente rápido comparado à produção de plantas transgênicas, esse sistema é geralmente utilizado para a verificação da funcionalidade de cassetes de expressão assim como para a validação funcional de proteínas recombinantes (Fischer et al., 2004;

Lacorte, 2006). No entanto, o alto nível de expressão é alcançado apenas por um curto período de tempo.

Em 2001 foi sugerido que o silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) poderia ser um dos fatores responsáveis pela queda de expressão dos transgenes (Johansen e Carrington, 2001), e mais tarde, o PTGS foi confirmado como o principal responsável pela limitação da eficiência de ATTA (Voinnet et al., 2003). Em plantas, esse mecanismo opera como um sistema imune adaptativo contra vírus (Ratcliff et al., 1999; Voinnet, 2001); e como estratégia de contra-ataque, os vírus evoluíram para suprimir vários passos desse mecanismo (Kasschau e Carrington, 1998; Voinnet, 2001; Voinnet, 2005; Voinnet et al., 1999).

Por meio da co-expressão de proteínas recombinantes com proteínas virais com potencial atividade de supressão de silenciamento, Voinnet e colaboradores (2003) observaram que a proteína p19 do *Tomato bushy stunt virus* foi o mais efetivo, aumentando os níveis de expressão em mais de 50 vezes, seguido do HcPro, do *Potato virus Y*. Assim, a utilização dessas proteínas representa uma importante ferramenta para o aumento da eficiência do ATTA.

Outra tecnologia emergente de expressão transiente se baseia na utilização de vírus de plantas como vetores de transformação (Fischer et al., 2004). Esse mecanismo é bastante semelhante ao ATTA, com a diferença de que uma suspensão de *Agrobacterium* carregando T-DNAs que codificam replicons virais contendo o gene heterólogo é usada para a infiltração das folhas. A bactéria assume as funções da infecção primária das células vegetais e fornece as condições para que o replicon viral seja traduzido para a geração de partículas virais, que podem então se mover célula a célula espalhando-se sistemicamente, amplificando os níveis de expressão da proteína de interesse (Gleba et al., 2005). Segundo Gleba e colaboradores (2005), esse sistema pode ser utilizado para a produção de proteínas recombinantes em escala industrial se for utilizado um aparato de infiltração a vácuo de alta eficiência que possa ser aplicado em plantas inteiras.

O método de transformação mediada por *Agrobacterium* é utilizado mais comumente para espécies dicotiledôneas, como tabaco, alfafa, ervilha, tomate e batata, embora possa também ser utilizado para espécies monocotiledôneas para as quais a tecnologia foi otimizada (Ma et al., 2003; Sharma et al., 2005). A transformação por bombardeamento de partículas é menos dependente do genótipo, e, portanto, é o método mais comum para a transformação de cereais como arroz, trigo e milho, bem como soja e outras leguminosas (Aragão et al., 2000; Rech et al., 2008). Este é também o método utilizado para a transformação de plastídeos, uma

vez que o T-DNA de *Agrobacterium* é direcionado exclusivamente ao núcleo, sendo assim inadequado para a transferência de genes para o genoma do cloroplasto (Gelvin, 2003).

O processo de biobalística é baseado na aceleração de microprojéteis, de 0,2 a 4 micrômetros de diâmetro, recobertos por seqüências específicas de DNA, a uma velocidade final de 1500 km/h, promovida por gás hélio sob alta pressão, sobre os explantes ou células em suspensão. Os microprojéteis ultrapassam a parede e a membrana celulares e penetram na célula de maneira não-letal. Então se dissociam do DNA pela ação citosólica e são integrados ao genoma vegetal por recombinação homóloga (Sanford et al., 1987). Assim, a transformação genética da planta bombardeada ocorre em dois estágios: transferência do DNA para dentro da célula e sua integração ao genoma. A integração é muito menos eficiente do que a transferência do DNA, e conseqüentemente, apenas algumas células que recebem o DNA são efetivamente transformadas (Altpeter et al., 2005). Dessa forma é necessária a utilização de um gene de seleção para que apenas as células transformadas se regenerem em uma nova planta.

No protocolo de transformação de soja descrito por Rech e colaboradores (2008), o bombardeamento das micropartículas é direcionado para o meristema apical exposto de eixos embrionários de sementes. Utiliza-se como gene de seleção o *ahas*, isolado de *Arabidopsis thaliana*, o qual codifica para uma forma mutada da enzima ácido-aceto-hidróxi sintase, que é essencial para os primeiros passos da síntese dos aminoácidos isoleucina, leucina e valina (Sathasivan et al., 1991). Essa enzima, em sua forma nativa, é inibida pela ação do herbicida Imazapyr<sup>®</sup>, levando o tecido vegetal à morte. Mas a enzima codificada pelo gene *ahas* é tolerante a esta ação, o que faz com que as células transformadas permaneçam ilesas.

Neste trabalho foram aplicadas tanto a técnica de biobalística para a transformação estável de soja, como a ATTA para transformação transiente de folhas de *Nicotiana benthamiana*.

## 2. Justificativas

Os índices crescentes da epidemia da AIDS, principalmente entre mulheres, ocasionados em sua maioria pelo contato heterossexual, exigem que medidas urgentes sejam tomadas para a prevenção da infecção por HIV. Os microbicidas representam uma ferramenta adicional no combate a AIDS, com a vantagem de poderem ser utilizados pelas mulheres como preventivos. No entanto, a demanda mundial por um creme microbicida exige um volume de produção e custeio que somente podem ser alcançados com a utilização de um sistema baseado na expressão heteróloga em plantas.

CV-N é uma proteína que tem se mostrado efetiva como um microbicida e sua expressão em plantas é possível, como já foi demonstrado. Porém, espera-se alcançar maiores taxas de expressão do que foi alcançado até o momento, para que sua produção seja capaz de suprir a demanda a custos reduzidos.

Esse trabalho constitui parte de um acordo entre a Embrapa, a BioSyn e o NIH, US, para a produção de microbicidas em plantas.

## 3. Objetivos

O objetivo deste trabalho é expressar a proteína CV-N recombinante em plantas por meio de dois diferentes sistemas:

### 1. *Produção de CV-N em sementes de soja (Glycine max) transgênicas*

Pretende-se expressar CV-N em sementes de soja, por meio da utilização do promotor semente-específico do gene da  $\beta$ -conglucina, subunidade  $\alpha$  e do peptídeo sinal da subunidade  $\beta$ , o qual direciona para os corpos protéicos.

### 2. *Expressão transiente de CV-N em folhas de Nicotiana benthamiana*

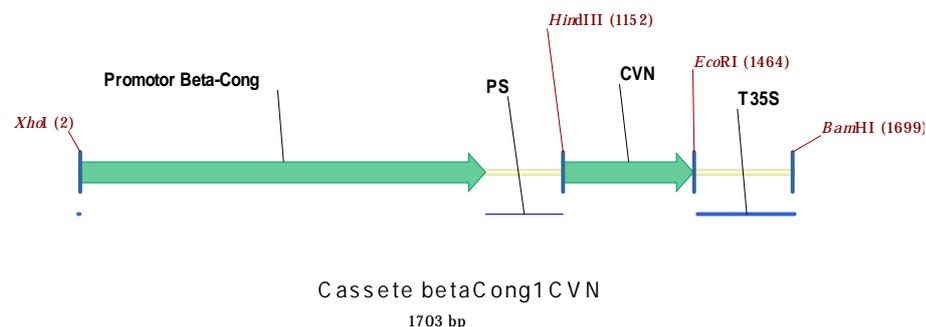
Pretende-se avaliar a expressão de CV-N mutante (Asn30Gln/Pro51Gly) e nativa sob o controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (35S CaMV) em construções que direcionam para diferentes compartimentos sub-celulares (i.e. citoplasma, retículo endoplasmático, vacúolo e apoplasto) através de ATTA, utilizando-se vetores binários e vetores virais baseados no *Potato virus X* (PVX).

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Construção dos vetores de expressão

#### 4.1.1. Vetor para expressão em soja

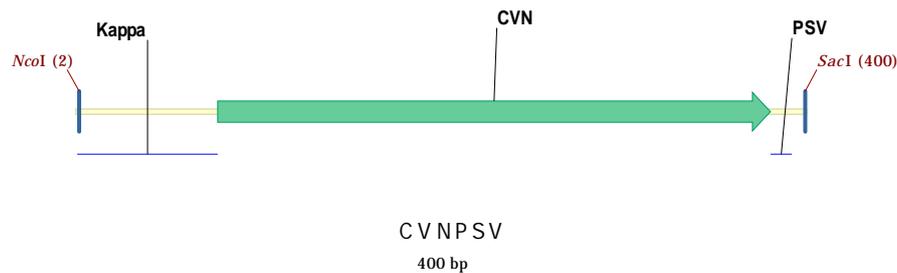
O fragmento de 306 pb referente à região codificante de CV-N foi amplificado pela Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) a partir dos primers SoyCVNHind (5'AAAGCTTCTTGGTAAATTCTCCC3'), o qual adicionou um sítio de restrição *Hind*III à extremidade 5' da fragmento, e SoyCVNEco (5'AGAATTCTTATTCGTATTTTCAGG3'), o qual adicionou um sítio de *Eco*RI à extremidade 3' da fragmento. Foi usado como molde o vetor pET30b-CVN (BioSyn). A seqüência resultante foi subseqüentemente clonada nos sítios *Eco*RI e *Hind*III do vetor p $\beta$ CongI, o qual é resultado da clonagem do promotor da subunidade  $\alpha$  da  $\beta$ -conglícinina de soja seguido do peptídeo sinal completo da subunidade  $\beta$  da  $\beta$ -conglícinina de soja e do terminador 35S de CaMV nos sítios de restrição *Xho*I e *Bam*HI do vetor pUC 19. O vetor resultante foi denominado p $\beta$ CongICVN (figura 4).



**Figura 4.** Representação esquemática do cassete de expressão utilizado para transformação de soja.

#### 4.1.2. Vetores para expressão em *N. benthamiana*

A seqüência referente ao peptídeo sinal da cadeia leve Kappa do anticorpo de camundongo CEA66-E3, seguida da seqüência codificante de CV-N e da seqüência PSV [sinal C-terminal da faseolina de *Phaseolus vulgaris* capaz de direcionar proteínas para o vacúolo de folhas sementes, em conjunto com um peptídeo sinal N-terminal (Frigerio et al., 2001)] foram sintetizadas pela companhia DNA 2.0 (Califórnia, EUA) (figura 5).



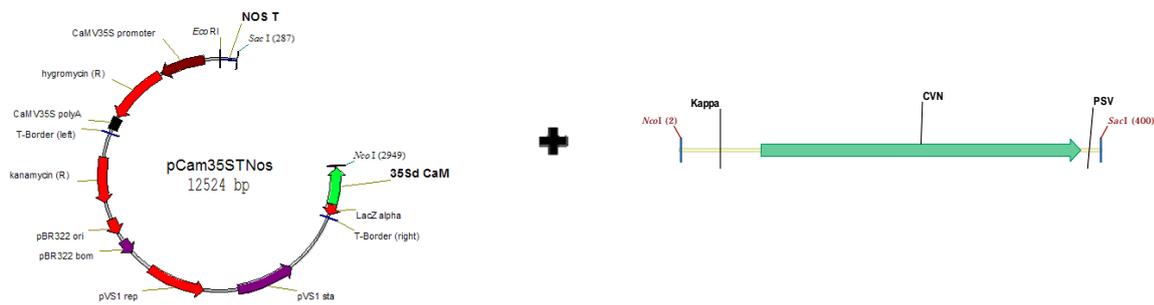
**Figura 5.** Representação esquemática da sequência sintetizada, CVNPSV.

O primer Sal-CVN-5' (5'ggTGTCGACTCCCAGCTTGGTAAATTCT 3') em conjunto com os primers CVN-SacI-3' (5'ggGAGCTCTATTCGTATTCAGGGTACC3'), CVN-KDEL-SacI-3' (5'ggGAGCTCTAGAGTTCATCCTTTTCGTATTCAGGGTACC3') e CVN-PSV-SacI-3' (5'ggGAGCTCTAATAAACA AAAAGCTTCGTATTCAGGGTACC 3') foram utilizados para a amplificação das seqüências de CV-N e CV-N mutada (CV-Nm) seguidas, respectivamente, de um sítio de *SacI*, de uma seqüência de retenção no retículo endoplasmático KDEL e um sítio de *SacI*, e de uma seqüência PSV e um sítio de *SacI*. Foram usados como molde para o PCR, o vetor pET30b-CVN e o vetor pUCCVNm (sintetizado pela Epoch Biolabs, Sugar Land, EUA), para CV-N e CV-Nm, respectivamente. Posteriormente, os fragmentos obtidos foram clonados no vetor pGEM T-Easy® (Invitrogen) e digeridos com *Sall* e *SacI*.

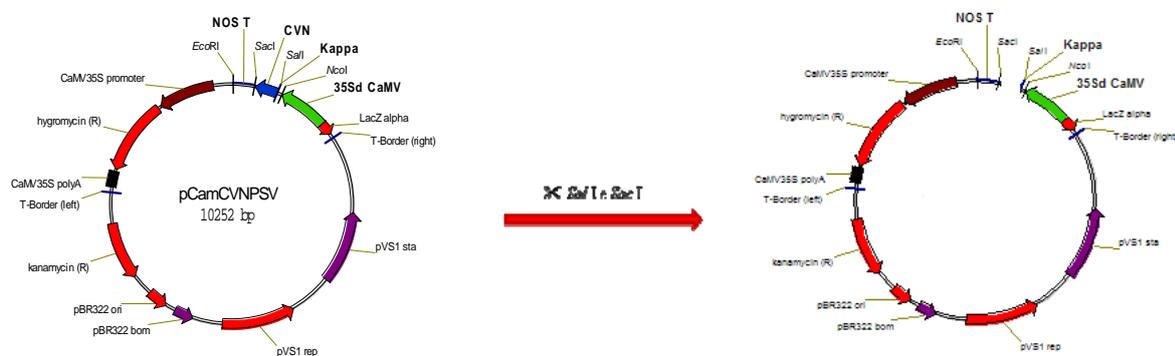
O cassete de expressão do vetor pBI426 (Datla et al., 1991) foi clonado nos sítios de *HindIII* e *EcoRI* do vetor pCambia™1300, resultando no vetor pCam35STNos. Esse vetor foi digerido com as enzimas de restrição *NcoI* e *SacI*, liberando as seqüências *gus* e *nptII* (figura 3). Então, a seqüência CVNPSV foi clonada nos sítios de *NcoI* e *SacI* do vetor pCam35STNos digerido, gerando o vetor pCamCVNPSV. Esse vetor foi digerido com as enzimas *Sall* e *SacI*, onde então foram clonadas todas as seqüências amplificadas conforme descrito anteriormente, gerando assim os vetores finais pCamCVN e pCamCVNm (para direcionar para o apoplasto), pCamCVNKdel e pCamCVNmKdel (para direcionamento para o RE) e pCamCVNPSV e pCamCVNmPSV (para direcionamento para o vacúolo) (figura 6).

Para controle positivo da agroinfiltração foi utilizado o vetor pCambiaSGFP, o qual é resultado da clonagem de um cassete de expressão de sGFP (Chiu et al., 1996) (promotor 35S CaMV – seqüência codificante para GFP – tNOS) no pCambia™2300. Além disso, foi utilizado o vetor pBINp19, o qual contém um cassete de expressão com o inibidor de silenciamento p19 (Voinnet et al., 2003), para co-infiltração com os outros vetores, de forma a evitar a inibição da expressão induzida por silenciamento gênico.

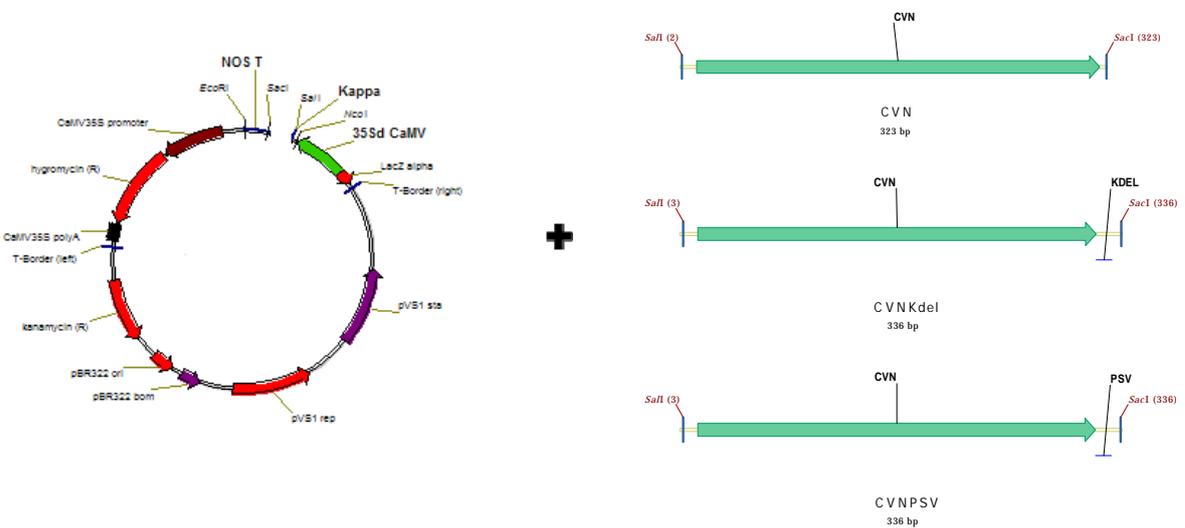
a.



b.



c.



**Figura 6.** Representação esquemática das clonagens realizadas na construção dos vetores para agroinfiltração. A seqüência CVNPSV foi clonada no vetor pCam35SNos digerido com as enzimas *NcoI* e *SacI*, resultando no vetor pCamCVNPSV (a), o qual foi então digerido com as enzimas *SalI* e *SacI* (b), para que as outras seqüências amplificadas por PCR pudessem ser clonadas para obtenção dos vetores finais (c). Para simplificação, as seqüências mutadas não estão representadas em c, mas também foram utilizadas.

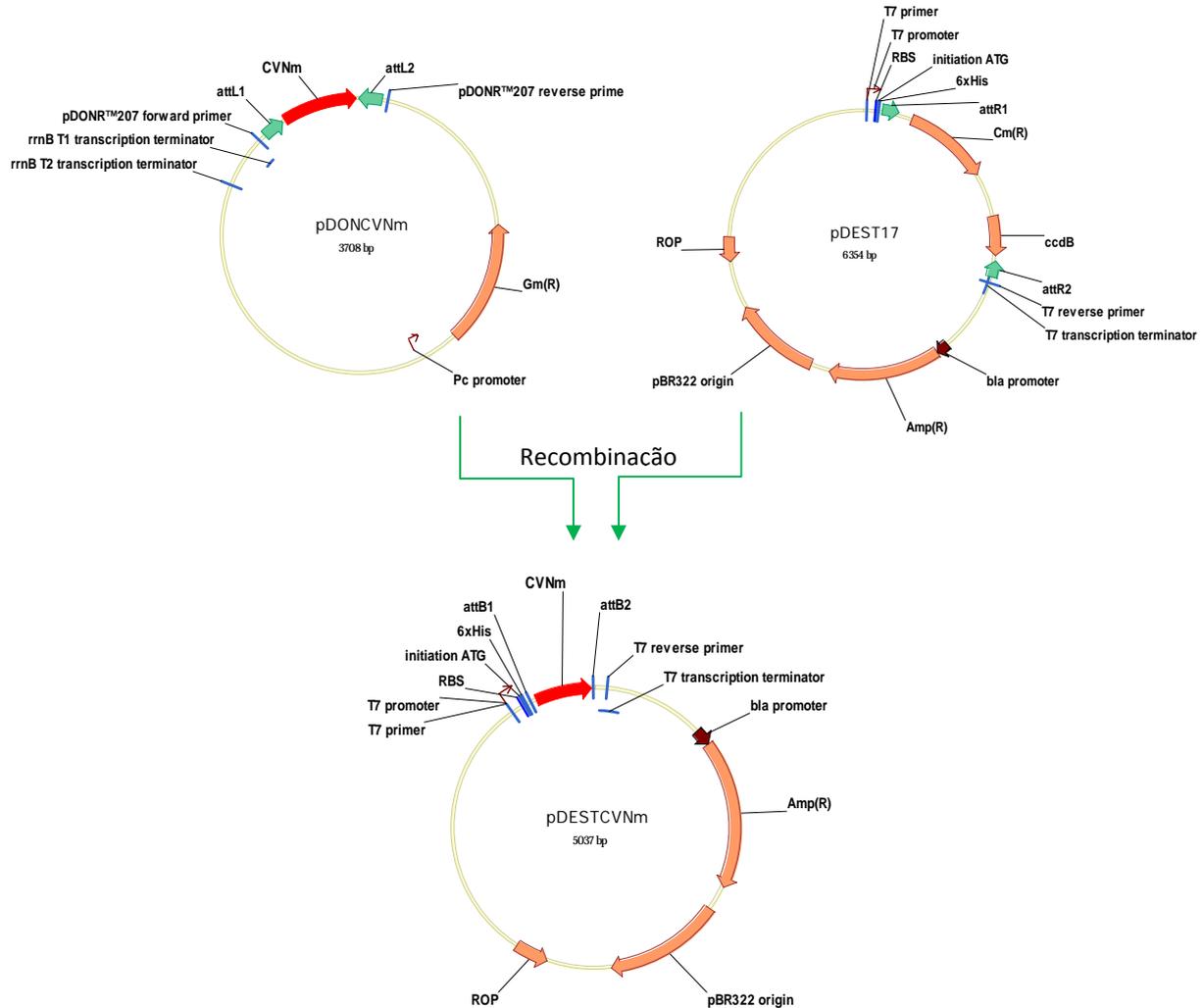
Foram construídos ainda vetores virais baseados no PVX (Lacorte, 2006), de forma a obter maiores níveis de expressão transiente em folhas de *N. benthamiana*. Para isso, os vetores pCamCVNm, pCamCVNmKdel e pCamCVNmPSV foram digeridos com *NcoI* e *SacI*, e os fragmentos resultantes (Kappa-CVNm; Kappa-CVNm-Kdel; Kappa-CVNm-PSV) foram clonados no vetor pDONCVNm digerido com *NcoI* e *SacI*. Os três vetores resultantes foram então recombinados com o vetor PVX-GW [vetor PVX com sistema de recombinação Gateway<sup>TM</sup> (Lacorte, 2006)], para obtenção dos vetores finais PVXCVNm, PVXCVNmKdel e PVXCVNmPSV.

O sistema Gateway®, da Invitrogen, se baseia nas propriedades de recombinação sítio-específica do bacteriófago lambda, que leva à integração de seu DNA ao cromossomo da *E.coli*. Nesse sistema são utilizadas as seqüências de recombinação *att* e as enzimas que promovem a recombinação (i.e. mix de enzimas Clonase<sup>TM</sup>). A recombinação do Lambda ocorre entre seqüências específicas denominadas *attachment (att)*: *attB* no cromossomo da *E. coli* e *attP* no cromossomo lambda. As proteínas de recombinação se ligam às duas seqüências, alinham-nas, trocam as fitas de DNA, clivam-nas e religam-nas, dando origem às seqüências *attL* e *attR*. A recombinação também pode ocorrer entre as seqüências *attL* e *attR* para dar origem a *attB* e *attP*. No entanto as enzimas envolvidas são diferentes.

#### 4.1.3. Vetor para expressão em *E. coli*

Foi construído um vetor para expressão de CV-Nm em *E.coli* para a produção de anticorpos policlonais anti-CVN em coelho para serem utilizados em experimentos de Western blot e ELISA.

O vetor pUCCVNm artificialmente sintetizado, contém as seqüências *attB1* e *attB2* necessárias para a recombinação pelo sistema Gateway® com as seqüências *attP1* e *attP2* dos vetores pDONR<sup>TM</sup> (Invitrogen). Para a recombinação foi utilizado o pDONR<sup>TM</sup>207 e o mix de enzimas Clonase<sup>TM</sup> PB (Invitrogen), e o vetor resultante foi denominado pDONCVNm (figura 7). A recombinação das seqüências *attB* com *attP* resulta nas seqüências *attL*, as quais puderam então ser recombinadas com as seqüências *attR* do vetor de expressão em *E. coli* pDEST<sup>TM</sup>17, utilizando-se o mix de enzimas Clonase<sup>TM</sup> LR (Invitrogen). O vetor resultante foi denominado pDestCVN (figura 7).



**Figura 7.** Representação esquemática da recombinação utilizada para a construção do vetor para expressão em *E. coli*, pDESTCVNm.

#### 4.2. Expressão de CV-N em *E. coli* e Western blot

Células BL21 (DE3) pLys-S competentes foram transformadas com o plasmídeo pDESTCVNm por choque térmico, conforme Chung et al. (1989). Uma colônia recombinante foi inoculada em meio LB e cultivada à 37° C com agitação de 150 rpm até atingir a OD<sub>600</sub> de aproximadamente 0.7, e então adicionou-se IPTG para a concentração final de 1 mM para induzir a expressão de CV-N. A cultura permaneceu a 37° C e agitação de 150 rpm por 4 horas. Aliquotas de 1 ml foram retiradas após 0, 2, 3 e 4 horas da indução, centrifugadas por 1 minuto a 20000g, e o *pellet* resultante foi resuspenso em 100 µl de PBS (Tampão fosfato de sódio 50 mM; NaCl 10 mM), dos quais 10 µl foram utilizados para eletroforese em SDS-PAGE 12% e Western blot. Após duas horas, metade da cultura foi retirada e submetida à lise para produção do extrato protéico da cultura bacteriana, conforme o protocolo The

QIAexpressionist™, (QIAGEN, Alemanha), e após 4 horas o mesmo foi feito com o restante da cultura. Os extratos protéicos resultantes (10 µl) foram submetidos à eletroforese em SDS-PAGE 12%. Para controle positivo, também foram submetidos à eletroforese 10 µl de um extrato protéico de bactéria expressando GFP com cauda de histidina (His-Tag).

Após a eletroforese em SDS-PAGE 12%, as proteínas do gel de poliacrilamida foram transferidas eletricamente para uma membrana de nitrocelulose Hybond™ ECL™ por meio de um *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad Laboratories, Inc.) e a membrana foi então bloqueada por 16 horas a 4° C em PBS contendo 0,1% de Tween 20 e 5% de leite desnatado (PBST). Após a transferência, o gel foi corado em Coomassie blue [metanol 45% (v/v); ácido acético 10% (v/v); azul-coomassie R250 0,25% (p/v)]. Após o bloqueio, a membrana foi incubada por 2 horas em PBST contendo anticorpo policlonal anti-HisTag diluído 5000 vezes e então lavada três vezes de 5 minutos com PBST. A membrana foi incubada por mais duas horas em PBST contendo anticorpo anti-mouse conjugado à fosfatase alcalina diluído 2500 vezes e lavada novamente por três vezes de 10 minutos. A revelação da membrana foi feita em tampão fosfatase alcalina (200 µL de NaCl 5 M; 1 mL de Tris 3 M, pH 9,5; 50 µL de MgCl<sub>2</sub> 1 M) acrescido dos substratos cromogênicos NBT, 50 mg/mL (*Nitro blue tetrazolium* em dimetil formamida 70%), e BCIP 25, mg/mL (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato em dimetil formamida 70%).

Após a confirmação da expressão de CV-N em *E. coli* foi feita outra eletroforese em SDS-PAGE com extratos protéicos de bactéria. O gel de poliacrilamida foi corado em Coomassie blue e a banda correspondente a CV-N foi cortada do gel, macerada em nitrogênio líquido e ressuspensa em PBS. A solução resultante foi então misturada na proporção 3:1 com Adjuvante de Freund completo (Sigma, St. Louis) e injetada em coelho para a produção de soro policlonal anti-CV-N.

### **4.3. Transformação de soja**

#### **4.3.1. Bombardeamento dos explantes de soja**

Foram realizados cinco experimentos, em cada um dos quais, aproximadamente 144 sementes da cultivar brasileira de soja BR-16 foram esterilizadas conforme o protocolo descrito por Aragão et al. (2000). Os eixos embrionários foram isolados das sementes e o meristema apical foi exposto por meio da remoção das folhas primárias. Os eixos foram então posicionados em placas de cultura de cinco centímetros de diâmetro contendo 12 mL de meio

BM (Aragão et al., 2000) com as regiões apicais direcionadas para cima. O bombardeamento foi realizado com o vetor p $\beta$ CongICVN, juntamente com o vetor pAC 321<sup>TM</sup> (proporção 1:1), que contém o gene *ahas*, conforme descrito em Rech et al. (2008).

Imediatamente após o bombardeamento, a multi-brotação dos explantes foi induzido pela completa imersão em meio de indução [meio MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 22,2  $\mu$ M de benzylaminopurina, 3% de sacarose, 0,6% de ágar, pH 5,7] em placas de 10 cm de diâmetro, nas quais foram incubados no escuro por 16 horas à 28° C. Depois, os mesmos foram transferidos para frascos (baby food jars) contendo 20 mL de meio de seleção (meio MS, 3% de sacarose, 500 nM de imazapyr, 0,7% de ágar e pH 5,7) e cultivados à 28° C com fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 50  $\mu$ mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>.

Os explantes que atingiram um alongamento de 4-5 cm após um período aproximado de 3 semanas foram transferidos individualmente para copos plásticos contendo solo: vermiculita (1:1) fertilizada e autoclavada. Os copos foram cobertos com saco plástico, selados com uma liga de borracha e mantidos em casa de vegetação. As ligas de borracha foram retiradas após uma semana, os sacos plásticos foram retirados após duas semanas. Neste estágio, o DNA genômico das plantas foi extraído e submetido à análise de PCR para a verificação da presença do transgene.

As plantas positivas segundo a análise de PCR, ao atingirem aproximadamente 10 cm de altura, foram transferidas para vasos contendo 5 dm<sup>3</sup> de solo autoclavado para desenvolver sementes.

#### **4.3.2. Análises por PCR das plantas regeneradas**

Para a análise de PCR das plantas transformadas, o DNA foi isolado de discos de folhas de acordo com (Doyle e Doyle, 1987) com CTAB 2X. Cada reação de PCR foi feita em alíquotas de 25  $\mu$ l contendo 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 160  $\mu$ M de cada dNTP, 200 nM de cada primer, 2 U de *Taq* polimerase (Invitrogen) e por volta de 20 ng de DNA genômico. Como controle negativo foi utilizado o DNA de uma planta não-transgênica, e como controle positivo foi utilizado o plasmídeo pET30b. Os primers SoyCVNHind e SoyCVNEco foram utilizados para amplificar a seqüência de 306 pb referente à região codificante de CV-N. O PCR foi realizado em um termociclador MJ Research programado da seguinte forma: 2 minutos a 94° C para desnaturação, 34 ciclos de 94° C por 30 segundos, 60° C por 1 minuto para anelamento dos primers e 68° C por 30 segundos para amplificação do fragmento, e um

ciclo final de 10 min a 68° C. As reações foram então submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídeo e visualizadas sob luz UV.

#### 4.3.3. Análise da progênie por PCR

O DNA das sementes foi isolado de um pequeno pedaço de um dos cotilédones conforme (Doyle e Doyle, 1987) com CTAB 2X. Aproximadamente 10 sementes de cada planta-mãe foram analisadas. As reações de PCR foram realizadas conforme item anterior. Análises de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foram realizadas para determinar se a taxa de segregação observada era consistente com a taxa Mendeliana na geração R<sub>1</sub>.

#### 4.3.4. Análise da progênie por Western Blot

O extrato de proteínas totais de sementes transgênicas confirmadas por PCR foi preparado da seguinte forma: um pedaço de um cotilédone da semente foi macerado em nitrogênio líquido, pesado e dissolvido em tampão de extração [50 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM de NaCl, 2 mM de PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) e 10 mM de DTT (ditiotreitól)] na proporção de 3  $\mu$ l para cada mg, vortexado por alguns segundos para homogeneizar e centrifugado a 13000 rpm à 4° C por 10 minutos; o sobrenadante foi transferido para um tubo novo e o pellet foi ressuspendido na mesma quantidade de tampão de extração inicial. Os extratos (sobrenadante e pellet) foram quantificados pelo método Bradford (Bradford, 1976) e depois mantidos em freezer -80° C.

Dez microgramas de cada extrato, incluindo uma semente selvagem como controle negativo, foram submetidos à eletroforese em gel SDS-PAGE 15%. Como controle positivo, foram utilizados de 50 a 200 ng de CV-N purificada produzida em *E. coli* (NIH, EUA). A transferência para membrana de nitrocelulose, o bloqueio e a hibridização com os anticorpos foram feitas de acordo com o item 4.2. Como anticorpo primário, foi utilizado o anti-CVN policlonal produzido em coelho (NIH, EUA) na concentração de 1:1000, e como anticorpo secundário, goat anti-rabbit IgG-AP-conjugated (BioRad), na concentração de 1:2500. A revelação dos *blots* foi feita com o substrato quimioluminescente CSPD® (Applied Biosystems), conforme instruções do fabricante, em filmes fotográficos Kodak BioMax RAR® (Kodak).

#### **4.3.5. Análise da ligação dos extratos de sementes à gp120 por *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA)**

A habilidade da CV-N produzida nas sementes de soja de se ligar à gp120 de HIV-1 foi testada por meio de uma ELISA convencional, conforme Boyd et al. (1997). Cem nanogramas de gp120 recombinante (HIV-1<sub>IIIB</sub>; EVA607, MRC Centralised Facility for AIDS Reagents, Potters Bar, UK) foram adicionadas a cada poço de uma placa de 96 poços (Nunc Maxisorp Immuno<sup>TM</sup> plates, Rochester, USA) e incubados à 37° C por 2 horas. Após a lavagem com PBS adicionado de Tween 0,1% e bloqueio com PBS adicionado de BSA 2.5%, diluições seriadas de 2 vezes dos extratos de proteína de sementes foram adicionadas ao longo da placa, e como controle positivo foi utilizada CV-N purificada produzida em *E. coli* (NIH, EUA) na concentração inicial de 125 ng/mL. A CV-N ligada à gp120 foi detectado com soro policlonal anti-CV-N diluído 1000 vezes. Como anticorpo secundário, foi utilizado o goat anti-rabbit IgG-HRP-conjugated (Santa Cruz Biotechnology). O substrato 3',5,5'-Tetramethylbenzidine dihydrochloride (TMB) (Sigma, St. Louis, MO) foi adicionado e a absorbância lida a 450 nm.

#### **4.4. Transformação transiente de folhas de *N. benthamiana***

##### **4.4.1. Transformação de células de *A. tumefaciens***

Células competentes de *A. tumefaciens*, linhagem LBA4404, foram transformadas por eletroporação com os plasmídeos pCamCVN, pCamCVNm, pCamCVNKdel, pCamCVNmKdel, pCamCVNPSV, pCamCVNmPSV e pBINp19 conforme o Manual de Transformação Genética de Plantas (Brasileiro e Carneiro, 1998). A linhagem de *A. tumefaciens* PMP90 foi transformada com o vetor pCambiaSGFP e a linhagem PMP90 pSoup, com os vetores PVXCVNm, PVXCVNmKdel e PVXCVNmPSV sob as mesmas condições. As células transformadas foram selecionadas em placas de Petri em meio LB contendo antibióticos específicos. As colônias transformadas foram cultivadas em 3 mL de meio LB por aproximadamente 16 horas à 28° C antes de serem utilizadas para a agroinfiltração.

#### 4.4.2. Preparação da suspensão bacteriana e agroinfiltração

As culturas bacterianas obtidas conforme item 4.4.1 foram centrifugadas por 1 minuto a 5000 rpm para a separação das células do meio de cultura. Os *pellets* resultantes foram então ressuspensos em meio de infiltração [10 mM de MgSO<sub>4</sub>; 10 mM de ácido morpholineethanesulfônico (MES), pH 5.6 e 150 µM de acetoseringona]. A suspensão contendo o plasmídeo pBINp19 foi misturada na proporção de 1:2 a cada uma das suspensões contendo os outros plasmídeos. As suspensões finais foram ajustadas para a OD<sub>600</sub> de 0,7.

Plantas de *N. benthamiana* com 4 semanas de idade (estágio de 4 folhas) foram utilizadas. As folhas foram infiltradas no lado abaxial com as suspensões bacterianas por meio de seringas de 2 mL sem agulha. Para cada construção foi infiltrada uma planta. As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação por 3 dias até a análise de expressão.

#### 4.4.3. Detecção da expressão de GFP por microscopia de fluorescência

Com o objetivo de avaliar a eficiência do experimento de agroinfiltração, discos foliares de aproximadamente 10 mm de diâmetro foram coletados das plantas infiltradas com *Agrobacterium* contendo a construção pCambiaSGFP para análise da expressão de GFP no microscópio de fluorescência. A fluorescência de GFP foi detectada por meio da excitação com luz azul, com comprimento de onda de 488 nm, e emissão através de um filtro de barreira de 505-530 nm.

#### 4.4.4. Análise da ligação à gp120 de CV-N produzido em *N. benthamiana* por ELISA

As folhas de *N. benthamiana* infiltradas foram maceradas em nitrogênio líquido, pesadas e dissolvidas em tampão PBS na razão de 2 µl para 1 mg do macerado. A suspensão foi centrifugada a 14000 rpm à 4° C por 10 minutos e o sobrenadante transferido para um tubo novo. Os extratos foram quantificados pelo método de Bradford e então mantidos em freezer -80° C até a realização das análises. Os extratos foram analisados por ELISA conforme o item 4.3.5. As amostras não foram diluídas para aplicação no primeiro poço.

#### **4.4.5. Análise da expressão de CV-N em *N. benthamiana* por Western blot**

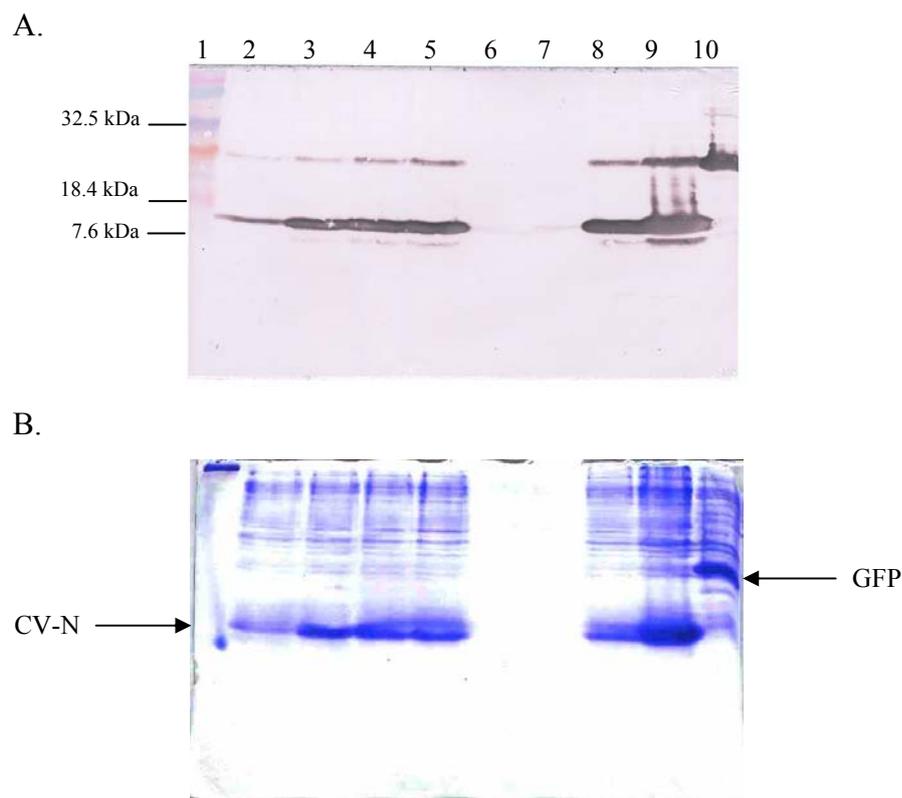
O Western blot foi realizado conforme item 4.3.4. Extratos das folhas infiltradas com *Agrobacterium* contendo as construções pCamCVN, pCamCVNm, pCamCVNKdel, pCamCVNmKdel, pCamCVNPSV, pCamCVNmPSV e um controle negativo (folha não-infiltrada) foram liofilizados e ressuspensos em 15 µl de H<sub>2</sub>O destilada e misturadas a 5 µl de tampão de amostra 4X para aplicação no gel SDS-PAGE 15%. Para controle positivo foram utilizados 150 ng de CV-N produzida em *E. coli*.

## 5. Resultados

### 5.1. Expressão de CV-N em *E.coli*

A expressão de CV-N em *E. coli* foi detectada por Western blot, por meio de um anticorpo anti-HisTag. Tanto o GFP, usado como controle positivo, como CV-N foram detectados nos tamanhos esperados de ~25 kDa e 12 kDa, respectivamente. A expressão de CV-N se mostrou mais acentuada após 4 horas da indução com IPTG. Ocorreu a formação de dímeros de CV-N, evidenciados pela banda de aproximadamente 25 kDa (figura 8A).

O gel usado para a o Western blot foi corado com Coomassie blue após a transferência, mostrando grande quantidade de proteína remanescente (figura 8B). As bandas correspondentes à CV-N foram cortadas do gel e utilizadas para a produção de anticorpo em coelho.

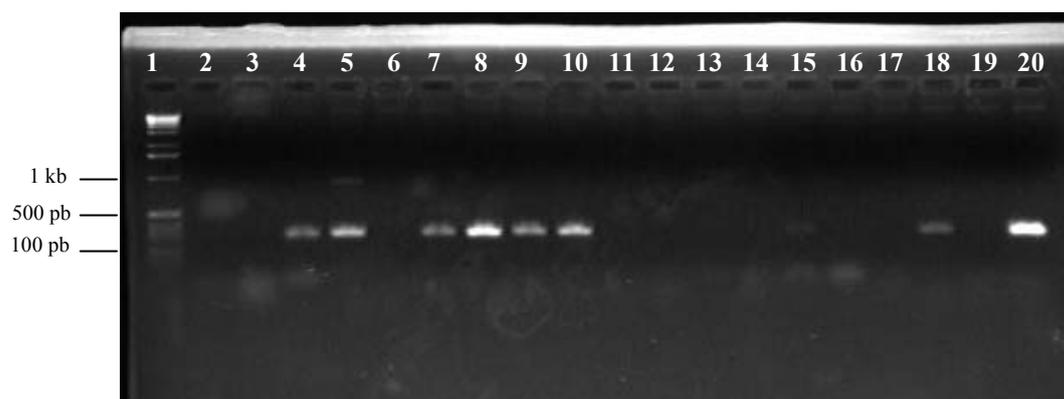


**Figura 8. A.** Membrana revelada com NBT/BCIP do Western blot dos extratos protéicos de bactéria BL21 DE3 expressando CV-N e GFP. 1) marcador Kaleidoscope™ (Bio-Rad); 2,3,4 e 5) extratos protéicos após 0, 2, 3 e 4 horas, respectivamente, de indução com IPTG; 8) extrato protéico lisado após 2 horas de indução; 9) extrato protéico lisado após 4 horas de indução; 10) extrato protéico contendo GFP. **B.** Gel utilizado no Western blot após a transferência para a membrana de nitrocelulose, corado com Coomassie blue.

## 5.2. Expressão de CV-N em soja

### 5.2.1. PCR das plantas de soja transformadas

A presença do transgene *cv-n* nas plantas de soja regeneradas após o bombardeamento com o vetor p $\beta$ CongICVN foi detectada por PCR utilizando-se os primers SoyCVNHind e SoyCVNEco. Do total de plantas analisadas, 8 plantas apresentaram o transgene (amostras 5, 7 a 10, 15, 18 e 20 - figura 9).



**Figura 9.** Resultado do PCR das plantas de soja bombardeadas. 1) marcador 1kb ladder; 2) branco; 3) controle negativo; 4) controle positivo; 5 a 20) amostras de folhas.

### 5.2.2. PCR das sementes $\beta$ CongICVN

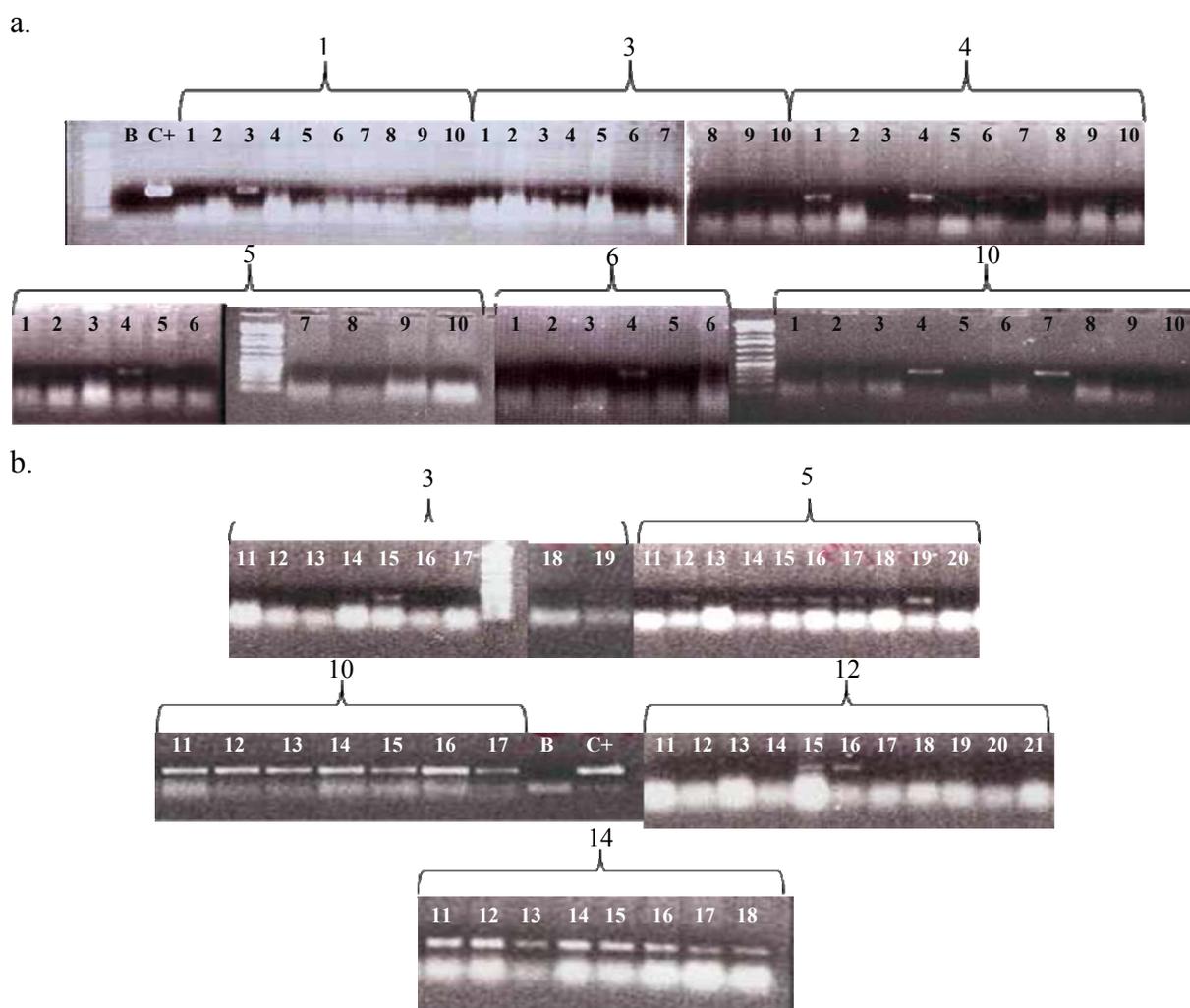
A progênie das 8 plantas transgênicas foi analisada para a presença do transgene *cv-n* por PCR. Inicialmente, 10 sementes de cada planta-mãe foram analisadas (exceto planta 6, das quais somente 6 sementes foram analisadas). O resultado revelou que eram positivas três sementes da planta 1, uma semente da planta 3, quatro sementes da planta 4, uma semente da planta 5, uma semente da planta 6, duas sementes da planta 10 (figura 10a) e nenhuma semente das plantas 12 e 14 (dados não mostrados). Como poucas sementes deram resultado positivo, mais sementes das plantas 3, 5, 10, 12 e 14 foram analisadas, o que revelou então que eram positivas uma semente em nove da planta 3, oito sementes em dez da planta 5, sete sementes em sete da planta 10, duas sementes em onze da planta 12 e dez sementes em dez da planta 14 (figura 10b). Considerando os resultados dos dois PCRs, foram feitas análises de  $\chi^2$  para verificar as probabilidades de estar ocorrendo segregação mendeliana na progênie (tabela 1).

**Tabela 1.** Análise de segregação de 8 plantas transgênicas da geração R<sub>1</sub>.

Linhagens R <sub>0</sub>	Geração R <sub>1</sub>		$\chi^2$	P <sup>b</sup>
	Positivas	Negativas		
1	2	8	14,8	0,01
3	2	17	40,5	0,00
4	6	4	0,9	27,33
5	9	11	8,9	0,19
6	1	5	9,5	0,10
10	9	8	3,9	3,57
12	2	17	40,5	0,00
14	8	10	8,2	0,28

<sup>a</sup> Dados baseados na análise por PCR do gene *cv-n*

<sup>b</sup> P é a probabilidade em porcentagem de a taxa observada refletir a segregação esperada de 3:1

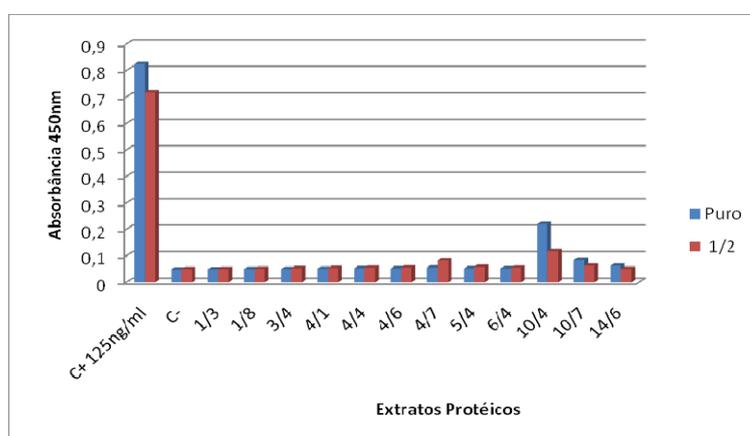


**Figura 10.** Resultado do PCR das sementes  $\beta$ CongICVN R<sub>1</sub>. a) Primeiro PCR realizado com 10 sementes de cada planta-mãe. b) Segundo PCR realizado em mais algumas sementes de 5 plantas-mãe. Cada planta-mãe está indicada por chaves e os números das sementes estão indicados nas figuras. B: amostra em branco; C+: controle positivo (resultado da amplificação do plasmídeo pET30bCVN).

### 5.2.3. ELISA gp120 das sementes $\beta$ CongICVN

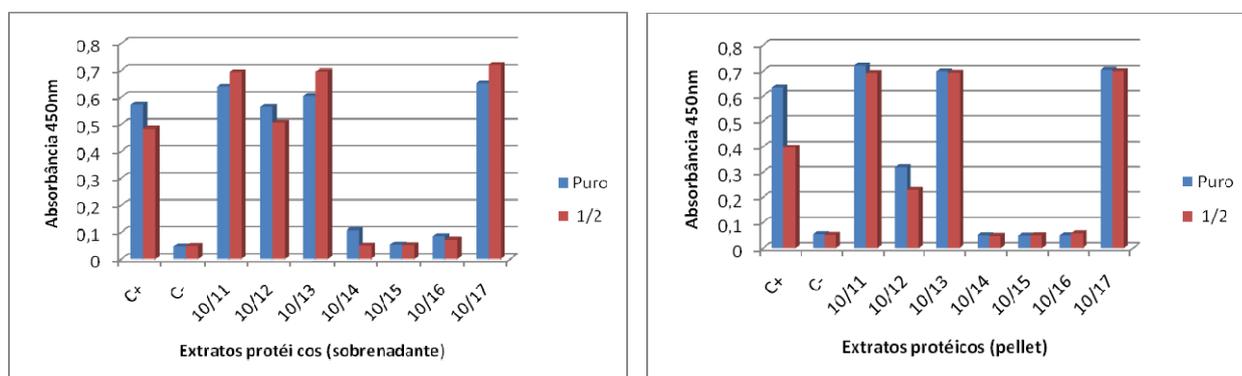
A capacidade de CV-N produzida em sementes de soja de se ligar à gp120 viral foi testada por ELISA.

O primeiro experimento foi feito com as doze sementes positivas analisadas no primeiro PCR e teve caráter qualitativo (a concentração de proteína dos extratos não foi determinada). Os extratos de cada semente (sobrenadante e pellet) foram diluídos 10 vezes para aplicação no primeiro poço, a partir do qual foram feitas diluições seriadas de 2X ao longo da placa. Apenas duas sementes apresentaram um sinal maior que o controle negativo (10/4 e 10/7), sendo as duas da mesma planta-mãe (figura 11).



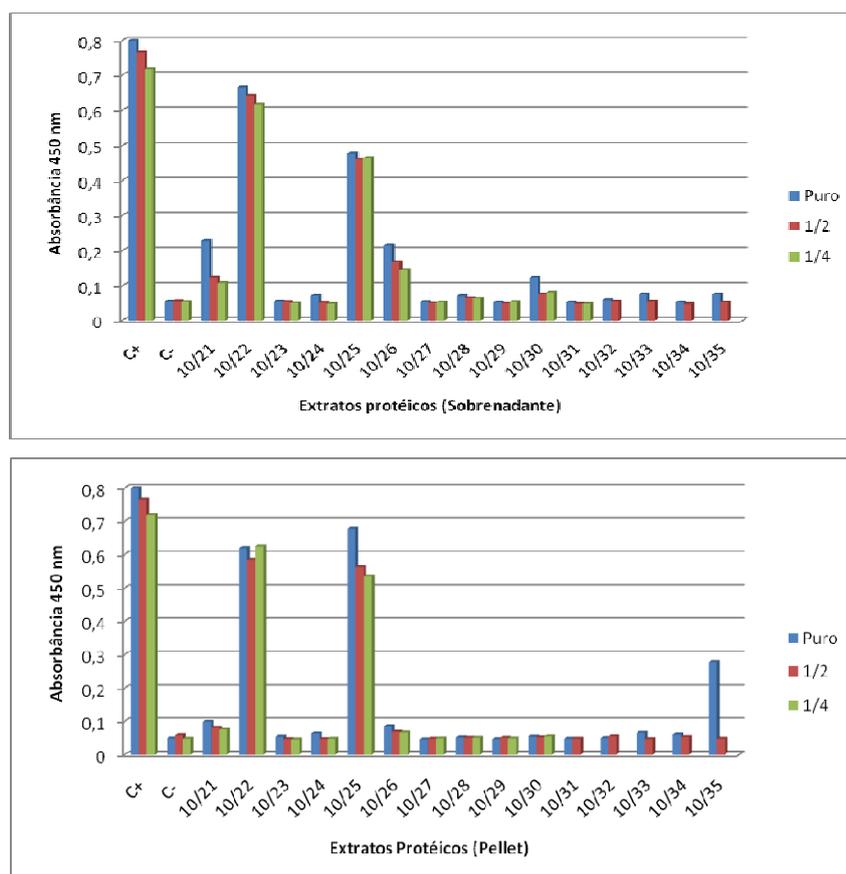
**Figura 11.** Ligação dos extratos protéicos de sementes transgênicas à gp120 medida por ELISA. Como controle positivo foi utilizada CV-N recombinante purificada de *E. coli*, na concentração inicial de 125 ng/ml.

Tendo em vista que apenas sementes da planta 10 apresentaram sinal na ELISA, as outras sete sementes PCR-positivas da planta 10 foram analisadas. Os extratos foram diluídos 5 vezes para a aplicação no primeiro poço. Quatro sementes (10/11, 10/12, 10/13 e 10/17) apresentaram sinal maior ou igual ao controle positivo e não foi observado acúmulo diferencial considerável entre os extratos do sobrenadante e do pellet (figura 12).



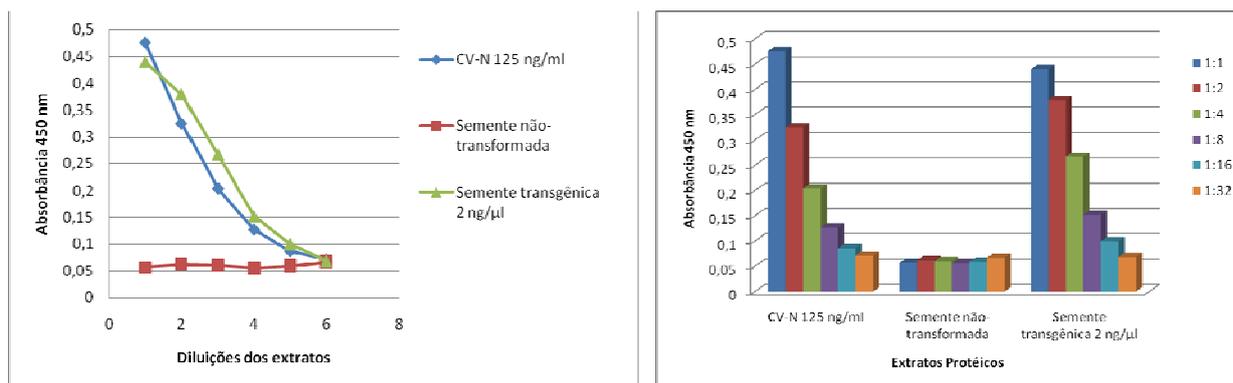
**Figura 12.** Ligação dos extratos protéicos de sementes da planta 10 à gp120 medida por ELISA (sobrenadante e pellet dos extratos protéicos).

As dez sementes PCR-positivas da planta 14 foram também analisadas, mas nenhuma apresentou sinal maior que o controle negativo (dados não mostrados). Posteriormente, mais 16 sementes da planta 10 foram analisadas por ELISA sem que tivessem sido analisadas por PCR antes. Os extratos foram diluídos 50 vezes para aplicação no primeiro poço. Seis apresentaram sinal maior que o controle negativo, sendo duas com sinal elevado, relativamente ao controle (10/22 e 10/25) (figura 13).



**Figura 13.** Ligação dos extratos protéicos de sementes da planta 10 à gp120 medida por ELISA (sobrenadante e pellet dos extratos protéicos).

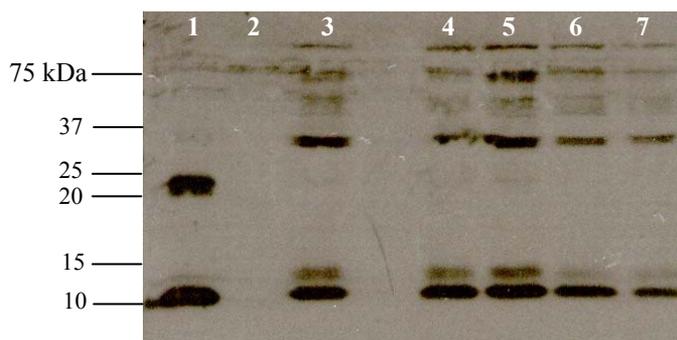
Por fim, foi feito um experimento quantitativo com a amostra da semente 10/17 para estimar a percentagem de CV-N em relação à quantidade de proteínas solúveis totais da semente. Para isto, o extrato do sobrenadante foi aplicado no primeiro poço na concentração de 2 ng/ $\mu$ l. A partir da equação da reta do controle positivo, foi calculada a quantidade de aproximadamente 0,12 ng/ $\mu$ l de CV-N no extrato, o que equivale a ~6% das proteínas solúveis totais (figura 14).



**Figura 14.** Ligação do extrato protéico da semente 10/17 à gp120 medida por ELISA. Os resultados estão representados em gráfico de dispersão (esquerda), e de colunas (direita).

#### 5.2.4. Western blot das sementes $\beta$ CongICVN

A expressão de CV-N nas sementes de soja foi detectada por Western blot dos extratos de proteínas totais por meio de um anticorpo policlonal anti-CVN produzido em coelho. Foram analisadas as sementes que apresentaram o maior sinal no teste ELISA. Dez microgramas de cada extrato, incluindo o controle negativo, foram aplicados no gel. Todas apresentaram a banda de 11 kDa correspondente a CV-N, e bandas com maiores pesos moleculares, provavelmente resultantes da oligomerização de CV-N, pois não foram observadas no extrato da semente selvagem (figura 15). Como controle positivo foram utilizados 100 ng de CV-N recombinante purificada de *E. coli*. A banda de aproximadamente 22 kDa observada no controle positivo, se refere ao dímero de CV-N.



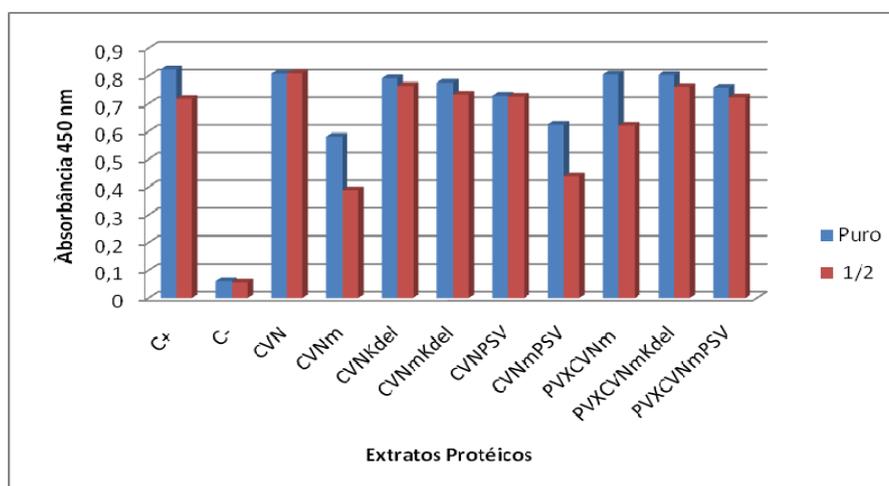
**Figura 15.** Western blot dos extratos totais de sementes  $\beta$ CongICVN. 1) CV-N purificada produzida em *E. coli*; 2) Semente não transformada; 3) Semente 10/11; 4) Semente 10/13, 5) Semente 10/17, 6) Semente 10/22 e 7) Semente 10/25.

### 5.3. Expressão transiente de CV-N em folhas de *N. benthamiana*

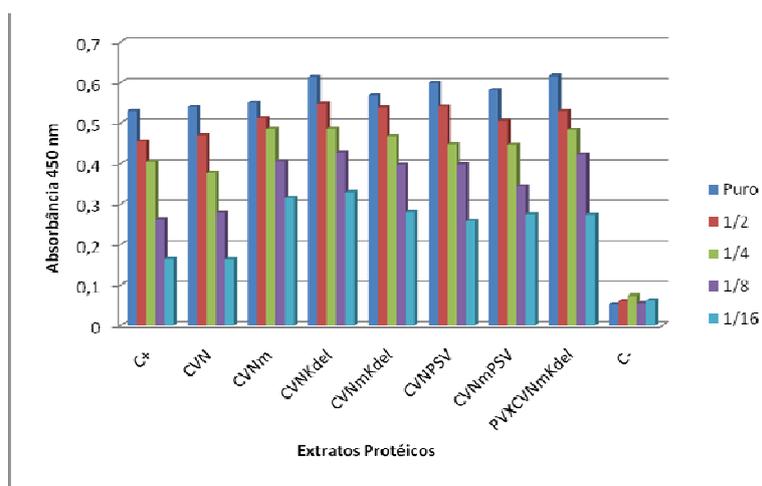
#### 5.3.1. ELISA gp120 das folhas agroinfiltradas

Inicialmente, foi feita uma ELISA com caráter qualitativo. Foram analisados extratos de folhas agroinfiltradas com todas as construções do item 4.1.2, e estes não foram diluídos para aplicação no primeiro poço. Como controle negativo foi utilizado um extrato de folhas não-infiltradas e como controle positivo, CV-N recombinante purificada de *E. coli* na concentração inicial de 125 ng/ml (figura 16).

Após a verificação de que todas as construções são capazes de produzir CV-N que se liga à gp120, foi feito um experimento quantitativo com o objetivo de comparar as construções e verificar se havia diferença de expressão e acúmulo de CV-N entre os vetores binários testados e os vetores virais. Três dias após a infiltração das plantas, os extratos foram preparados e quantificados pelo método de Bradford, e diluídos para a concentração de 0,2 µg/µl para análise por ELISA gp120. A partir da equação da reta das absorvâncias obtidas para o controle positivo, e dos valores obtidos para os extratos (figura 17) foi estimada a concentração de CV-N nos extratos (tabela 2).



**Figura 16.** Ligação dos extratos de folhas de *N. benthamiana* agroinfiltradas à gp120 medida por ELISA.



**Figura 17.** Ligação dos extratos de folhas de *N. benthamiana* agroinfiltradas à gp120 medida por ELISA. A concentração inicial dos extratos é de 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , e do controle positivo, de 125 ng/ml.

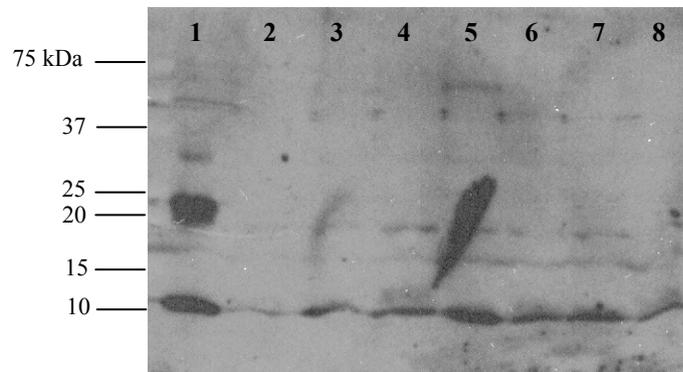
**Tabela 2.** Percentagem de CV-N nos extratos de proteínas totais de folhas agroinfiltradas com as construções especificadas.

	Absorbância (450 nm)	[CVN] ng/ml	[CVN] ng/ $\mu\text{l}$	%CVN
CVN	0,278	20,3	0,0203	0,06
CVNm	0,405	33	0,033	0,09
CVNkdel	0,427	35,2	0,0352	0,10
CVNmKdel	0,397	32,2	0,0322	0,09
CVNPSV	0,398	32,3	0,0323	0,09
CVNmPSV	0,344	26,9	0,0269	0,08
PVXCVNmKdel	0,422	34,7	0,0347	0,10

### 5.3.2. Western blot das folhas agroinfiltradas

Após a verificação da expressão de CV-N em folhas pela ELISA gp120, foi feito um western blot para confirmar o tamanho da proteína expressa e verificar o padrão das bandas. Como o nível de expressão observado por meio da ELISA gp120 foi muito baixo, as amostras foram concentradas por meio de liofilização. Cem microlitros de cada extrato, inclusive do controle negativo, foram utilizados, de forma que aproximadamente 200  $\mu\text{g}$  de proteína pudessem ser aplicadas no gel. O resultado mostra que foi possível detectar CV-N do tamanho esperado em todos os extratos (figura 18). É possível observar uma banda fraca no controle negativo (folha não transformada), que provavelmente se refere à ligação inespecífica do anticorpo com proteínas da folha, uma vez que na ELISA gp120 o controle negativo não apresentou nenhuma diferença de sinal em relação ao branco (amostra sem extrato). Ou ainda é possível que tenha vazado um pouco da amostra de proteína dos poços adjacentes. As amostras aplicadas eram muito viscosas, devido à grande concentração de

proteínas, dificultando em alguns casos a aplicação nos poços. A grande concentração de proteínas também é a explicação provável para o padrão um pouco distorcido das bandas.



**Figura 18.** Western blot dos extratos totais de folhas agroinfiltradas de *N. benthamiana*. 1) CV-N purificada produzida em *E. coli*.; 2) Extrato de folha não-infiltrada; 3) Extrato de folha infiltrada com a construção pCamCVN; 4) Extrato de folha infiltrada com a construção pCamCVNm; 5) Extrato de folha infiltrada com a construção pCamCVNKdel; 6) Extrato de folha infiltrada com a construção pCamCVNmKdel; 7) Extrato de folha infiltrada com a construção pCamCVNPSV; 8) Extrato de folha infiltrada com a construção pCamCVNmPSV.

## 6. Discussão

A procura por sistemas de expressão de proteínas com alta eficiência e custos reduzidos tem voltado a atenção de cientistas e de indústrias para o uso de plantas como uma opção viável. A utilização de plantas como biorreatores vem sendo ilustrada por diversos produtos recombinantes já em fase de testes clínicos (Gleba et al., 2005). Existem diversas vantagens oferecidas pelas plantas para a produção de proteínas recombinantes como o potencial para alta capacidade de produção a um custo reduzido e a ausência de patógenos capazes de infectar o homem ou animais e que poderiam contaminar o produto final. Além disso, as plantas são capazes de processamento pós-traducional, o que permite a produção de proteínas glicosiladas (Horn et al., 2004).

Para a produção de CV-N, uma proteína candidata a microbicida cuja finalidade seria compor um gel vaginal anti-HIV para prevenção da AIDS, uma enorme quantidade de proteína seria necessária, a qual, segundo, Shattock e Moore (2003), só poderia ser produzida em plantas transgênicas. Desta forma, a grande capacidade de produção a custos reduzidos foi a característica pela qual foi escolhido esse sistema.

Levando em consideração as vantagens e desvantagens da produção de proteínas recombinantes em folhas e em sementes, foi proposta neste trabalho a utilização de ambos os sistemas para a produção de CV-N. Como em folhas o direcionamento da proteína pode ser crucial para a estabilidade e conseqüente acúmulo da mesma, foram elaboradas três estratégias: direcionamento para o RE, por ser um ambiente rico em chaperonas, porém pobre em proteases (Bruyns et al., 1996; Fischer et al., 2004); para o apoplasto, do qual a purificação é bastante simples se bons níveis de acúmulo são alcançados (Sexton et al., 2006); e para o vacúolo, para verificar o comportamento de CV-N sob pH ácido. Já que o objetivo era a comparação de diferentes construções, foi escolhido o sistema de expressão transiente em folhas de *N. benthamiana* por agroinfiltração. Para transformação estável de soja, foi utilizada uma única construção com o peptídeo sinal da  $\beta$ -conglícinina  $\alpha'$  para direcionar para os corpos protéicos de sementes, local considerado ideal para o acúmulo de proteínas.

O sistema de expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* é relativamente rápido e já foi utilizado para a produção de CV-N em diversos trabalhos (Colleluori et al., 2005; Mori et al., 2002; Mori et al., 1998). Por esse motivo, ele foi escolhido para expressão de CV-N para produção de soro policlonal anti-CV-N em coelho. A expressão foi bem-sucedida,

como demonstrado nas figuras 5 e 6, mas o soro obtido após a imunização do coelho apresentou baixa especificidade.

Para a expressão em sementes de soja, foi utilizado o gene *cv-n* em sua forma nativa, isto é, sem mutação, fusionado ao peptídeo-sinal da  $\beta$ -conglucina  $\alpha'$ , sob o controle transcricional do promotor semente-específico da  $\beta$ -conglucina, com o objetivo de acumular CV-N nos corpos protéicos da semente. A planta de soja foi escolhida por apresentar diversas vantagens em relação a outros cereais, como o milho, por exemplo. De acordo com Abud et al. (2003), a disseminação do pólen da soja não ultrapassa 6,5 metros, e portanto apresenta baixo risco de polinização cruzada entre plantas transgênicas e não-transgênicas, diminuindo assim as possibilidades de fluxo gênico, o que representa uma vantagem em termos de biosegurança. Em contraste, o pólen do milho alcança distâncias superiores a 500 metros, uma vez que a polinização é feita pelo vento (Iowa State University, 1993). Porém, por questões de biosegurança, como opção inicial, a produção de plantas transgênicas expressando proteínas de interesse farmacêutico ficará restrita a casas de vegetação. E nesse ponto a soja apresenta mais uma vantagem em relação ao milho: ela se desenvolve muito bem em casa de vegetação e a produção de sementes pode chegar a 1000 sementes por planta com o aumento do fotoperíodo.

Após 5 experimentos de bombardeamento de embriões de soja (com 144 embriões/experimento), 8 plantas regeneradas foram confirmadas por PCR como sendo transgênicas para o gene *cv-n*. Aproximadamente 20 sementes de cada planta foram testadas, e após a análise das taxas observadas por teste de qui-quadrado constatou-se que nenhuma planta apresentou probabilidade alta de estar segregando na taxa mendeliana, de 3:1. No entanto, o padrão de integração do transgene e a possibilidade de as plantas transgênicas serem quimeras, principalmente quando se utiliza métodos diretos de transformação, implica que a análise da segregação pode ser bastante complexa (Aragão et al., 1996). Os dados obtidos pela análise por PCR, portanto, não são suficientes para confirmação da taxa de segregação. Uma análise mais detalhada deve levar em consideração a posição das vagens na planta  $R_0$ , ao invés de considerar uma amostragem de todas as sementes, devido à possibilidade de as plantas serem quimeras. Também é importante que sejam feitas análises de Southern blot do DNA genômico das plantas e das sementes para determinação do número de cópias do transgene. A identificação de genótipos com baixo número de cópias e padrões de herança mais simples é importante por questões de biosegurança, porque, de modo geral,

apresentam níveis de expressão mais estáveis ao longo de sucessivas gerações (Sharma et al., 2005).

As análises das sementes R<sub>1</sub> por Western blot e ELISA gp120 demonstraram a expressão bem-sucedida, apenas em uma linhagem transgênica aparentemente, do total de oito obtidas. Esse fato pode ser explicado pelo local de integração do transgene nos diferentes eventos de transformação, além de silenciamento ocasionado por aberrações do transgene integrado. De acordo com Kohli e colaboradores (2003), a posição de integração e a estrutura do locus do transgene podem variar consideravelmente entre transformantes independentes, e cada um desses fatores pode ter um forte efeito no nível e na estabilidade da expressão do transgene. Quando uma ou múltiplas cópias são integradas em um locus localizado dentro ou próximo de uma área hipermetilada do genoma, por exemplo, o transgene pode sofrer silenciamento transcricional (Vaucheret et al., 1998). Mehlo et al. (2000), investigando sete linhagens de milho transgênico com múltiplas cópias, encontraram uma forma de rearranjo do transgene em pelo menos uma cópia em todas as linhagens. Eles concluíram que pequenos rearranjos não-detectáveis devem ser muito comuns e podem ser responsáveis pela perda da expressão de transgenes aparentemente intactos. Além disso, RNAs aberrantes originados desses transgenes recombinados poderiam contribuir para o silenciamento de transgenes intactos (Mehlo et al., 2000).

Segundo Kohli et al. (2003), a utilização de plasmídeos inteiros no bombardeamento resulta na inevitável integração do esqueleto do vetor junto com o transgene de interesse, o que inclui seqüências procarióticas para resistência a antibióticos. Foi demonstrado que tais seqüências fornecem sítios de recombinação que estimulam rearranjos do transgene (Kohli et al., 1999). Conforme Fu et al. (2000), a utilização de “cassetes mínimos”, contendo apenas o gene de interesse (promotor, região codificadora e terminador), resulta no aumento de loci transgênicos estruturalmente intactos e em menor número de cópias, e, conseqüentemente, em uma maior estabilidade da expressão.

Levando em consideração que foram utilizados dois plasmídeos inteiros para o bombardeamento das plantas de soja, a baixa percentagem de transformantes expressando a molécula de interesse poderia ser explicada pelos fenômenos acima descritos, e a utilização de “cassetes mínimos” poderia solucionar esse problema. De qualquer forma, uma única linhagem expressando CV-N pode ser considerada suficiente para a análise preliminar da expressão de CV-N em soja, desde que o transgene seja transmitido para as próximas

gerações. A grande variação no nível de expressão também indica que níveis ainda maiores podem ser obtidos.

Sementes da linhagem 10 apresentaram acúmulo de CV-N, segundo as análises de ELISA gp120 e Western blot, indicando que a construção utilizada foi eficiente para a expressão semente-específica da proteína de interesse. Como foi utilizado o peptídeo sinal da  $\beta$ -conglucina, é provável que CV-N esteja acumulando nos corpos protéicos das sementes. Ensaio imunocitoquímico das sementes poderão confirmar a localização sub-celular de CV-N.

Os resultados dos testes ELISA gp120 da geração R<sub>1</sub> da linhagem 10 indicaram que nem todas as sementes transgênicas apresentam o mesmo nível de expressão de CV-N. Um alto número de cópias do transgene na planta 10 pode ser a causa desse fenômeno. Uma vez que as cópias, se não inseridas no mesmo locus, estariam segregando na progênie, o que resultaria na expressão diferencial de CV-N nas sementes R<sub>1</sub>.

De acordo com as análises preliminares, o nível de expressão de algumas sementes R<sub>1</sub> é de ~6%, o que é bastante alto quando comparado a outros trabalhos recentes de expressão de biofármacos em sementes de soja [e.g. 2,3% em Ding et al. (2006) e 2,4% em Moravec et al. (2007)], e muito superiores aos níveis abaixo de 1%, considerados típicos para expressão de proteínas em plantas (Hood et al., 2002). Interessantemente, como a quantificação foi feita por meio da ELISA gp120, o resultado obtido fornece a percentagem de CV-N biologicamente ativo (pois a atividade antiviral da proteína está diretamente relacionada com a sua capacidade de se ligar à gp120), e não somente a percentagem de CV-N expresso na semente. Esse resultado é em parte surpreendente, porque de acordo com Mori et al. (2002), CV-N possui um sítio de N-glicosilação na Asn30, que quando glicosilada, perde a capacidade de ligação à gp120, conforme demonstrado pela expressão em *P. pastoris* e pela glicosilação *in vitro*. Como foi utilizado um peptídeo-sinal, que transporta a proteína para o RE, local onde são adicionados os N-glicanos, era de se esperar que a CV-N expressa fosse inativa. Entretanto isso não ocorreu, gerando assim duas hipóteses: i) de que o sítio de glicosilação não é reconhecido pelas células da semente ou ii) a glicosilação de semente é estruturalmente diferente de *P. pastoris* ao ponto de não inativar a proteína. A análise de western corrobora a primeira hipótese, conforme discutido a seguir.

Com a análise dos extratos protéicos das sementes ELISA-positivas por Western blot, foi confirmada a presença de CV-N no tamanho de ~11 kDa, que corresponde ao tamanho correto para a proteína em sua forma monomérica e não-glicosilada. No entanto é também

possível observar a presença de uma banda de aproximadamente 13 kDa, imediatamente acima da banda correspondente ao monômero de CV-N (figura 13). O tamanho de ~13kDa para a proteína N-glicosilada estaria de acordo com o observado por Mori e colegas (2002), de que a massa da proteína aumenta em aproximadamente 3 kDa quando glicosilada. Outra hipótese para a presença desta banda seria uma porção de CV-N ainda não processada pelo RE, ou seja, com o peptídeo sinal não-clivado. Todavia o tamanho esperado seria de aproximadamente 18 kDa (já que a previsão da massa molecular do peptídeo sinal é de 7 kDa), e portanto tal hipótese pode ser descartada. Dessa forma pretende-se verificar a composição desta banda por meio de espectrometria de massa.

No Western blot, é possível ainda verificar a presença de bandas de tamanhos maiores do que o esperado para o monômero ou mesmo para o dímero de CV-N (figura 13), o que sugere que está ocorrendo a oligomerização da proteína ou a interação entre CV-N e alguma proteína da semente, já que as mesmas não são detectadas no controle negativo e, portanto, não se trata de interação não-específica entre o anticorpo anti-CVN e proteínas da semente. Segundo Barrientos et al. (2004), a dimerização da proteína não compromete a sua atividade, mas nada se sabe sobre a oligomerização da mesma. Como não há na literatura informação sobre a oligomerização de CVN, é provável que as bandas maiores correspondam à interação de uma proteína da semente com CV-N. Tal observação estaria de acordo com os achados de Shenoy et al. (2001), de que CV-N se liga com alta afinidade tanto ao monômero quanto ao tetrâmero da aglutinina de soja, por meio do oligossacarídeo Man-9 desta proteína. Análises de espectrometria de massa poderão esclarecer melhor a composição dessas bandas. Com relação à funcionalidade das mesmas, isto é, se elas têm ou não a capacidade de se ligar à gp120, pode-se fazer um Western blot a partir de um gel não-desnaturante, utilizando gp120 para hibridização primária e um anti-gp120 conjugado a peroxidase ou fosfatase alcalina para detecção.

A expressão transiente de CV-N em folhas de *N. benthamiana* teve como objetivo principal a comparação entre três diferentes tipos de endereçamento celular (RE, apoplasto e vacúolo), de forma a comparar o local de maior acúmulo da proteína. Além disso, a fim de verificar se ocorre ou não a glicosilação de CV-N, e se esse fato interfere na ligação ao gp120, foram utilizadas construções tanto com a forma nativa, quanto com a forma mutada, Asn30Gln/Pro51Gly.

As análises de folhas agroinfiltradas por teste ELISA preliminares mostraram que todas as construções estavam produzindo CV-N capaz de se ligar à gp120, isto é, não houve

diferença significativa entre CV-N nativa e mutada, indicando que a primeira não estava sendo glicosilada, ou que a glicosilação não era capaz de interferir na ligação da proteína recombinante à gp120. Assim como os resultados obtidos com a semente, esse fato foi surpreendente, pois era esperado que a forma nativa resultante das três construções (i.e. RE, vacúolo e apoplasto) fosse glicosilada, já que nos três casos, CV-N passaria pelo RE.

Subseqüentemente foi feita uma ELISA gp120 para quantificar CV-N expressa em folhas com cada uma das construções e verificar se havia diferença considerável entre elas. O resultado mostrou que a expressão foi realmente baixa, entre 0,06 e 0,1% TSP (tabela 1) para todas as construções. Devido a esse fato, não foi possível uma quantificação precisa, o que prejudicou a comparação entre elas.

Com o objetivo de confirmar o tamanho de CV-N produzida em folhas, foi realizado o Western blot dos extratos totais. Tendo em vista a quantificação de CV-N nas folhas por ELISA gp120, decidiu-se liofilizar o extrato de forma a possibilitar a detecção de CV-N por Western blot. Por isso, foram liofilizados 100 µl de cada extrato (aproximadamente 200 µg de proteína total) para aplicação no gel. O resultado do Western revelou uma banda do tamanho esperado para CV-N, de ~11 kDa, para todas as construções, e não foram detectadas outras bandas que sugerissem a formação de dímeros ou oligômeros de CV-N, nem a glicosilação da mesma. Entretanto esses fenômenos não podem ser descartados uma vez que a expressão é baixa e tais moléculas poderiam estar presentes a níveis indetectáveis.

O silenciamento pós-transcricional poderia ser um dos motivos para a baixa expressão observada. No entanto, como foi utilizado o supressor de silenciamento p19, era esperado que tal efeito fosse bastante amenizado produzindo bons níveis de expressão. Além disso, como a expressão de CV-N foi descrita em fumo alcançando o nível de 0,85% TSP (Sexton et al., 2006), pretendia-se obter níveis maiores equivalentes a esse, principalmente utilizando-se o PVX como replicon.

Uma possível explicação para esse resultado é a condição das plantas agroinfiltradas. Devido, provavelmente, a uma mudança do substrato normalmente utilizado, as plantas apresentaram algumas alterações, como clorose e desenvolvimento precoce das flores. Dessa forma, é razoável afirmar que a expressão foi baixa devido ao estado fisiológico das plantas. Plantas inoculadas com *Agrobacterium* contendo a construção com GFP também apresentaram baixa fluorescência, da mesma forma que plantas agroinfiltradas com PVX, também contendo o gene da GFP. Os resultados aqui descritos, portanto, são insuficientes

para fazer uma comparação mais precisa entre as construções. Novos experimentos devem ser realizados a fim de atingir os objetivos desse trabalho.

Apesar do nível de transcrição das diferentes construções não ter sido avaliado, provavelmente a CV-N produzida em folhas é rapidamente degradada, não permitindo seu acúmulo e inviabilizando este sistema como uma alternativa para a produção de CV-N. O uso de proteínas de fusão que estabilizem CV-N nas células da folha pode ser uma alternativa para o seu maior acúmulo (Lacorte et al., 2007).

Mesmo que a expressão em folhas de *N. benthamiana* tenha sido deficiente devido às condições das plantas, já é possível fazer uma comparação preliminar entre a expressão em folhas e em sementes. A expressão em semente chegou a 6% TSP, enquanto que o observado para folhas foi de 0,1%, portanto, cerca de 60 vezes menor. Em Sexton et al. (2005), CV-N foi expressa na taxa de 0,85% TSP em tabaco, que equivale a sete vezes menos que os valores obtidos em sementes de soja. Essa diferença reflete, provavelmente, a maior estabilidade do ambiente da semente quando comparado ao da folha. As células da folha são abundantes em água, sendo favoráveis à ação de proteases, enquanto que, em sementes, as proteínas ficam protegidas da degradação proteolítica (Fischer et al., 2004; Ma et al., 2003; Twyman et al., 2003). Isso implica em que as folhas devem ser processadas imediatamente após a colheita para a purificação da proteína recombinante, enquanto que as sementes podem ser armazenadas por um longo período, desconectando assim os processos de expressão e purificação (Gleba et al., 2005). De acordo com Larrick e Thomas (2001), sementes transgênicas expressando enzimas ou anticorpos podem ser armazenadas por até três anos à temperatura ambiente, e por pelo menos três anos sob refrigeração, sem que haja perda da atividade enzimática ou capacidade de ligação das proteínas recombinantes. Essa propriedade das sementes é ilustrada no trabalho de da Cunha (2008), onde foram detectadas proteínas recombinantes estáveis em sementes de soja transgênicas armazenadas há seis anos.

Uma importante questão que ainda precisa ser respondida é sobre a purificação de CV-N. Esta etapa é crucial para a conclusão sobre a viabilidade de sua produção em plantas a baixos custos, que é o objetivo em longo prazo deste trabalho.

## 7. Conclusões e Perspectivas

O uso de plantas como biorreatores apresenta algumas vantagens em relação a sistemas convencionais de produção de proteínas heterólogas. O custo reduzido e a capacidade de aumento da produção são alguns destes fatores que fazem este sistema particularmente atrativo. No entanto, algumas limitações ainda precisam ser contornadas para que este sistema venha a ser viabilizado para a produção de qualquer proteína.

Este trabalho mostrou que a produção de CV-N funcional em sementes de soja é possível. A expressão transiente em folhas de *N. benthamiana* demonstrou que esse sistema ainda precisa ser aprimorado. Para que a viabilidade da produção de CV-N seja confirmada, são necessários ensaios de inativação viral *in vitro* com a proteína recombinante. A etapa de purificação também é de grande importância para essa confirmação. Para que os custos de produção do microbicida em sementes sejam reduzidos, as etapas de purificação devem ser simples, e há indícios de que isso ocorra com a extração de CV-N, uma vez que a proteína apresenta grande estabilidade. Além disso, análises da segregação das cópias do transgene ao longo das gerações também são de grande importância, uma vez que se pretende obter uma linhagem homozigota para utilização comercial. Com a obtenção da linhagem homozigota, é possível então a produção de grandes quantidades de sementes expressando CV-N, que pode ser purificada e utilizada para testes clínicos. É importante ressaltar que CV-N ainda não foi submetida a testes clínicos, e sua produção em sementes de soja pode viabilizar esse processo, uma vez que as etapas de purificação estejam bem estabelecidas.

Desta forma, para que o uso de uma molécula como CV-N venha a ser viável, é importante que sejam considerados, além dos aspectos técnicos abordados em parte neste trabalho, os aspectos farmacológicos e testes clínicos. Este processo pode ser extremamente caro e demorado. No caso específico de CV-N, como a finalidade é que a proteína venha a ser utilizada como constituinte de um gel de uso tópico, é provável que o processo de liberação seja relativamente mais simples, se houver sucesso nos testes clínicos. Isso é particularmente esperado devido à urgência de se fazer disponível um agente capaz de contribuir para a contenção da epidemia de AIDS, principalmente na África.

## 8. Referências Bibliográficas

- Abud, S., Souza, P.I.M., Moreira, C.T., Andrade, S.R.M., Ulbrich, A.V., Vianna, G.R., Rech, E.L. e Aragão, F.J.L. (2003) Dispersão de pólen em soja transgênica na região do Cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **38**.
- Abud, S., Souza, P.I.M., Vianna, G.R., Leonardez, E., Moreira, C.T., Faleiro, F.G., Júnior, J.N., Monteiro, P.M.F.O., Rech, E.L. e Aragão, F.J.L. (2007) Gene flow from transgenic to nontransgenic soybean plants in the Cerrado region of Brazil. *Genetic Molecular Research*, **6**, 345-352.
- Altpeter, F., Baisakh, N., Beachy, R., Bock, R., Capell, T., Christou, P., Daniell, H., Datta, K., Datta, S., Dix, P.J., Fauquet, C., Huang, N., Kohli, A., Mooibroek, H., Nicholson, L., Nguyen, T.T., Nugent, G., Raemakers, K., Romano, A., Somers, D.A., Stoger, E., Taylor, N. e Visser, R. (2005) Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. *Molecular Breeding*, **15**, 305-327.
- Aragão, F.J.L., Barros, L.M.G., Brasileiro, A.C.M., Ribeiro, S.G., Smith, F.D., Sanford, J.C., Faria, J.C. e Rech, E.L. (1996) Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theor Appl Genet* **93**, 142-150.
- Aragão, F.J.L., Sarokin, L., Vianna, G.R. e Rech, E.L. (2000) Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. *Theor Appl Genet*, **101**, 1-6.
- Balzarini, J. e Van Damme, L. (2007) Microbicide drug candidates to prevent HIV infection. *Lancet*, **369**, 787-797.
- Barta, A., Sommergruber, K., Thompson, D., Hartmuth, K., Matzke, M.A. e Matzke, A.J.M. (1986) The expression of a nopaline synthase - human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Molecular Biology*, **6**, 347-357.
- Barrientos, L.G., Lasala, F., Delgado, R., Sanchez, A. e Gronenborn, A.M. (2004) Flipping the switch from monomeric to dimeric CV-N has little effect on antiviral activity. *Structure*, **12**, 1799-1807.
- Boyd, M.R., Gustafson, K.R., McMahon, J.B., Shoemaker, R.H., O'Keefe, B.R., Mori, T., Gulakowski, R.J., Wu, L., Rivera, M.I., Laurencot, C.M., Currens, M.J., Cardellina, J.H., Buckheit, R.W., Jr., Nara, P.L., Pannell, L.K., Sowder, R.C., e Henderson, L.E. (1997) Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-

- inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: potential applications to microbicide development. *Antimicrob Agents Chemother*, **41**, 1521-1530.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Brasileiro, A.C.M. e Carneiro, V.T.C. (1998) *Manual de transformação genética de plantas*. Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, Brasília.
- Bruyns, A.-M., De Jaeger, G., De Neve, M., De Wilde, C., Van Montagu, M. e Depicker, A. (1996) Bacterial and plant-produced scFv proteins have similar antigen-binding properties. *FEBS Letters*, **386**, 5-10.
- Chan, D.C. e Kim, P.S. (1998) HIV entry and its inhibition. *Cell*, **93**, 681-684.
- Chiu, W., Niwa, Y., Zeng, W., Hirano, T., Kobayashi, H. e Sheen, J. (1996) Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr Biol*, **6**, 325-330.
- Chung, C.T., Niemela, S.L. e Miller, R.H. (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 2172-2175.
- Clough, R.C., Pappu, K., Thompson, K., Beifuss, K., Lane, J., Delaney, D.E., Harkey, R., Drees, C., Howard, J.A. e Hood, E.E. (2006) Manganese peroxidase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* is enzymatically active and accumulates to high levels in transgenic maize seed. *Plant Biotechnol J*, **4**, 53-62.
- Colleluori, D.M., Tien, D., Kang, F., Pagliei, T., Kuss, R., McCormick, T., Watson, K., McFadden, K., Chaiken, I., Buckheit, R.W., Jr. e Romano, J.W. (2005) Expression, purification, and characterization of recombinant cyanovirin-N for vaginal anti-HIV microbicide development. *Protein Expr Purif*, **39**, 229-236.
- da Cunha, N.B. (2008) Expressão de Cinco Diferentes Proteínas de Interesse Farmacológico em Sementes Transgênicas de Soja [*Glycine max* L. (Merril)]. *Ciências Genômicas e Biotecnologia*. Universidade Católica de Brasília, Brasília, Vol. Mestrado, p. 123.
- Datla, R.S., Hammerlindl, J.K., Pelcher, L.E., Crosby, W.L. e Selvaraj, G. (1991) A bifunctional fusion between beta-glucuronidase and neomycin phosphotransferase: a broad-spectrum marker enzyme for plants. *Gene*, **101**, 239-246.

- de Castro, O.M., de Prado, H., Sevedo, A.C.R. e Cardoso, E.J.B.N. (1993) Avaliação da atividade de microrganismos do solo em diferentes sistemas de manejo de soja. *Scientia Agricola*, **50**, 212-219.
- de Witte, L., Nabatov, A., Pion, M., Fluitsma, D., de Jong, M.A.W.P., de Gruijl, T., Piguet, V., van Kooyk, Y. e Geijtenbeek, T.B.H. (2007) Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat Med*, **13**, 367-371.
- Denbow, D.M., Grabau, E.A., Lacy, G.H., Kornegay, E.T., Russell, D.R. e Umbeck, P.F. (1998) Soybeans transformed with a fungal phytase gene improve phosphorus availability for broilers. *Poult Sci*, **77**, 878-881.
- Ding, S.H., Huang, L.Y., Wang, Y.D., Sun, H.C. e Xiang, Z.H. (2006) High-level expression of basic fibroblast growth factor in transgenic soybean seeds and characterization of its biological activity. *Biotechnol Lett*, **28**, 869-875.
- Doyle, J.J. e Doyle, J.L. (1987) Rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochemical Bulletin*, **19**, 11-15.
- Editorial. (2007) Newer approaches to HIV prevention. *Lancet*, **369**, 615.
- Fernandez-San Millan, A., Mingo-Castel, A., Miller, M. e Daniell, H. (2003) A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify Human Serum Albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. *Plant Biotechnol J*, **1**, 71-79.
- Fischer, R., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P. e Twyman, R.M. (2004) Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr Opin Plant Biol*, **7**, 152-158.
- Frigerio, L., Foresti, O., Felipe, D.H., Neuhaus, J.-M. e Vitale, A. (2001) The C-terminal tetrapeptide of phaseolin is sufficient to target green fluorescent protein to the vacuole. *Journal of Plant Physiology*, **158**, 499-503.
- Fu, X., Duc, L.T., Fontana, S., Bong, B.B., Tinjuangjun, P., Sudhakar, D., Twyman, R.M., Christou, P. e Kohli, A. (2000) Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns. *Transgenic Res*, **9**, 11-19.
- Gelvin, S.B. (2003) Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol Mol Biol Rev*, **67**, 16-37, table of contents.
- Gelvin, S.B. (2005) Agricultural biotechnology: Gene exchange by design. *Nature*, **433**, 583-584.

- Giddings, G., Allison, G., Brooks, D. e Carter, A. (2000) Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnol*, **18**, 1151-1155.
- Giomarelli, B., Provvedi, R., Meacci, F., Maggi, T., Medagliani, D., Pozzi, G., Mori, T., McMahon, J.B., Gardella, R. e Boyd, M.R. (2002) The microbicide cyanovirin-N expressed on the surface of commensal bacterium *Streptococcus gordonii* captures HIV-1. *Aids*, **16**, 1351-1356.
- Gleba, Y., Klimyuk, V. e Marillonnet, S. (2005) Magniffection--a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine*, **23**, 2042-2048.
- Greene, W.C. e Peterlin, B.M. (2002) Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med*, **8**, 673-680.
- Hansen, G. e Wright, M.S. (1999) Recent advances in the transformation of plants. *Trends Plant Sci*, **4**, 226-231.
- Hood, E.E., Woodard, S.L. e Horn, M.E. (2002) Monoclonal antibody manufacturing in transgenic plants--myths and realities. *Curr Opin Biotechnol*, **13**, 630-635.
- Hood, E.E., Kusnadi, A., Nikolov, Z. e Howard, J.A. (1999) Molecular farming of industrial proteins from transgenic maize. *Adv Exp Med Biol*, **464**, 127-147.
- Horn, M.E., Woodard, S.L. e Howard, J.A. (2004) Plant molecular farming: systems and products. *Plant Cell Reports*, **22**, 711-720.
- Hu, Q.X., Mahmood, N. e Shattock, R.J. (2007) High-mannose-specific deglycosylation of HIV-1 gp120 induced by resistance to cyanovirin-N and the impact on antibody neutralization. *Virology*, **368**, 145-154.
- Iowa State University (1993) National Corn Handbook. Ames.
- Johansen, L.K. e Carrington, J.C. (2001) Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Plant Physiol*, **126**, 930-938.
- Kantolic, A.G. e Slafer, G.A. (2007) Development and Seed Number in Indeterminate Soybean as Affected by Timing and Duration of Exposure to Long Photoperiods after Flowering. *Annals of Botanic*, **99**, 925-933.
- Kapila, J., Rycke, R.D., Montagu, M.V. e Angenon, G. (1997) An *Agrobacterium* -mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science*, **122**, 101-108.

- Karlsson Hedestam, G.B., Fouchier, R.A., Phogat, S., Burton, D.R., Sodroski, J. e Wyatt, R.T. (2008) The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nat Rev Microbiol*, **6**, 143-155.
- Kasschau, K.D. e Carrington, J.C. (1998) A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell*, **95**, 461-470.
- Kawamura, T., Kurtz, S.E., Blauvelt, A. e Shimada, S. (2005) The role of Langerhans cells in the sexual transmission of HIV. *Journal of Dermatological Science*, **40**, 147-155.
- Klasse, P.J., Shattock, R. e Moore, J.P. (2008) Antiretroviral Drug-Based Microbicides to Prevent HIV-1 Sexual Transmission. Vol. 59, pp. 455-471.
- Kohli, A., Griffiths, S., Palacios, N., Twyman, R.M., Vain, P., Laurie, D.A. e Christou, P. (1999) Molecular characterization of transforming plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV 35S promoter and confirms the predominance of microhomology mediated recombination. *Plant J*, **17**, 591-601.
- Kohli, A., Twyman, R.M., Abranches, R., Wegel, E., Stoger, E. e Christou, P. (2003) Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Mol Biol*, **52**, 247-258.
- Krishnan, H.B. (2000) Biochemistry and molecular biology of soybean seed storage proteins. *Journal of New Seeds*, **2**, 1-25.
- Kusnadi, A.R., Hood, E.E., Witcher, D.R., Howard, J.A. e Nikolov, Z.L. (1998) Production and purification of two recombinant proteins from transgenic corn. *Biotechnol Prog*, **14**, 149-155.
- Kwon, D.S., Gregorio, G., Bitton, N., Hendrickson, W.A. e Littman, D.R. (2002) DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity*, **16**, 135-144.
- Kwong, P.D., Doyle, M.L., Casper, D.J., Cicala, C., Leavitt, S.A., Majeed, S., Steenbeke, T.D., Venturi, M., Chaiken, I., Fung, M., Katinger, H., Parren, P.W., Robinson, J., Van Ryk, D., Wang, L., Burton, D.R., Freire, E., Wyatt, R., Sodroski, J., Hendrickson, W.A. e Arthos, J. (2002) HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature*, **420**, 678-682.

- Kwong, P.D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R.W., Sodroski, J. e Hendrickson, W.A. (1998) Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*, **393**, 648-659.
- Lacorte, C. (2006) Improving and assenssing viral vectors for recombinant protein production in plants. . Wageningen University, Wageningen, Vol. PhD, p. 120.
- Lacorte, C., Ribeiro, S.G., Lohuis, D., Goldbach, R. e Prins, M. (2007) The nucleoprotein of Tomato spotted wilt virus as protein tag for easy purification and enhanced production of recombinant proteins in plants. *Protein Expression and Purification*, **55**, 17-22.
- Larrick, J.W. e Thomas, D.W. (2001) Producing proteins in transgenic plants and animals. *Current Opinion in Biotechnology*, **12**, 411-418.
- Lederman, M.M., Offord, R.E. e Hartley, O. (2006) Microbicides and other topical strategies to prevent vaginal transmission of HIV. *Nat Rev Immunol*, **6**, 371-382.
- Liu, X., Lagenaur, L.A., Simpson, D.A., Essenmacher, K.P., Frazier-Parker, C.L., Liu, Y., Tsai, D., Rao, S.S., Hamer, D.H., Parks, T.P., Lee, P.P. e Xu, Q. (2006) Engineered vaginal lactobacillus strain for mucosal delivery of the human immunodeficiency virus inhibitor cyanovirin-N. *Antimicrob Agents Chemother*, **50**, 3250-3259.
- Ma, J.K., Barros, E., Bock, R., Christou, P., Dale, P.J., Dix, P.J., Fischer, R., Irwin, J., Mahoney, R., Pezzotti, M., Schillberg, S., Sparrow, P., Stoger, E. e Twyman, R.M. (2005) Molecular farming for new drugs and vaccines. Current perspectives on the production of pharmaceuticals in transgenic plants. *EMBO Rep*, **6**, 593-599.
- Ma, J.K., Drake, P.M. e Christou, P. (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet*, **4**, 794-805.
- Mehlo, L., Mazithulela, G., Twyman, R.M., Boulton, M.I., Davies, J.W. e Christou, P. (2000) Structural analysis of transgene rearrangements and effects on expression in transgenic maize plants generated by particle bombardment. *Maydica*, **45**, 277-287.
- Molina, A., Hervas-Stubbs, S., Daniell, H., Mingo-Castel, A.M. e Veramendi, J. (2004) High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts. *Plant Biotechnol J*, **2**, 141-153.
- Moravec, T., Schmidt, M.A., Herman, E.M. e Woodford-Thomas, T. (2007) Production of Escherichia coli heat labile toxin (LT) B subunit in soybean seed and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine. *Vaccine*, **25**, 1647-1657.

- Mori, T., Barrientos, L.G., Han, Z., Gronenborn, A.M., Turpin, J.A. e Boyd, M.R. (2002) Functional homologs of cyanovirin-N amenable to mass production in prokaryotic and eukaryotic hosts. *Protein Expr Purif*, **26**, 42-49.
- Mori, T., Gustafson, K.R., Pannell, L.K., Shoemaker, R.H., Wu, L., McMahon, J.B. e Boyd, M.R. (1998) Recombinant production of cyanovirin-N, a potent human immunodeficiency virus-inactivating protein derived from a cultured cyanobacterium. *Protein Expr Purif*, **12**, 151-158.
- Murashige, T. e Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Poignard, P., Saphire, E.O., Parren, P.W.H.I. e Burton, D.R. (2001) GP120: Biologic Aspects of Structural Features. Vol. 19, pp. 253-274.
- Pusch, O., Boden, D., Hannify, S., Lee, F., Tucker, L.D., Boyd, M.R., Wells, J.M. e Ramratnam, B. (2005) Bioengineering lactic acid bacteria to secrete the HIV-1 virucide cyanovirin. *J Acquir Immune Defic Syndr*, **40**, 512-520.
- Quinn, T.C. e Overbaugh, J. (2005) HIV/AIDS in women: an expanding epidemic. *Science*, **308**, 1582-1583.
- Rademacher, T., Sack, M., Arcalis, E., Stadlmann, J., Balzer, S., Altmann, F., Quendler, H., Stiegler, G., Kunert, R., Fischer, R. e Stoger, E. (2008) Recombinant antibody 2G12 produced in maize endosperm efficiently neutralizes HIV-1 and contains predominantly single-GlcNAc N-glycans. *Plant Biotechnology Journal*, **6**, 189-201.
- Ratcliff, F.G., MacFarlane, S.A. e Baulcombe, D.C. (1999) Gene silencing without DNA. rna-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell*, **11**, 1207-1216.
- Rech, E., Vianna, G.R. e Aragão, F.J.L. (2008) High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. *Nature Protocols*, **3**, 410-418.
- Sanderson, K. (2008) Anti-HIV gel trial fails. *News@Nature*, Vol. 19 de Fevereiro.
- Sanford, J.C., Klein, T.M., Wolf, E.D. e Allen, N. (1987) Delivery of Substances Into Cells and Tissues Using a Particle Bombardment Process. Taylor & Francis, Vol. 5, pp. 27 - 37.
- Sathasivan, K., Haughn, G.W. e Murai, N. (1991) Molecular Basis of Imidazolinone Herbicide Resistance in *Arabidopsis thaliana* var *Columbia*. *Plant Physiol*, **97**, 1044-1050.

- Schwartz, O. (2007) Langerhans cells lap up HIV-1. *Nat Med*, **13**, 245-246.
- Sexton, A., Drake, P.M., Mahmood, N., Harman, S.J., Shattock, R.J. e Ma, J.K. (2006) Transgenic plant production of Cyanovirin-N, an HIV microbicide. *Faseb J*, **20**, 356-358.
- Sharma, K.K., Bhatnagar-mathur, P. e Thorpe, T.A. (2005) Genetic transformation technology: Status and problems. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant*, **41**, 102-112.
- Shattock, R.J. e Moore, J.P. (2003) Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nat Rev Microbiol*, **1**, 25-34.
- Sexton, A., Drake, P.M., Mahmood, N., Harman, S.J., Shattock, R.J. e Ma, J.K. (2006) Transgenic plant production of Cyanovirin-N, an HIV microbicide. *Faseb J*, **20**, 356-358.
- Shenoy, S.R., O'Keefe, B.R., Bolmstedt, A.J., Cartner, L.K. e Boyd, M.R. (2001) Selective interactions of the human immunodeficiency virus-inactivating protein cyanovirin-N with high-mannose oligosaccharides on gp120 and other glycoproteins. *J Pharmacol Exp Ther*, **297**, 704-710.
- Simon, V., Ho, D.D. e Abdool Karim, Q. (2006) HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet*, **368**, 489-504.
- Staub, J.M., Garcia, B., Graves, J., Hajdukiewicz, P.T., Hunter, P., Nehra, N., Paradkar, V., Schlittler, M., Carroll, J.A., Spatola, L., Ward, D., Ye, G. e Russell, D.A. (2000) High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat Biotechnol*, **18**, 333-338.
- Stoger, E., Sack, M., Perrin, Y., Vaquero, C., Torres, E., Twyman, R.M., Christou, P. e Fischer, R. (2002) Practical considerations for pharmaceutical antibody production in different crop systems. *Molecular Breeding*, **9**, 149-158.
- Stoger, E., Vaquero, C., Torres, E., Sack, M., Nicholson, L., Drossard, J., Williams, S., Keen, D., Perrin, Y., Christou, P. e Fischer, R. (2000) Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Mol Biol*, **42**, 583-590.
- Stone, A. (2002) Microbicides: a new approach to preventing HIV and other sexually transmitted infections. *Nat Rev Drug Discov*, **1**, 977-985.
- Streatfield, S.J. (2006) Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines. *Methods*, **38**, 150-157.

- The Gender and Development Group [Poverty Reduction and Economic Management (PREM)] (2004). *Integrating Gender Issues into HIV/AIDS Programs*. World Bank, Washington, DC.
- Tregoning, J.S., Nixon, P., Kuroda, H., Svab, Z., Clare, S., Bowe, F., Fairweather, N., Ytterberg, J., van Wijk, K.J., Dougan, G. e Maliga, P. (2003) Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acids Res*, **31**, 1174-1179.
- Tsai, C.C., Emau, P., Jiang, Y., Agy, M.B., Shattock, R.J., Schmidt, A., Morton, W.R., Gustafson, K.R. e Boyd, M.R. (2004) Cyanovirin-N inhibits AIDS virus infections in vaginal transmission models. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **20**, 11-18.
- Tsai, C.C., Emau, P., Jiang, Y., Tian, B., Morton, W.R., Gustafson, K.R. e Boyd, M.R. (2003) Cyanovirin-N gel as a topical microbicide prevents rectal transmission of SHIV89.6P in macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **19**, 535-541.
- Twyman, R.M., Schillberg, S. e Fischer, R. (2005) Transgenic plants in the biopharmaceutical market. *Expert Opin Emerg Drugs*, **10**, 185-218.
- Twyman, R.M., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P. e Fischer, R. (2003) Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends Biotechnol*, **21**, 570-578.
- UNAIDS/WHO. (2006) 2006 report on the global AIDS epidemic: a UNAIDS 10th anniversary special edition. Genebra.
- UNAIDS/WHO. (2007) AIDS Epidemic Update. Genebra.
- Vaucheret, H., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.-B., Mourrain, P., Palauqui, J.-C. e Vernhettes, S. (1998) Transgene-induced gene silencing in plants. Vol. 16, pp. 651-659.
- Voinnet, O. (2001) RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet*, **17**, 449-459.
- Voinnet, O. (2005) Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat Rev Genet*, **6**, 206-220.
- Voinnet, O., Pinto, Y.M. e Baulcombe, D.C. (1999) Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14147-14152.

- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. e Baulcombe, D. (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J*, **33**, 949-956.
- Witvrouw, M., Fikkert, V., Hantson, A., Pannecouque, C., O'Keefe B, R., McMahon, J., Stamatatos, L., de Clercq, E. e Bolmstedt, A. (2005) Resistance of human immunodeficiency virus type 1 to the high-mannose binding agents cyanovirin N and concanavalin A. *J Virol*, **79**, 7777-7784.
- Wyatt, R., Kwong, P.D., Desjardins, E., Sweet, R.W., Robinson, J., Hendrickson, W.A. e Sodroski, J.G. (1998) The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature*, **393**, 705-711.
- Wyatt, R. e Sodroski, J. (1998) The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science*, **280**, 1884-1888.
- Yadav, N.S., Vanderleyden, J., Bennett, D.R., Barnes, W.M. e Chilton, M.D. (1982) Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 6322-6326.
- Zeitlin, L., Olmsted, S.S., Moench, T.R., Co, M.S., Martinell, B.J., Paradkar, V.M., Russell, D.R., Queen, C., Cone, R.A. e Whaley, K.J. (1998) A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotection of the vagina against genital herpes. *Nat Biotechnol*, **16**, 1361-1364.