



Plantas produtoras de ANTICORPOS

Anticorpos produzidos por plantas de fumo para a detecção de poluentes ambientais

Janete A. Desidério Sena

Professora Doutora do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP - Campus de Jaboticabal, SP.
janete@fcav.unesp.br

Maria Helena S. Goldman

Professora Doutora do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo
mgoldman@rge.fmrp.usp.br

Fotos cedidas pelas autoras

As plantas transgênicas podem ser exploradas como uma alternativa atrativa e de custo reduzido em relação aos sistemas microbianos e animais para a produção de biomoléculas. Tal sistema de produção possui várias vantagens em potencial sobre aqueles baseados em fermentação microbiológica, células animais e animais transgênicos. Os sistemas microbianos têm uma capacidade limitada para realizar, de forma acurada, as modificações pós-traducionais de proteínas eucarióticas. A fermentação bacteriana frequentemente resulta na produção de agregados insolúveis, e custos substanciais estão envolvidos em solubilizar e remontar estes agregados em proteínas nativas. As culturas de células animais necessitam de meios de cultura caros, e o uso de animais

transgênicos levanta muitas preocupações públicas e éticas. Por outro lado, plantas transgênicas são facilmente produzidas; linhagens homocigotas podem ser rapidamente obtidas, estocadas como sementes, e posteriormente, propagadas. As plantas são simples e baratas de cultivar, não requerendo recurso especializado ou meio de cultura elaborado.

A produção de anticorpos em plantas transgênicas, publicada pela primeira vez em 1989, demonstrou o princípio da coexpressão de dois produtos gênicos recombinantes, que foram corretamente montados em uma molécula que era funcionalmente idêntica àquela originada do mamífero (Hiatt *et al.*, 1989). Desde então, muitos grupos têm procurado expressar outras moléculas de anticorpos em plantas, desde moléculas de cadeia única até anticorpos secretórios multimericos (Ma *et al.*, 1995).

Anticorpos monoclonais e suas aplicações

A resposta imune é um sistema de defesa dos vertebrados, altamente sofisticado, capaz de reconhecer substâncias estranhas ao organismo. Essas substâncias estranhas capazes de induzir uma resposta imune são chamadas de antígenos. As proteínas circulantes produzidas pelo sistema imune, e capazes de reconhecer o antígeno de forma específica são as imunoglobulinas (Ig), também denominadas anticorpos. Durante as últimas duas décadas, as pesquisas realizadas revelaram a estrutura das moléculas de anticorpos, os mecanismos complexos pelos quais essas proteínas são sintetizadas e a maneira pela qual elas se ligam aos materiais estranhos, rea-

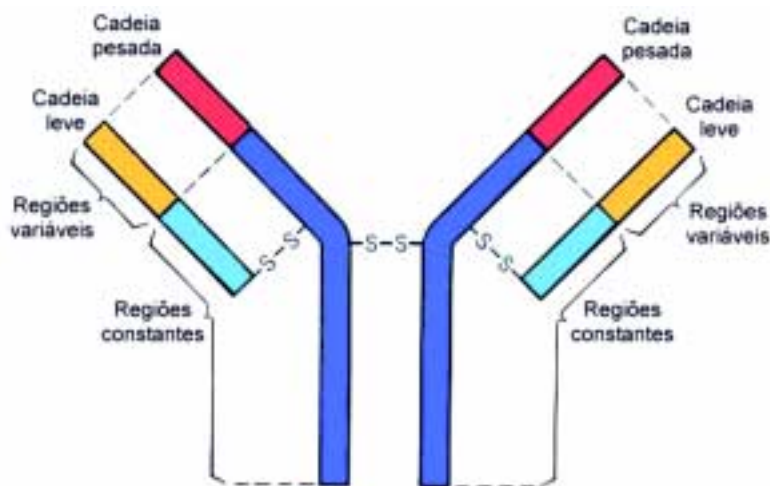
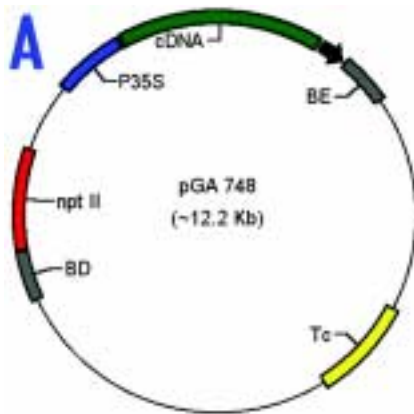


Figura 1. Modelo da estrutura de uma molécula de anticorpo típico, composta de duas cadeias polipeptídicas leves e duas cadeias pesadas. Pontes dissulfeto inter-cadeias estão indicadas. Dois sítios ativos idênticos de ligação ao antígeno estão localizados nos braços da molécula, formados pelas regiões variáveis



lizando a defesa bioquímica do organismo.

Os anticorpos possuem um núcleo estrutural comum, um tetrâmero composto de quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas idênticas. Uma cadeia leve é ligada a uma cadeia pesada por uma ligação covalente S-S (dissulfeto). Pontes dissulfeto também existem entre as duas cadeias pesadas, originando a estrutura esquema-

tizada na Figura 1.

Cada cadeia leve tem, aproximadamente, 220 aminoácidos, e cada cadeia pesada possui, aproximadamente, 440 aminoácidos. Essas cadeias possuem, na sua extremidade amino-terminal, uma região variável, composta de aproximadamente 110 aminoácidos, na qual a seqüência de aminoácidos varia bastante entre anticorpos específicos para diferentes antígenos. As regiões variáveis contêm regiões de variabilidade ainda maior - as regiões hipervariáveis - que correspondem ao sítio de ligação ao antígeno. A extremidade carboxi-terminal de cada cadeia é referida como região constante, visto que a seqüência de aminoácidos é bastante conservada em todos os anticorpos de uma determinada classe de imunoglobulinas. Além disso, as cadeias pesadas das imunoglobulinas contêm adições de carboidratos; portanto, os anticorpos são moléculas de glicoproteínas.

Baseado na seqüência de aminoácidos da região constante, as cadeias leves podem ser classificadas em dois tipos distintos: kappa (κ) ou lambda (λ). As regiões constantes kappa e lambda possuem ao redor de 30 a 40 por cento de homologia. Existem cinco tipos principais de cadeias pesadas (α , δ , ϵ , γ , μ), que correspondem às cinco classes de anticorpos (IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM). Essa classificação é baseada na seqüência de aminoácidos da região constante das cadeias pesadas. As seqüências de aminoácidos das diferentes classes possuem aproximadamente 40 por cento de homologia. Os anticorpos de diferentes classes diferem em tamanho, carga e conteúdo de carboidratos, sendo que anticorpos de algumas classes são compostos de mais de um tetrâmero (Abbas *et al.*, 1994).

O uso de anticorpos como reagentes específicos na identificação de antígenos de interesse biológico e/ou médico, é uma prática indiscutivelmente essencial nos laboratórios modernos. Atualmente, talvez seja difícil apontarmos alguma linha de estudos biológicos voltada para diagnósticos que não tenha necessitado ou que necessitará do uso de anticorpos em alguma de suas fases. A própria clínica médica moderna tem planejado esquemas de tratamento oncológico en-

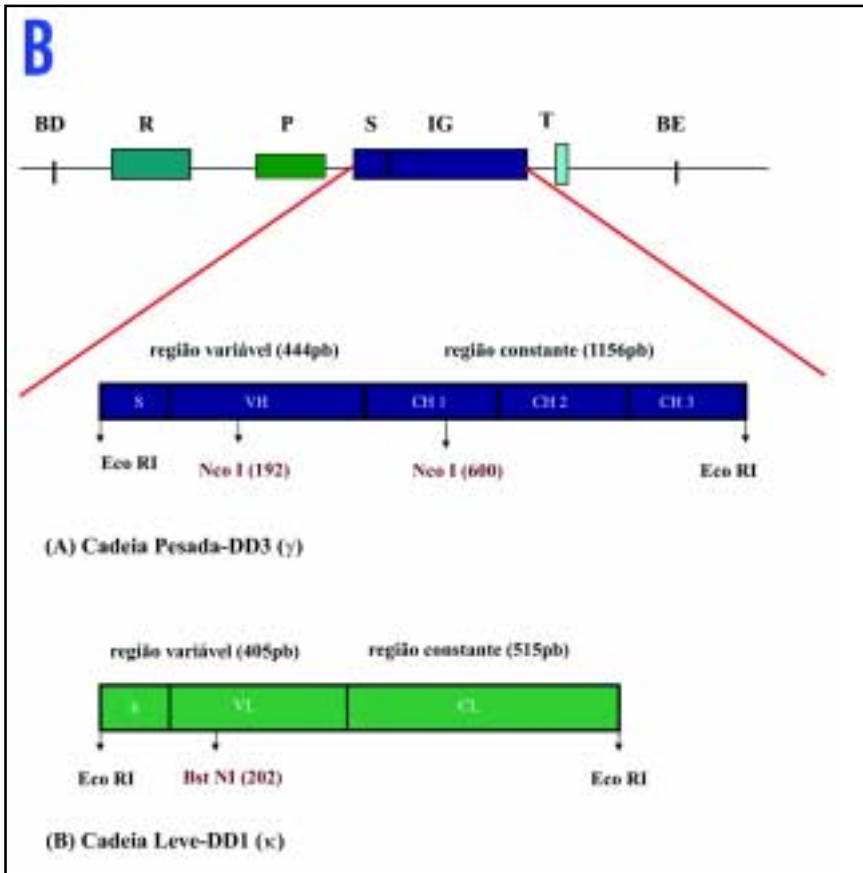


Figura 2. (A) Esquema do vetor de expressão em plantas pGA748 contendo o cDNA de interesse (cadeia leve ou pesada). BD e BE - bordas direita e esquerda do T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens*; P35S - promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor; seta preta - terminador reconhecido em células vegetais; nptII - gene que confere resistência à canamicina; Tc - gene que confere resistência à tetraciclina.

(B) cDNAs para as cadeias pesada (A) e leve (B) do anticorpo anti-dioxinas subclonados no sítio Eco RI do vetor de expressão pGA748, evidenciando as enzimas envolvidas na determinação da orientação de subclonagem. BD- Borda direita. BE- Borda esquerda da região do T-DNA. R- Gene de resistência para a Canamicina. P- Promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor. S- Seqüência sinal de camundongo. IG- Seqüência da imunoglobulina. T- Terminador. VH e VL- Domínio variável das cadeias pesada e leve. CH e CL- Domínio constante das cadeias pesada e leve

volvendo anticorpos, como é o caso das imunotoxinas, ou seja, moléculas híbridas anticorpo-toxinas voltadas para reconhecerem células tumorais e exercerem um efeito letal específico sobre essas células (Olnes *et al.*, 1989). Poderíamos comentar também sobre o uso de anticorpos ligados a isótopos radioativos, que permitiriam, após a associação com o tumor, sua localização por meio de imagens radiográficas. Além disso, anticorpos monoclonais são usados como vacinas para imunização passiva e são também empregados fora da clínica médica em uma ampla área de separações por afinidade e em numerosos kits de diagnóstico.

Portanto, devido ao alto grau de especificidade dessas moléculas, elas podem ser utilizadas como “detectoras”, tanto para ensaios qualitativos quanto quantitativos, e o campo de aplicação para tais ensaios é quase que irrestrito, dada a grande quantidade de compostos sintéticos que podem ser usados para imunizar os animais, resultando na produção de anticorpos contra muitos compostos de interesse para a medicina e outras áreas da ciência.

A maioria dos anticorpos, tais como aqueles usados em imunoenaios, são produzidos em animais e isolados a partir do soro ou fluido ascítico, ou são produzidos em cultura por células especializadas, denominadas células do hibridoma. Para isso, faz-se necessária a fusão de uma célula de mieloma de camundongo (célula tumoral de plasmócitos **B**) com um linfócito **B** normal, oriundo de um camundongo imunizado com o antígeno de interesse. A célula híbrida formada é um hibridoma, que conserva a capacidade de divisão exacerbada do mieloma juntamente com a informação para a síntese do anticorpo específico desejado. Como esse anticorpo é originário de um único clone de linfócito **B**, ficou sendo chamado de anticorpo monoclonal (Milstein, 1986). Vários problemas existem nessa tecnologia. Os hibridomas não são facilmente cultiváveis. É preciso manter toda a tecnologia de cultura de células de mamífero, onde os meios de cultura são caros, o pessoal técnico e o laboratório têm que ser altamente especializados. Mesmo assim, os hibridomas

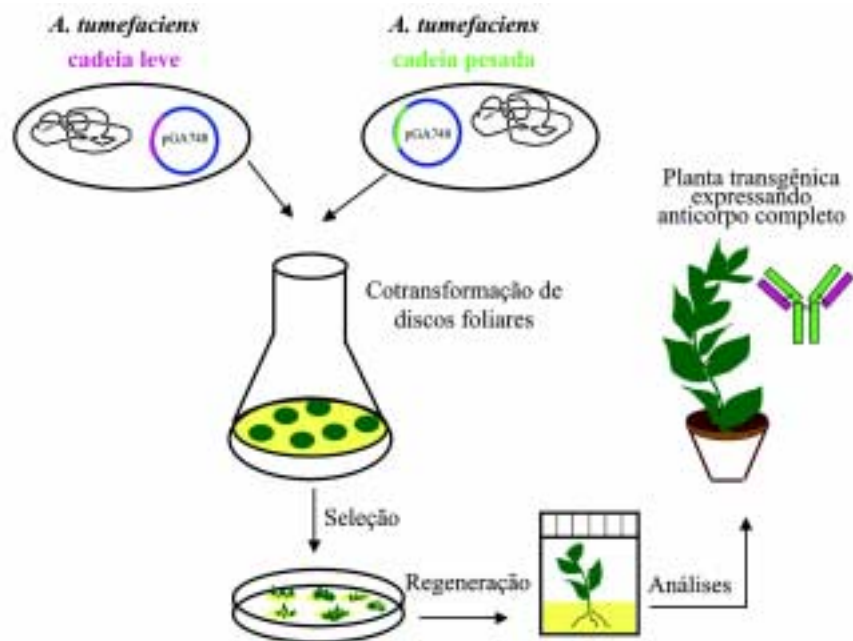


Figura 3. Processo de cotransformação evidenciando o co-cultivo dos discos foliares de *N. tabacum* com ambas as linhagens de *A. tumefaciens*, contendo os cDNAs para as cadeias leve e pesada do anticorpo

por vezes cessam de crescer em culturas, ou as mesmas são contaminadas por micoplasma, comprometendo toda uma linha de produção.

O desenvolvimento de técnicas recombinantes para a rápida clonagem de cDNAs, codificando as proteínas dos anticorpos tornou possível a expressão e a caracterização destas moléculas em sistemas heterólogos: bactérias, fungos filamentosos, leveduras, células de insetos, células de

mamíferos e de plantas, com vistas à sua produção em larga escala. Esses sistemas heterólogos representam organismos muito mais fáceis de ser manipulados, e com um rendimento em termos de anticorpos funcionais, igual ou muito maior do que o dos clássicos hibridomas.

Ao expandir a escolha dos sistemas de produção, as plantas oferecem alternativas únicas para os usuários de anticorpos, não só pela produção em

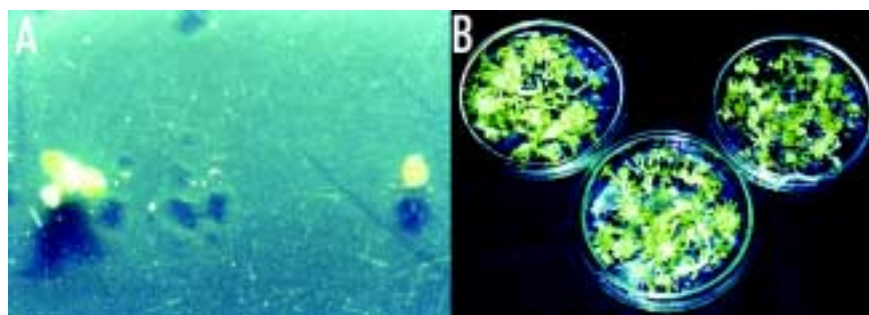


Figura 4. (A) Calos somáticos de *N. tabacum* obtidos nos experimentos de transformação mediada por *A. tumefaciens*

(B) Calos em meio de cultura para indução de parte aérea, obtidos nos três experimentos de transformação: cadeia leve, cadeia pesada e cotransformação (cadeia leve + cadeia pesada), mantidos em meio seletivo com canamicina

larga escala, mas também pela capacidade de montar anticorpos multiméricos complexos completos. Apesar de o investimento inicial de tempo e esforço ser grande se comparado com outros sistemas de expressão, a produção de anticorpos em escala agrícola ou de fermentadores pode ser visualizada, e a economia dessas abordagens abre muitas novas áreas para a aplicação potencial de anticorpos.

Aplicações dos anticorpos produzidos em plantas

Dos compostos bioativos expressos em plantas transgênicas, os anticorpos muito provavelmente são os que apresentam a maior variedade de aplicações. Plantas transgênicas têm sido geradas para produzir anticorpos monoclonais de uso terapêutico, como reagentes farmacêuticos ou para diagnósticos, ou ainda, visando a modificação de características das próprias plantas.

Quanto ao uso terapêutico dos anticorpos, a similaridade entre a maquinaria da célula animal e vegetal permite que as plantas apresentem habilidade em montar cadeias leves e pesadas, formando um anticorpo completo e funcional (Ma & Hein, 1995), que as torna excelente escolha como biorreatores para a produção desses anticorpos. Esses apresentam um particular benefício na área de imunoterapia tópica. A maioria das infecções entram pelo corpo através das mucosas: gastrointestinal, respiratória ou urogenital. Portanto, a imunização passiva dessas mucosas seria uma medida profilática efetiva para um número de doenças virais, bacterianas e fúngicas.

Um exemplo bastante interessante de anticorpo produzido em plantas e que apresenta aplicabilidade na imunização passiva é a imunoglobulina multimérica complexa SIgA, que é secretada nas superfícies das mucosas para fornecer proteção local contra toxinas e patógenos. Esse anticorpo é mais efetivo que a classe de anticorpos monoclonais IgG na defesa contra infecções bacterianas, em virtude de ligar-se polivalentemente ao antígeno e, portanto, ser mais eficiente na agregação, na avidéz de ligação, e na resistência à proteólise (Ma & Hein, 1996). A SIgA consiste de duas molé-



Figura 5. Plantas transformadas de *N. tabacum* com desenvolvimento de parte aérea e raízes

culas monoméricas de IgA unidas por um pequeno polipeptídeo J e complexada com um polipeptídeo maior, o componente secretório. Todos esses componentes foram expressados individualmente em plantas de fumo e, por sucessivos cruzamentos das plantas transgênicas e seus recombinantes filiais, houve produção de plantas nas quais todas as quatro cadeias de proteínas foram expressadas simultaneamente, resultando em uma molécula de SIgA corretamente montada e extremamente funcional (Ma *et al.*, 1995), mostrando a flexibilidade das células vegetais na montagem de moléculas complexas.

A disponibilidade de grandes quantidades de IgA secretória abre um número de novas oportunidades terapêuticas para distúrbios do sistema imune das mucosas, tais como terapias para patógenos intestinais (*E. coli* enterotoxigênica, cólera, etc.), patógenos respiratórios (rinovírus e influenza) e doenças sexualmente transmissíveis (Larrick *et al.*, 1998).

No caso de modificações causadas na própria planta, as aplicações incluem a resistência de plantas a doenças (Tavladoraki *et al.*, 1993; van Engelen *et al.*, 1994; Fecker *et al.*, 1996; Voss *et al.*, 1994; Yuan *et al.*, 2000) e a modulação das vias metabólicas da planta para produzir novas características nutricionais e de desenvolvimento (Firek *et al.*, 1993; Artsaenko *et al.*, 1995). Segundo De Jaeger *et al.* (2000) e Conrad & Manteuffel (2001), a imunomodulação pode ser definida como uma técnica molecular que permite interferir no metabolismo celular da planta, ou na infectividade do patógeno, por meio da expressão ectópica de

genes codificando anticorpos recombinantes.

Além dessas aplicações, as plantas produtoras de anticorpos poderão ser empregadas em uma potencial estratégia que apresenta um significativo impacto: a biorremediação. O seqüestro de poluentes ambientais por plantas expressando anticorpos recombinantes poderia formar a base de um sistema de biorremediação natural. Tal estratégia envolve a expressão de anticorpos recombinantes nas células vegetais e o uso dessas plantas para seqüestrar poluentes presentes no ambiente. Esse seqüestro seria específico para um poluente em particular, e poderia envolver interações de alta afinidade, de maneira que níveis muito baixos do poluente poderiam ser detectados (Hiatt & Mostov, 1993; Owen *et al.*, 1996). A praticabilidade de tal estratégia é apoiada pela demonstração de que anticorpos recombinantes podem ser dirigidos para o apoplasto da planta, e que eles são estáveis e funcionais nesse local (Firek *et al.*, 1993). O diâmetro dos poros na parede celular impõe uma restrição sobre o tamanho das moléculas que podem permeá-la livremente. Esse limite de exclusão corresponde a um peso molecular de 20 kDa para uma proteína globular. Anticorpos são moléculas muito grandes para permearem livremente a parede celular vegetal (Carpita *et al.*, 1979). Consequentemente, a expressão de um anticorpo em uma célula vegetal equivale a produzir uma capacidade de retenção e de ligação dentro de uma membrana semi-permeável. Qualquer antígeno com um peso molecular menor que 20 kDa (como alguns poluentes ambien-

tais, bioprodutos industriais, pesticidas, herbicidas) poderia ser coletado e retido por uma planta expressando um anticorpo que é funcional "in situ" e localizado no apoplasto (Firek *et al.*, 1993).

Os anticorpos produzidos pelas plantas, após purificação, poderão ainda ser utilizados na preparação de colunas de afinidade, bem como na confecção de kits de diagnósticos, tanto para uso clínico, quanto para a detecção de diversos poluentes ambientais, de forma rápida e menos onerosa.

Dioxinas: Perigosos Poluentes Ambientais

Há uma extensiva poluição de nossos ambientes por pesticidas orgânicos e outros químicos industriais. Áreas afetadas incluem lagos, rios, água potável, solo, etc. A fabricação de pesticidas, a incineração de químicos contendo halógenos, a fabricação de papel e plásticos, entre outros processos de produção de clorinas, podem resultar na produção não intencional de compostos químicos que são potenciais poluentes ambientais. Dentre estes poluentes ambientais destacam-se as dioxinas. As dioxinas são hidrocarbonetos aromáticos clorados, que incluem o 2,3,7,8 tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), um dos mais potentes agentes tóxicos. São contaminantes do ecossistema, que, mesmo em baixas doses, são altamente teratogênicos e carcinogênicos (Poland & Knutson, 1982; Stanker *et al.*, 1987; Zober *et al.*, 1990). O fato mais impressionante sobre a TCDD, além da sua teratogenicidade, é a sua potência letal. Em cobaia, a sua LD₅₀, por via oral, é de, aproximadamente, 1x10⁻⁹ mol/Kg (Poland & Kende, 1976).

A dioxina existia como contaminante no Agente Laranja, um desfoliante amplamente usado na guerra do Vietnã, nos anos 60, constituído da mistura de dois químicos conhecidos convencionalmente como 2,4,D e 2,4,5,T. Ela é que foi apontada como o agente causal dos vários sintomas descritos pelos veteranos expostos ao desfoliante. A dioxina não é solúvel no ar ou na água, mas é atraída por óleos e gorduras, acumulando-se em níveis altíssimos nos corpos das espé-



Figura 6. Plantas transgênicas de *N. tabacum* obtidas nos três experimentos independentes de transformação, com os cDNAs para o anticorpo anti-dioxina, mantidas em casa de vegetação

cies que estão no topo da cadeia alimentar, causando efeitos tóxicos que incluem anorexia, severa perda de peso, hepatotoxicidade, hepatoporfíria, lesões vasculares, atrofia do timo e supressão imune, toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento, úlceras gástricas, teratogenicidade e morte (Langer *et al.*, 1973).

A contaminação pela dioxina tem sido um fato que ultimamente tem alarmado o mundo todo. No Brasil, por exemplo, houve o relato de que a Alemanha, Holanda e Bélgica proibiram a entrada naqueles países de farelo de casca de laranja, usado como matéria-prima na produção de alimentação animal, devido à contaminação por dioxina em dois carregamentos brasileiros destinados à Europa (Folha de São Paulo de 21/4/98). No Japão, um nível recorde de dioxinas foi detectado nas cinzas eliminadas pelo incinerador de lixo do Hospital Kasori, na cidade de Chiba. A quantidade de agentes químicos cancerígenos encontrados totalizaram 19 mil picogramas/grama, o maior nível já encontrado em cinzas liberadas por incineradores (Jornal do Nikkey de 15/5/98). Na Bélgica, mais de 1.100 produtos alimentícios foram retirados das prateleiras por suspeita de contaminação por dioxina (Folha de São Paulo de 9/6/99). Portanto, há necessidade de se adotar um procedimento que seja específico para os congê-

res mais tóxicos da dioxina e que seja relativamente simples e rápido na detecção do sítio de contaminação, dados os prejuízos que esses compostos causam ao ecossistema e à saúde humana e animal (Stanker *et al.*, 1987).

As técnicas analíticas sofisticadas usadas atualmente, tais como a cromatografia gasosa e a espectroscopia de massa (Crummett, 1983), são de alto custo, e requerem laboratórios dedicados, equipamentos especializados, pessoal altamente treinado e não são disponíveis para a aplicação "in situ". O que se faz necessário, portanto, é o desenvolvimento de procedimentos alternativos que possam ser específicos, bastante sensíveis, adaptáveis para a análise de múltiplas amostras e simples de serem manipulados, para a rápida aplicação no sítio de contaminação, quantificação e retirada desses poluentes do ambiente.

Os imunoenaios preenchem esses critérios e fornecem provas efetivas na detecção de compostos importantes. Stanker *et al.* (1987) selecionaram 29 hibridomas originados de camundongos imunizados com 1-N-(adipamino)-2, 3, 7-triCDD- ligado à proteína carreadora BSA. Desses anticorpos monoclonais, cinco clones (DD-1, -3, -4, -5 e -6) reconheceram o 2,3,7,8-TCDD e apresentaram-se como reagentes comprovados na detecção de cerca de até 0,5 ng de 2,3,7,8-TCDD e outros congêneres, utilizando-se o teste

de competição por ELISA. Portanto, podem ser úteis para estudos de contaminação ambiental. Os genes para os anticorpos DD1 e DD3 tiveram suas regiões variáveis seqüenciadas por Recinos *et al.* (1994) e foram licenciados com o objetivo de detectar e quantificar a exposição à dioxina em populações humanas.

Pelos motivos expostos acima, pode-se constatar que a produção em larga escala de anticorpos contra dioxina é altamente desejável, visto que o uso de kits de detecção produzidos com esses anticorpos purificados, a partir das plantas transgênicas, bem como o potencial uso dessas próprias plantas em um sistema de biorremediação, parecem ser estratégias bastante promissoras na tentativa de eliminar do ambiente esse perigoso poluente.

Expressão de anticorpos anti-dioxinas em plantas de fumo

Com o objetivo de expressar o anticorpo anti-dioxina completo, em plantas de fumo, desenvolveu-se, em nosso laboratório, uma estratégia de clonagem envolvendo os cDNAs para as cadeias leve e pesada do anticorpo IgG1a que reconhece o TCDD. O clone pH2 (Híbridoma DD-3) contém um cDNA de 1600 pb, apresenta a seqüência líder completa e as regiões variável e constante da cadeia pesada γ (gamma) de camundongo, clonado como um fragmento *EcoRI* em pUC18 (Recinos *et al.*, 1994). O clone pLCE (Híbridoma DD-1) con-

tém um cDNA de 920 pb, contendo a seqüência líder completa e as regiões variável e constante da cadeia leve κ (kappa) de camundongo, clonado como um fragmento *EcoRI* em pUC18 (Recinos *et al.*, 1994). Ambos os clones foram gentilmente cedidos pelo Dr. Adrian Recinos III (Dept. of Internal Medicine, Univ. of TX Medical Branch, Galveston, TX.).

Os cDNAs denominados DD1 e DD3, com suas seqüências sinal nativas, (Figura 2A) foram subclonados, separadamente, sob o controle do promotor constitutivo 35S do vírus do mosaico da couve-flor (P35SCaMV) no vetor de expressão em planta pGA748, cedido gentilmente pelo Dr. Alexandre S. Conceição (Figura 2B).

O conhecimento das seqüências das regiões variáveis de ambos os cDNAs (Recinos *et al.*, 1994) e a análise dos tamanhos dos fragmentos nos ensaios de restrição permitiram a seleção de clones com a orientação correta de subclonagem para ambas as cadeias. As construções resultantes foram introduzidas em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* Petit Havana SR-1), cultivadas "in vitro", via transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Primeiramente, o gene de interesse é clonado em um cassette de expressão flanqueado pelas bordas do T-DNA. Em seguida, essa montagem é introduzida em células de *Agrobacterium tumefaciens*, por eletroporação. As células de *Agrobacterium* contendo esse vetor de expressão transferem

o T-DNA para as células vegetais durante a co-cultivação. Três experimentos independentes de transformação foram realizados em nosso laboratório: discos foliares transformados com o vetor contendo somente o gene híbrido para a cadeia leve; discos foliares transformados com o vetor contendo o gene híbrido para a cadeia pesada; e discos foliares transformados com ambas as construções, ou seja, dupla transformação simultânea ou cotransformação, conforme esquematizada na Figura 3.

Os discos foliares de todos os três experimentos foram colocados em meio de cultura contendo canamicina até o surgimento dos calos somáticos (Figura 4A), os quais foram, posteriormente, individualizados e colocados em meio de cultura contendo hormônios para indução de parte aérea (Figura 4B). As plantas resistentes à canamicina foram individualizadas e transferidas para caixas Magenta, em meio apropriado para a indução de raízes (Figura 5). Finalmente, as plantas foram levadas para vasos com terra, mantidos em casa de vegetação (Figura 6 e 7), em condições adequadas de luz, temperatura e umidade, até o momento da colheita das folhas para as análises moleculares e a extração de proteínas.

A análise do DNA genômico por Southern blot confirmou a presença dos genes esperados, e a detecção do anticorpo nas plantas transgênicas cotransformadas, através da análise imunológica por "slot blot", revelou claramente a presença da IgG anti-dioxina em quatro plantas testadas. A revelação foi feita por quimioluminescência, usando-se um anticorpo biotilado específico para IgG completa de camundongo. Nos extratos da planta controle não houve reação, mostrando a ausência do anticorpo. Esse imunoenensaio mostrou que as plantas transgênicas de fumo foram capazes de produzir o anticorpo anti-dioxina. Em nosso laboratório, no momento, estão sendo realizadas pesquisas para verificar os níveis de expressão do anticorpo nas diferentes plantas cotransformadas obtidas, bem como a segregação dos genes na geração T₁ das mesmas.

O anticorpo anti-dioxina produzido pelas plantas de fumo poderia,



Figura 7. Vista geral das plantas transgênicas de *N. tabacum* mantidas em casa de vegetação

então, ser utilizado na fabricação de um imunoenensaio para a detecção da contaminação por dioxina, após sua purificação. Uma outra intrigante possibilidade para o uso dessas plantas transgênicas, seria a biorremediação das áreas poluídas pela dioxina.

Referências Bibliográficas

- Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pober, J.S. **Cellular and Molecular Immunology**. 2nd edition, edited by W.B. Saunders Company, 457 p, 1994.
- Artsaenko, O.; Peisker, M.; Zur Nieden, U.; Fiedler, U.; Weiler, E.W.; Muntz, K.; Conrad, U. Expression of a single-chain Fv antibody against abscisic acid creates a wilty phenotype in transgenic tobacco. **Plant J.** **8**: 745-750, 1995.
- Carpita, N.; Sabulase, D.; Montezinos, D.; Helmer, D. P. Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. **Science**, **205**: 1144-1147, 1979.
- Conrad, U.; Manteuffel, R. Immunomodulation of phytohormones and functional proteins in plant cells. **TRENDS in Plant Science**, **6**: 399-402, 2001.
- Crummett, W.B. Status of analytical systems for the determination of PCDDs and PCDFs. **Chemosphere**, **12**:429, 1983.
- De Jaeger, G.; De Wilde, C.; Eeckhout, D.; Fiers, E.; Depicker, A. The antibody approach: expression of antibody genes in plants to modulate plant metabolism to obtain pathogen resistance. **Plant Mol. Biol.**, **43**:419-428, 2000.
- Fecker, L.F.; Kaufmann, A.; Commandeur, U.; Commandeur, J.; Koenig, R.; Burgermeister, W. Expression of single-chain antibody fragments (scFv) specific for beet necrotic yellow vein virus coat protein or 25 kDa protein in *Escherichia coli* and *Nicotiana benthamiana*. **Plant Mol. Biol.** **32**: 979-986, 1996.
- Firek, S.; Draper, J.; Owen, M.R.L.; Gandecha, A.; Cockburn, B.; Whitlam, G.C. Secretion of a functional single-chain Fv protein in transgenic tobacco plants and cell suspension cultures. **Plant Mol. Biol.**, **23**:861-870, 1993.
- Hiatt, A.C.; Cafferkey, R.; Bowdish, K. Production of antibodies in transgenic plants. **Nature**, **342**:76-78, 1989.
- Hiatt, A.; Mostov, K. Assembly of multimeric proteins in plant cells: characteristics and uses of plant-derived antibodies. In: **Transgenic Plants: Fundamentals and Applications**, ed. Hiatt A. Marcel Dekker Inc., New York, USA, pp.221-238, 1993.
- Langer, H.G.; Brady, T.P.; Briggs, P.R. Formation of dibenzodioxins and other condensation products from chlorinated phenols and derivatives. **Environ. Health Perspect.**, **5**:3-8, 1973.
- Larrick, J.W.; Fry, K.E. Recombinant antibodies. **Hum. Antibodies Hybridomas** **2**: 172-189, 1991.
- Ma, J.K.; Hein, M.B. Immunotherapeutic potential of antibodies produced in plants. **Trends Biotech.** **13**: 522-527, 1995a.
- Ma, J.K.; Hein, M.B. Plant antibodies for immunotherapy. **Plant Physiol.** **109**: 341-346, 1995b.
- Ma, J.K.-C.; Smith, R.; Lehner, T. Use of monoclonal antibodies in local passive immunization to prevent colonization of human teeth by *Streptococcus mutans*. **Infect. Immun.**, **55**:1274-1278, 1987.
- Ma, J.K.-C.; Hiatt, A.; Hein, M.; Vine, N.D.; Wang, F.; Stabila, P.; Van Dolleweerd, G.; Mostov, K.; Lehner, T. Generation and assembly of secretory antibodies in plants. **Science**, **268**:716-719, 1995.
- Milstein, C. Overview: monoclonal antibodies. In: **Handbook of Experimental Immunology vol.4**. Weir, D.M.(ed). Applications of Immunological Methods in Biomedical Sciences. Blackwell Sci. Publications, 1986.
- Olnes, S.; Sandvig, K.; Petersen, O.W.; Van Deurs, B. Immunotoxins - entry into cells and mechanisms of action. **Immunol. Today**, **10**:291-295, 1989.
- Owen, M.; Gandecha, A.; Cockburn, B.; Whitlam, G. The Expression of recombinant antibody fragments in plants. In: **Transgenic Plants: A Production System for Industrial and Pharmaceutical Proteins**. Edited by M.R.L. Owen and J. Pen. John Wiley & Sons Ltd. 1996.
- Poland, A.; Kende, A. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin: environmental contaminant and molecular probe. **Fed. Proc.**, **35**:2404-2411, 1976.
- Poland, A.; Knutson, J.C. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: Examination of the mechanism of toxicity. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, **22**:517-554, 1982.
- Recinos, A.; Silvey, K. J.; Ow, D. J.; Jensen, R. H.; Stanker, L.H. Sequences of cDNAs encoding immunoglobulin heavy- and light-chain variable regions from two anti-dioxin monoclonal antibodies. **Gene**, **149**:385-386, 1994.
- Stanker, L.H.; Watkins, B.; Vanderlaan, M. Monoclonal antibodies for dioxin: antibody characterization and assay development. **Toxicology**, **45**:229-243, 1987.
- Tavladoraki, P.; Benvenuto, E.; Trinca, S.; De Martinis, A.C.; Galeffi, P. Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. **Nature**, **366**:469-472, 1993.
- van Engelen, F.A.; Schouten, A.; Molthoff, J.W.; Roosien, J.; Salinas, J.; Dirkse, W.G.; Schots, A.; Bakker, J.; Gommers, F.J.; Jongsma, M.A.; et al. Coordinate expression of antibody subunit genes yields high levels of functional antibodies in roots of transgenic tobacco. **Plant Mol. Biol.** **26**:1701-1710, 1994.
- Voss, A.; Nierbach, M.; Hain, R. Reduced virus infectivity in *N. tabacum* secreting a TMV-specific full size antibody (abstract). In 1st International Meeting on **The Production of Recombinant Proteins in Plants**. University of Leicester, Leicester, July 24-27, 1994, pp 71.
- Yuan, Q.; Hu, W.; Pestka, J. J.; He, S. Y.; Hart, P. Expression of a functional antizearalenone single-chain Fv antibody in transgenic *Arabidopsis* plants. **Appl. Environ. Microbiol.**, **66**:3499-3505, 2000.
- Zober, A.; Messerer, P. Huber, P. Thirty-four-year mortality follow-up of BASF employees exposed to 2,3,7,8-TCDD after the 1953 accident. **Int. Arch. Occup. Environ. Hlth.**, **62**:139-157; 1990. †