

Plantas como potenciais biorreatores na produção de vacinas e fármacos



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Meio-Norte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 180

Plantas como potenciais biorreatores na produção de vacinas e fármacos

*Maria das Graças Freire Medeiros
Sabrina Maria Portela Carneiro
Fábio Mendonça Diniz*

Embrapa Meio-Norte
Teresina, PI
2008

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Meio-Norte

Av. Duque de Caxias, 5.650, Bairro Buenos Aires

Caixa Postal 01

CEP 64006-220 Teresina, PI

Fone: (86) 3089-9100

Fax: (86) 3089-9130

Home page: www.cpamn.embrapa.br

E-mail: sac@cpamn.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Flávio Favaro Blanco,*

Secretária Executiva: *Luísa Maria Resende Gonsalves*

Membros: *Paulo Sarmanho da Costa Lima, Fábio Mendonça Diniz, Cristina Arzabe, Eugênio Celso Emérito Araújo, Danielle Maria Machado Ribeiro Azevêdo, Carlos Antônio Ferreira de Sousa, José Almeida Pereira e Maria Teresa do Rêgo Lopes*

Supervisão editorial: *Lígia Maria Rolim Bandeira*

Revisão de texto: *Francisco de Assis David da Silva*

Normalização bibliográfica: *Orlane da Silva Maia*

Editoração eletrônica: *Erlândio Santos de Resende*

1ª edição

1ª impressão (2008): 300 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Meio-Norte

Medeiros, Maria das Graças Freire.

Plantas como potenciais biorreatores na produção de vacinas e fármacos / Maria das Graças Freire Medeiros, Sabrina Maria Portela Carneiro e Fábio Mendonça Diniz. - Teresina : Embrapa Meio-Norte, 2008.

28 p. ; 21 cm. - (Documentos / Embrapa Meio-Norte, ISSN 0104-866X ; 180).

1. Planta transgênica. 2. Biofármaco. 3. Proteína vegetal. 4. Terapêutica. 5. Imunização. I. Carneiro, Sabrina Maria Portela. II. Diniz, Fábio Mendonça. III. Embrapa Meio-Norte. IV. Título. V. Série.

CDD 615.32 (21. ed.)

© Embrapa, 2008

Autores

Maria das Graças Freire Medeiros

Farmacêutica, M.Sc. em Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN.
mgfmedeiros@hotmail.com

Sabrina Maria Portela Carneiro

Farmacêutica, especialista em Farmacologia,
Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI.
mgf@medeiros@hotmail.com

Fábio Mendonça Diniz

Engenheiro de Pesca, Ph.D. em Genética Molecular,
pesquisador da Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI.
fmd1@cpamn.embrapa.br

Sumário

Apresentação

Os recursos naturais da flora têm contribuído para o bem-estar das populações sob diferentes formas. Na antiguidade, e até hoje em muitas comunidades tradicionais, as plantas constituíam, e constituem, as principais fontes de cura para diferentes enfermidades.

Nos anos recentes, com a evolução da engenharia genética, ocorreu a manipulação dos organismos vivos em laboratório, inicialmente visando a características agronômicas para imprimir resistência e tolerância a pragas e doenças, bem como adaptação ao meio ambiente. Adicionalmente, a manipulação de plantas para a produção de substâncias heterólogas possibilitou à indústria farmacêutica a produção de proteínas de valor terapêutico de grande importância na cura de enfermidades, especialmente de doenças crônicas e ou degenerativas.

A importância das plantas como biorreatores para a síntese de biofármacos se constitui numa oportunidade ímpar para a indústria farmacêutica, tendo em vista a sua produção em larga escala e com menores custos. Além do mais, essa geração de plantas pode também produzir vacinas, que serão utilizadas na prevenção de várias doenças até então sem tratamento ou métodos profiláticos de elevada eficácia.

Este documento faz uma abordagem e mostra a importância das plantas como biorreatores na produção de proteínas terapêuticas, como fonte de biofármacos para a imunização e o tratamento de doenças.

Hoston Tomás Santos do Nascimento
Chefe-Geral da Embrapa Meio-Norte

Plantas como potenciais biorreatores na produção de vacinas e fármacos

Maria das Graças Franco Mendonça
Isabela Maria Portela Carneiro
Fabrício Mendonça Dias

| | |
|---|----|
| Plantas como potenciais biorreatores na produção de vacinas e fármacos | 9 |
| Plantas como biorreatores | 9 |
| Plantas e proteínas terapêuticas | 10 |
| Biofármacos e o mercado farmacêutico | 13 |
| Sistemas de produção | 14 |
| Microorganismos | 14 |
| Animais | 15 |
| Plantas | 15 |
| Produção de biofármacos recombinantes para hepatites .. | 16 |
| Vacinas | 17 |
| Modelos utilizados | 18 |
| <i>Nicotiana tabacum</i> (tabaco) | 18 |
| <i>Lactuca sativa</i> (alface) | 19 |
| <i>Solanum tuberosum</i> (batata) | 19 |
| <i>Musa paradisiaco</i> (banana) | 20 |
| Interferon alfa humano | 20 |
| Batata | 20 |
| Cloroplastos transgênicos | 20 |
| Conclusão | 21 |
| Referências | 22 |

Plantas como potenciais biorreatores na produção de vacinas e fármacos

*Maria das Graças Freire Medeiros
Sabrina Maria Portela Carneiro
Fábio Mendonça Diniz*

Plantas como biorreatores

As plantas têm beneficiado a população com a produção de diversos tipos de moléculas com elevado potencial terapêutico desde os primórdios da humanidade. Ao mesmo tempo em que é observada a evolução do ser humano, notam-se também as mudanças evolutivas quanto à forma de utilização e ao aproveitamento desses recursos naturais.

As plantas medicinais foram, durante muito tempo, a principal alternativa terapêutica, evoluíram para fonte de compostos ativos para a produção de medicamentos e agora estão sendo utilizadas como modelos para o desenho de novas substâncias (CALIXTO, 2000; CORRÊA, 1926; GIDDINGS et al., 2000; KNABLEIN, 2005; VAIN, 2007; YAMADA, 1998). Os avanços observados devem-se à grande revolução ocorrida na Engenharia Genética, na qual a manipulação de plantas, inicialmente voltada para o melhoramento de suas características agrônômicas, tais como, resistência a pragas e doenças, tolerância a diferentes formas de estresses biológicos e abióticos, evoluiu para a produção de substâncias heterólogas com alto potencial farmacêutico (BARTA et al., 1986; DANIELL, 1999).

O uso de plantas na busca de produtos eficazes na prevenção, no diagnóstico e mais comumente no tratamento de doenças, remonta a milhares de anos. Porém, somente há 20 anos surgiu a possibilidade de produzir proteínas heterólogas nesses organismos. A primeira proteína farmacologicamente importante feita em plantas foi o hormônio do crescimento humano, expressa em planta transgênica de tabaco (*Nicotiana tabacum*) em 1986. Essas proteínas, de valor terapêutico, produzidas em organismos transgênicos, são conhecidas como “proteínas terapêuticas” ou “biofármacos” (BARTA et al., 1986; MA; DRAKE; CHRISTOU, 2003).

Há entre 20 e 25 mil genes diferentes no genoma humano (STEIN, 2004). Uma grande parcela desses é traduzida em proteínas que possuem potencial terapêutico para o tratamento de diversas enfermidades. Atualmente, mais de 130 proteínas diferentes ou peptídeos estão aprovadas para uso clínico pela Food and Drug Administration (FDA) e há outras em desenvolvimento. Essas moléculas apresentam vantagens adicionais sobre as outras por possuírem especificidade e funções complexas, difíceis de ser mimetizadas por compostos químicos simples, e por terem ação altamente específica, tendo assim menor probabilidade de interferir nos processos biológicos, causando menos efeitos adversos e imunogenicidade e sendo, na maioria das vezes, mais bem-tolerados que metabólitos secundários (LANDER et al., 2001; PENNISI, 2003).

Buscou-se neste documento mostrar a importância das plantas como biorreatores na produção de proteínas terapêuticas, como fonte de biofármacos para a imunização e o tratamento de doenças.

Plantas e proteínas terapêuticas

As proteínas terapêuticas podem ter várias finalidades, tais como: a atividade enzimática ou regulatória; a atividade alvo específico; as vacinas e o uso em sistemas de diagnóstico (LEADER; BACA; GOLAN, 2008). Essas proteínas podem ser produzidas por meio de diversos sistemas transgênicos, isto é, procariontes, leveduras, fungos, células de mamíferos, células de insetos, animais ou plantas (COLLARES et al., 2007; DECKER; RESKI, 2007; ECKART; BUSSINEAU, 1996; HOUDEBINE, 2008; OTTONE et al., 2007).

Uma grande expectativa para a indústria farmacêutica são as plantas como biorreatores para a síntese dessas moléculas (biofármacos), pois estas possuem a vantagem de produção em larga escala, com menores custos (VAIN, 2007). Essa geração de plantas constitui um avanço proporcionado pela tecnologia do DNA recombinante (Fig. 1), na produção de vacinas gênicas ou de DNA plasmidial, utilizados na prevenção e cura de várias doenças que não apresentavam tratamento ou métodos profiláticos mais eficazes (KNABLEIN, 2005; TWYMAN; SCHILLBERG; FISCHER, 2005) (Tabela 1).

Tabela 1. Plantas como potenciais biorreatores na produção de vacinas e fármacos

| <i>Planta</i> | <i>Proteína expressa</i> | <i>Aplicação</i> | <i>Referências</i> |
|---|--|--|--|
| Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>) e Girassol (<i>Helianthus annuus</i>) | Somatotropina -Proteína de expressão nuclear | Hormônio do crescimento | Barta et al., 1986. |
| Tabaco | Antígeno de estreptococcus I e II Eritropoietina Albumina sérica humana | Cárie dentária Anemia Cirrose hepática | Ma et al. (1995) Ma et al. (1998) Kusnadi, Nikolov e Howard (1997) |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | Encefalina humana | Antiiperalgésico por atividade opiócea | Cramer, Boothe e Oishi (1999) |
| Tabaco | Proteína C humana Fator de crescimento epidermal Hemoglobina humana α e β | Anticoagulante Reparo e controle da proliferação de células Substituto sangüíneo | |
| Colza ou Canola (<i>Brassica napus</i>) | Hirudina humana | Inibidor de trombina | |
| Arroz (<i>Oryza sativa</i>) | α -Interferon humano | Tratamento da hepatites B e C | |
| Alface (<i>Lactuca sativa</i>) | Proteína recombinante comestível- HBsAg | Vacina oral contra hepatite B | Kapusta et al. (1999) |
| Tabaco | Macrófago-granulocítica | Neutropenia | |
| Arroz | Antitripsina humana | Fibrose cística, doenças do fígado e hemorragias | Giddings et al. (2000) |
| Milho (<i>Zea mays</i>) | Aprotinina humana | Inibidor de α -tripsina transplantados | |
| Tabaco e tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>) | Enzima conversora de angiotensina | Hipertensão | |

Continua...

Continuação. Tabela 1.

| <i>Planta</i> | <i>Proteína expressa</i> | <i>Aplicação</i> | <i>Referências</i> |
|-------------------------------------|--|---|--|
| Tabaco | Colágeno humano homotrimérica | Colágeno | Ruggiero et al. (2000) |
| Batata (<i>Solanum tuberosum</i>) | Lactoferrina humana | Antimicrobiano | Chong e Langridge, (2000) |
| Tabaco | Somatotropina humano, expressa no cloroplasto. | Hormônio do crescimento | Staub et al. (2000) |
| Batata | interferons humanos: α -2 β e α -8 | Tratamento das hepatites B e C Vírus da estomatite vesicular | Ohya et al. (2001) |
| Batata | Albumina sérica humana | Cirrose hepática | Fernández-San Millán et al. (2003) |
| Tabaco | Anticorpo monoclonal CB Hep1 | Anticorpo específico contra hepatite B | Valdés et al, 2003 |
| Milho | avidine, <i>b</i> -glicoronidase e tripsina | Anticorpos recombinantes | Knablein (2005) |
| Arroz | Lisosima e lactoferrina | Antimicrobiano | |
| Cevada (<i>Hordeum sativum</i>) | Lisosima e lactoferrina | Antimicrobiano | |
| Cenoura (<i>Daucus carota</i>) | Mycobacterium tuberculosis MPT64 | Produção de vacinas contra tuberculose | |
| Banana (<i>Musa paradisiaca</i>) | Antígeno-HBsAg | Vacina oral contra hepatite B | Kumar et al. (2005) |
| Tabaco e <i>Arabdopsis</i> | Antígeno-HBsAg/ proteína do HIV-1 | Vacina oral HBV/HIV-1 | Greco et al. (2007) |
| Tomate | Proteína recombinante comestível | Vacina oral contra hepatite B | Lou et al. (2007) |
| Batata | Antígeno- HBsAg | Vacina oral contra hepatite B | Sparrow et al.(2007) e Kumar, Ganapathi e Bapat (2007) |
| Tabaco | E2 do HCV | Vacina contra hepatite B | Piazzolla et al. (2005) |

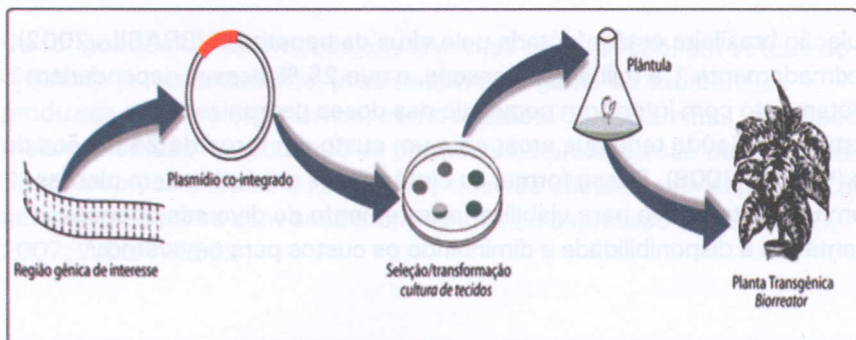


Fig. 1. Uma das estratégias utilizadas para produção de plantas transgênicas utilizadas como biorreatores na produção de proteínas heterólogas.

Biofármacos e o mercado farmacêutico

Os biofármacos são medicamentos de origem biológica, mais precisamente proteínas terapêuticas recombinantes, produtos de anticorpos monoclonais ou de ácidos nucleicos, ambos usados com fins medicinais. Representam hoje um em cada quatro novos fármacos lançados no mercado, rendendo mais de 30 bilhões de euros anualmente (WALSH, 2003a, 2003b).

Aproximadamente 165 biofármacos, entre proteínas recombinantes, anticorpos monoclonais e ácidos nucleicos, tiveram aprovação em 2004, com mercado estimado em 33 bilhões de dólares (LAWRENCE, 2005) e rendimento esperado até 2010 de 70 bilhões de dólares (PAVLOU; BELSEY, 2005; PAVLOU; REICHERT, 2004).

O biofármaco eritropoietina (EPO) é um bom exemplo do lucro desses medicamentos. A venda de todos os recombinantes EPOs rendeu 10,7 bilhões de dólares apenas em 2005. Aproximadamente 426 produtos ainda estão em fase clínica de análise. Todos têm por alvo mais de 200 doenças, incluindo o câncer, Alzheimer, doenças cardiovasculares, esclerose múltipla, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e artrite (Genomics Biotech Institute Reports Next Generation of Biopharmaceuticals Debra Weintraub, PharmD, MPA). Um outro exemplo está relacionado à hepatite C. Considerando-se que cerca de 1 % da

população brasileira está infectada pelo vírus da hepatite C (BRASIL, 2002), aproximadamente 1,9 milhão de pessoas, e que 25 % desses dependeriam do tratamento com interferon peguilado nas doses padronizadas, o Ministério da Saúde teria que arcar com um custo em torno de 24 bilhões de reais (VIEIRA, 2008). Dessa forma, os biofármacos produzidos em plantas seriam uma alternativa para viabilizar o tratamento de diversas doenças, aumentando a disponibilidade e diminuindo os custos para o governo.

Sistemas de produção

Os biofármacos podem ser produzidos usando-se a maquinaria de uma gama de sistemas transgênicos, tais como: cultura de células de mamíferos, bactérias, fungos, animais e plantas. A demanda pelos medicamentos recombinantes existentes no mercado é grande e tende a crescer nos próximos anos fazendo-se necessário analisar os sistemas atualmente utilizados, buscando novas alternativas ou melhorando as existentes, no quesito segurança e custo-benefício (GANZ et al., 1996; GIDDINGS et al., 2000; PEN, 1996).

Microorganismos

Em sistemas microbianos, a grande vantagem é a utilização de modelos bem-estabelecidos fisiológica e geneticamente. Trata-se de um modelo de simples manipulação, bem-caracterizado e de genoma conhecido (seqüenciado), além de se obter bom rendimento na produção de biofármacos. Esse sistema foi utilizado como primeiro candidato a expressar proteínas heterólogas (GORR; WAGNER, 2005).

Os microorganismos mais utilizados são bactérias e fungos. A bactéria *Escherichia coli* produz nove das 31 proteínas terapêuticas aprovadas desde 2003. Contudo, esse sistema possui várias limitações em razão principalmente das complexidades das proteínas a serem expressas que, muitas vezes, necessitam de co-fatores, ligações dissulfetos e modificações pós-traducionais, como glicosilação, essenciais a sua função, que um organismo simples como a *E. coli* não poderia realizar (STREATFIELD, 2007; WALSH, 2003a, 2006).

Os fungos são considerados bons sistemas de produção, em virtude da sua diversidade. Naturalmente, já se obtém uma gama de substâncias produzidas nesses organismos, como antibióticos e vitaminas. As espécies mais exploradas na produção de proteínas heterólogas são dos gêneros *Saccharomyces*, *Pichia* e *Hansenula*, que são eficientes na expressão de genes hospedeiros com boas propriedades de expressão (MAHMOUD, 2007; WOLF, 1996).

Animais

A produção de proteínas heterólogas em animais pode ocorrer in vitro bem como no próprio animal; utilizando-se como hospedeiro mamífero ou inseto. Em mamíferos, as células são transfectadas por meio de plasmídeos, que carregam o DNA que codifica a proteína de interesse. A linhagem de células selecionadas é então cultivada para a produção da proteína, sendo as CHO (células de ovário de hamster) as mais utilizadas, em virtude da facilidade de introdução de DNA exógeno e pela capacidade de crescimento e produção em larga escala (DYCK et al., 2003).

Já em hospedeiros insetos, observa-se bom rendimento, contudo a purificação de proteínas em cultura de larvas é difícil por apresentar um alto nível de outras proteínas de insetos e proteases larvais que podem levar à degradação do produto final. Os sistemas animais de produção de proteínas heterólogas são bastante eficientes, porém, apresentam inconveniências como a contaminação por patógenos que infectam mamíferos, o alto custo de produção, os conflitos éticos envolvendo manipulação em animais, bem como o longo tempo esperado para expressão, que pode levar anos (KNABLEIN, 2005; MAHMOUD, 2007).

Plantas

Os vegetais têm apresentado grandes vantagens para a produção de proteínas em relação aos modelos animais, em particular pela vantagem do baixo custo no processo, pelo fato de tecidos vegetais serem comestíveis e por serem mais adequados à expressão gênica (GOMORD et al., 2005).

Os três métodos mais utilizados para a expressão de proteínas recombinantes em plantas transgênicas são: o uso da biobalística ou agrobactéria para a integração da seqüência gênica de interesse no genoma nuclear da planta hospedeira; o uso de biobalística para a produção de plantas “transplastômicas”, nas quais o genoma plastídico é modificado por incorporar a seqüência recombinante; e a expressão em tecido vegetal que levam a seqüência viral recombinante (HOOD, 2004; STREATFIELD, 2007).

As plantas apresentam ainda vantagens como a redução dos riscos de contaminação por patógenos, a produção em sementes ou outros órgãos de estocagem e a fácil purificação. Também são consideradas uma fonte economicamente viável de proteínas recombinantes, uma vez que necessitam de investimento de baixo custo para a implantação do sistema, têm potencial para a produção agricultável em larga escala, além de possuírem um curto ciclo de produção comparado a animais transgênicos. O custo de produção de biofármacos em plantas é estimado em 50 vezes menor que a mesma produção por *E. coli* (GANZ et al., 1996; GIDDINGS et al., 2000; PEN, 1996; WHITELAM, 1995).

As técnicas de transformação em plantas resultam, em integração estável do DNA exógeno no genoma da planta e a linhagem da planta transformada pode ser estocada como semente em condições ambientais. As plantas possuem mecanismos de síntese bem-desenvolvidos, o que permite a construção e expressão de proteínas (MAHMOUD, 2007).

Produção de biofármacos recombinantes para hepatites

São dois os meios de produção de proteínas recombinantes em plantas transgênicas. O primeiro refere-se à integração do gene recombinante no genoma, que pode ser feita por meio de uma transformação, utilizando-se *Agrobacterium*, bombardeamento de partículas, ou outras técnicas de transformação (GLENZ; WARZECHA, 2006).

Já o segundo meio, que é a expressão transitória utilizando-se vírus, permite uma alta expressão por curto período, aproximadamente 14 dias, e ocorre com a infecção de plantas não transgênicas por vírus recombinantes, carreando seqüências gênicas de interesse (transgene)

para serem expressas no hospedeiro. Os sistemas vírus/hospedeiros mais usados são: o vírus-mosaico-do-tabaco (TMV) e o vírus-do-mosaico-do-feijão-caupi ("*Cowpea mosaic virus*", CPMV) (GIDDINGS et al., 2000).

A grande vantagem da expressão transitória é o curto ciclo, o período de transformação do gene à proteína e o alto rendimento da proteína recombinante expressa. Um problema dessa técnica é o risco ambiental. Em razão da inoculação de vírus em tecidos de plantas, devem-se usar medidas preventivas para evitar a contaminação acidental de outras plantas pelo vírus (GLENZ; WARZECHA, 2006).

Vacinas

As plantas têm sido modificadas geneticamente com o objetivo de expressar peptídeos de patógenos (antígenos) para a produção de vacinas contra doenças infecciosas de humanos e animais.

As vacinas de origem vegetal apresentam diversas vantagens, como a elevada segurança, a estabilidade e a eficácia. Podem ser produzidas no local onde há necessidade, diminuindo custos de estocagem, refrigeração e transporte. As vacinas comestíveis podem ter como veículo o próprio alimento, dispensando-se etapas de purificação, como no caso da banana (DANIELL; STREATFIELD; WYCOFF, 2001).

As plantas transgênicas apresentam a possibilidade de expressar somente uma porção selecionada do antígeno do patógeno em questão, diminuindo as reações alérgicas e outros eventos não esperados. Também é possível a produção de uma vacina polivalente com a inserção de múltiplos elementos genéticos por meio de "cross-breeding", linhagens transgênicas expressando antígenos de vários organismos patogênicos. Porém, as vacinas comestíveis apresentam uma importante limitação, que é a expressão de antígenos recombinantes em concentrações insuficientes para conferir a imunidade necessária. Outro problema a ser superado é a possibilidade da destruição das proteínas pelo suco gástrico antes da produção de uma resposta imune (DANIELL; STREATFIELD; WYCOFF, 2001; GOLDSTEIN; THOMAS, 2004).

Modelos utilizados

Os modelos de plantas mais largamente utilizados são: *Nicotiana tabacum*, utilizado como um sistema modelo de expressão, *Nicotiana bethamiana*, *Arabidopsis thaliana*, tomate, banana, batata, arroz, milho, além de muitas outras que têm apresentado vantagens (KUSNADI; NIKOLOV; HOWARD, 1997; MA; DRAKE; CHRISTOU, 2003).

Nicotiana tabacum (tabaco)

O primeiro biofármaco produzido em plantas foi o hormônio do crescimento extraído das folhas de tabaco transgênico (BARTA et al., 1986) (Tabela 1). A escolha dessa planta para expressão de muitas proteínas é por ser um modelo bem-estabelecido de transformação e expressão, com rápida produção em escala; não ser usada na alimentação; possuir um alto rendimento em biomassa, além do risco reduzido de contaminar a cadeia alimentar humana com material transgênico ou proteínas recombinantes (FISCHER et al., 2004; FISCHER; TWYMAN; GIDDINGS et al., 2000; SCHILLBERG, 2003).

Os níveis de proteínas solúveis produzidos nessa planta estão entre 2,5 % e 2,8% do total da biomassa e o rendimento da proteína extraída encontra-se entre 155 e 228 Kg ha⁻¹ (WOODLEIF et al., 1981). Entretanto, uma desvantagem desse modelo é o alto conteúdo de nicotina e outros alcalóides tóxicos, que devem ser removidos no processo de purificação (FISCHER; TWYMAN; SCHILLBERG, 2003).

Constatou-se a expressão do antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), uma importante proteína envelope do vírus da hepatite B, em folhas de tabaco (THANAVALA et al., 1995). Demonstrou-se também o acúmulo desse antígeno em sementes dessa planta (KUMAR et al., 2006). Contudo, nesse caso há necessidade de se purificar para a formulação da vacina, elevando-se o custo de produção (KUMAR; GANAPATHI; BAPAT, 2007). O HBsAg derivado de planta tem estrutura semelhante ao VLPs (virus-like particles) produzido em leveduras transgênicas que é atualmente usado na fabricação das vacinas injetáveis contra hepatite B (MASON; WARZECHA; ARNTZEN, 2002).

Alguns autores demonstraram a possibilidade de se produzir uma vacina bivalente por meio das plantas *Nicotiana tabacum* e *Arabidopsis thaliana* transformadas, expressando uma nova proteína recombinante do vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV-1) e vírus da hepatite B (HBV). É importante uma vacina combinada, uma vez que 32 % dos pacientes com HIV-1 apresentam coinfeção por HBV (GRECO et al., 2007) (Tabela 1).

Nessa espécie, também se têm concentrado esforços visando ao desenvolvimento de uma vacina contra hepatite. Piazzolla et al. (2005) testaram um peptídeo sintético derivado de uma seqüência da proteína E2 do HCV, expressa na planta transformada pelo vírus-do-mosaico-do-pepino ("*Cucumber mosaic virus*", CMV) e observaram uma resposta humoral específica em coelhos e liberação de interferon- γ , IL-12 e IL-15 em culturas de linfócitos de pacientes com hepatite C crônica. Esses resultados apontam para uma vacina efetiva contra HCV (Tabela 1).

Lactuca sativa (alface)

Assim como o tabaco, a alface é transformada para a produção de proteínas recombinantes em suas folhas. Seu mais importante uso tem sido na expressão de uma subunidade do vírus da hepatite B para produção de vacinas (FISCHER; TWYMAN; SCHILLBERG, 2003; KAPUSTA et al., 1999) (Tabela 1).

Solanum tuberosum (batata)

A batata tem grande importância na alimentação mundial. A utilização da batata como biorreator se deve ao interesse no desenvolvimento de vacinas de uso oral. A primeira candidata a vacina derivada de planta será produzida a partir de HBsAg de batata e tabaco (GLENZ; WARZECHA, 2006). As vantagens para a produção de HBsAg são a transformação genética eficiente por *Agrobacterium tumefaciens*, a propagação clonal e o alto potencial de estocagem. Nessa espécie, obteve-se alto nível de expressão de HBsAg (16 μg por grama do tubérculo) de batata. A desvantagem é a necessidade do cozimento para torná-la palatável, o que pode degradar o antígeno (KUMAR; GANAPATHI; BAPAT, 2007; SPARROW et al., 2007) (Tabela 1).

Musa paradisiaca (banana)

A banana é considerada um excelente biorreator para a produção de vacina comestível contra hepatite B, em razão da boa aceitação por crianças e adultos, principalmente por sua palatabilidade e digestibilidade, podendo ser administrada em sua forma natural ou de purê. Sua produção ocorre durante todo o ano nas regiões tropicais onde há uma maior necessidade de vacinas de baixo custo. A expressão de HBsAg foi constatada em frutos de bananeira transgênica, a um nível de expressão de 1 ng/g no fruto e 38 ng/g de peso nas folhas. Há necessidade, portanto aumentar os níveis de expressão no fruto (KUMAR et al., 2005). (Tabela 1)

Interferon alfa humano

Batata

Dois subtipos de interferons humanos, a-2b e a-8 (HuIFN-a2b e HuIFN-a8) foram introduzidos no genoma de plantas de batata (*Solanum tuberosum*) usando-se *Agrobacterium* para a transformação. Após a constatação da transcrição e da tradução, suas atividades foram testadas em linhagem de células amnióticas humanas, observando-se inibição do vírus da estomatite vesicular, porém, também se observou toxicidade. Essa foi a primeira demonstração da atividade biológica de citocinas animais com aplicação terapêutica expressa em plantas de batata transgênica (OHYA et al., 2001) (Tabela 1).

Cloroplastos transgênicos

A construção de cloroplastos transgênicos é uma opção interessante para expressão de proteínas exógenas. Por meio dessa técnica é possível a integração de genes dentro do genoma do cloroplasto, como no tabaco, formando cerca de 10 mil cópias por célula e resultando no acúmulo de proteínas recombinantes acima de 47 % das proteínas solúveis (DECOSA et al., 2001).

A transgenia do cloroplasto é feita usando-se duas seqüências flanquiadoras, que, por meio da recombinação homóloga, inserem DNA exógeno no espaço entre os genes funcionais do genoma do cloroplasto. Os cloroplastos podem processar proteínas eucariontes, enovelando-as corretamente e acrescentando as pontes dissulfetos necessárias (LOU et al., 2007). A produção de proteínas exógenas por cloroplastos transgênicos deverá eliminar a produção de proteínas farmacêuticas em organismos recombinantes. Atualmente, esse processo é realizado *in vitro* e é bastante oneroso. Um exemplo é a produção comercial da insulina humana por *E. coli*, em que 60 % do custo ocorre em razão do processamento *in vitro* (DANIELL; STREATFIELD; WYCOFF, 2001).

Conclusão

A utilização de plantas transgênicas para a expressão de proteínas vem sendo uma estratégia atraente para a produção de biofármacos. Quanto maior o conhecimento genômico das espécies agrônômicas, maior a possibilidade de aplicação das plantas pela manipulação genética, como biofábricas. Muitas substâncias já se tornaram medicamentos aprovados para comercialização e outras estão em fase clínica de estudo, aproximando a realidade do objetivo de um tratamento efetivo para as mais diversas enfermidades, especialmente as doenças crônicas e/ou degenerativas, como artrite, câncer, AIDS e hepatites virais.

As plantas apresentam muitas vantagens em relação a outros tipos de biorreatores, como a capacidade de expressão de proteínas de eucariontes; o curto período de produção; o baixo custo; o elevado rendimento em biomassa e o menor risco de contaminação com patógenos humanos e endotoxinas. As plantas geneticamente modificadas, não com o intuito de produzir alimentos e suprir a demanda mundial, mas sim gerar substâncias terapêuticas (vacinas e fármacos), tendem a alcançar maior credibilidade e aceitação por parte da sociedade, uma vez que o foco da manipulação genética é a recuperação/manutenção da saúde do ser humano. Em virtude da gravidade de diversas doenças e do impacto econômico para a saúde pública, a imunização também se torna uma alternativa viável para o controle de enfermidades crônicas, e a busca por vacinas eficazes tem demonstrado o grande potencial das plantas como

biorreatores. É importante ressaltar que esse conhecimento da utilização das plantas como fábricas de biomoléculas recombinantes de natureza terapêutica provém do esforço da biotecnologia, que outrora era vista com algum descrédito, mas hoje mostra com clareza sua importância na sociedade.

Referências

- BARTA, A.; SOMMERGRUBER, K.; THOMPSON, D.; HARTMUTH, K.; MATZKE, M. A.; MATZKE, A. J. M. The expression of a nopaline synthase human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 6, n. 5, p. 347-357, Sep. 1986.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Hepatites Virais. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas hepatite viral crônica C: interferon-alfa, interferon-alfa peguilado, ribavirina**. Brasília, DF, 2002. (Série C. Projetos, Programas e Relatórios). Disponível em: http://www.emv.fmb.unesp.br/docs/protocolo_hepC.pdf.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.
- CHONG, D. K. X.; LANGRIDGE, W. H. R. Expression of full length bioactive antimicrobial human lactoferrin in potato plants. **Transgenic Research**, Philadelphia, v. 9, n. 1, p. 71-78, Feb. 2000.
- COLLARES, T. F.; SEIXAS, K.; CAMPOS, V. F.; CAVALCANTI, P. V.; DESCHAMPS, J. C. Animais transgênicos biorreatores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 4, p. 462-478, 2007.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926. 6 v.
- CRAMER, C. L.; BOOTHE, J. G.; OISHI, K. K. Transgenic plants for therapeutic proteins: linking upstream and downstream technologies. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 240, p. 95-118, 1999.
- DANIELL, H. GM crops: public perception and scientific solution. **Trends in Plant Science**, Oxford, Inglaterra, v. 4, n. 12, p. 467-469, Dec. 1999.

- DANIELL, H.; STREATFIELD, S. J.; WYCOFF, K. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, Inglaterra, v. 6, n. 5, p. 219-226, May 2001.
- DECKER, E. L.; RESKI, R. Moss bioreactors producing improved biopharmaceuticals. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 18, n. 5, p. 393-398, Oct. 2007.
- DE COSA, B.; MOAR, W.; LEE, S. B.; MILLER, M.; DANIELL, H. Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. **Nature Biotechnology**, New York, v. 19, n. 1, p. 71-74, Jan. 2001.
- DYCK, M. K.; LACROIX, D.; POTHIER, F.; SIRARD, M. A. Making recombinant proteins in animals - different systems, different applications. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 21, n. 9, p. 394-399, Sep. 2003.
- ECKART, M. R.; BUSSINEAU, C. M. Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 7, n. 5, p. 525-530, Oct. 1996.
- FERNÁNDEZ-SAN MILLÁN, A.; MINGO-CASTEL, A.; MILLER, M.; DANIELL, H. A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify Human Serum Albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, Inglaterra, v. 1, n. 2, p. 71-79, Mar. 2003.
- FISCHER, R.; TWYMAN, R. M.; SCHILLBERG, S. Production of antibodies in plants and their use for global health. **Vaccine**, Kidlington, Inglaterra, v. 21, n. 7/8, p. 820-825, Jan. 2003.
- FISCHER, R.; STOGER, E.; SCHILLBERG, S.; CHRISTOU, P.; TWYMAN, R. M. Plant-based production of biopharmaceuticals. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, v. 7, n. 2, p.152-158, Apr. 2004.
- GANZ, P. R.; DUDANI, A. K.; TACKABERRY, E. S.; SARDANA, R.; SAUDER, C.; CHENG, X.; ALTOSAAR, I. Expression of human blood proteins in transgenic plants: the cytokine GM-CSF as a model protein. In: OWEN, M. R. L.; PEN, J. (Ed.). **Transgenic plants: a production system for industrial and pharmaceutical proteins**. New York: John Wiley and Sons, 1996. p. 281-297.
- GIDDINGS, G.; ALLISON, G.; BROOKS, D.; CARTER, A. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, n. 11, p.1151-1155, Nov. 2000.

- GLENZ, K.; WARZECHA, H. New medicinal plants for the production of vaccines. **Journal of Consumer Protection and Food Safety**, Berlin, v. 1, n. 1, p. 126-130, Nov. 2006.
- GOLDSTEIN, D. A.; THOMAS, J. A. Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants. **QJM: An International Journal of Medicine**, Oxford, v. 97, n. 11, p. 705-716, 2004.
- GOMORD, V.; CHAMBERLAIN, P.; JEFFERIS, R.; FAYE, L. Biopharmaceutical production in plants: problems, solutions and opportunities. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 23, n. 11, p. 559-565, Nov. 2005.
- GORR, G.; WAGNER, S. Humanized glycosylation: production of biopharmaceuticals in a moss bioreactor. In: KNABLEIN, J. (Ed.). **Modern Biopharmaceuticals**. Weinheim: Wiley Verlag, 2005. pt. 4, cap. 7, p. 919-929.
- GRECO, R.; MICHEL, M.; GUETARD, D.; CERVANTES-GONZALEZ, M.; PELUCCHI, N.; WAIN-HOBSON, S.; SALA, F.; SALA, M. Production of recombinant HIV-1/HBV virus-like particles in *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants for a bivalent plant-based vaccine. **Vaccine**, St. Louis, v. 25, n. 49, p. 8228-8240, Nov. 2007.
- HOOD, E. E. Bioindustrial and biopharmaceutical products from plants. In: INTERNATIONAL CROP SCIENCE CONGRESS, 4., 2004, Brisbane, Australia. **New directions for a diverse planet: proceedings**. Gosford, Australia: The Regional Institute, 2004. 1 CD ROM. Disponível em: http://www.cropscience.org.au/icsc2004/pdf/1955_hoode.pdf.
- HOUBEINE, L. M. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. **Sang Thrombose Vaisseaux**, Montrouge, v. 20, n. 1, p. 43-50, jan. 2008.
- KAPUSTA, J.; MODELSKA, A.; FIGLEROWICZ, M.; PNIEWSKI, T.; LETELLIER, M.; LISOWA, O.; YUSIBOV, V.; KOPROWSKI, H.; PLUCIENNICZAK, A.; LEGOCKI, A. B. A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 13, n. 13, p. 1796-1799, Oct. 1999.
- KNABLEIN, J. Plant-based expression of biopharmaceuticals. In: MEYERS, R. A. (Ed.). **Encyclopedia of molecular cell biology and molecular medicine**. 2. ed. New York: Wiley, 2005. v. 10, p. 489-510.
- KUMAR, G. B. S.; GANAPATHI, T. R.; REVATHI, C. J.; SRINIVAS, L.; BAPAT, V. A. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic banana plants. **Planta**, Berlin, v. 222, n. 3, p. 484-493, Oct. 2005.

- KUMAR, G. B. S.; GANAPATHI, T. R.; BAPAT, V. A. Production of hepatitis B surface antigen in recombinant plant systems: an update. **Biotechnology Progress**, New York, v. 23, n. 3, p. 532-539, 2007.
- KUMAR, G. B. S.; SRINIVAS, L.; GANAPATHI, T. R.; BAPAT, V. Hepatitis B surface antigen expression in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants using four different expression cassettes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Berlin, v. 84, n. 3, p. 315-323, Mar. 2006.
- KUSNADI, A. R.; NIKOLOV, Z. L.; HOWARD, J. A. Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations. **Biotechnology and Bioengineering**, Malden, v. 56, n. 5, p. 473-484, Dec. 1997.
- LANDER, E. S.; LINTON, L. M.; BIRREN, B.; NUSBAUM, C.; ZODY, M. C. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, London, v. 409, n. 6822, p. 860-921, Feb. 2001.
- LAWRENCE, S. Biotech drug market steadily expands. **Nature Biotechnology**, London, v. 23, n. 12, p. 1466, Dec. 2005.
- LEADER, B.; BACA, Q. J.; GOLAN, D. E. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 7, n. 1, p. 21-39, Jan. 2008.
- LOU, X. M.; YAO, Q. H.; ZHANG, Z.; PENG, R. H.; XIONG, A. S.; WANG, H. K. Expression of the Human Hepatitis B Virus Large Surface Antigen Gene in Transgenic Tomato Plants. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 14, n. 4, p. 464-469, Apr. 2007.
- MA, J. K. C.; DRAKE, P. M. W.; CHRISTOU, P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 4, n. 10, p. 794-805, Oct. 2003.
- MA, J. K. C.; HIATT, A.; HEIN, M.; VINE, N. D.; WANG, F.; STABILA, P.; DOLLEWEERD, C. van; MOSTOV, K.; LEHNER, T. Generation and assembly of secretory antibodies in plants. **Science**, Washington, v. 268, n. 5211, p. 716-719, May 1995.
- MA, J. K. C.; HIKMAT, B. Y.; WYCOFF, K.; VINE, N. D.; CHARGELEGUE, D.; YU, L.; HEIN, M. B.; LEHNER, T. Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. **Nature Medicine**, London, v. 4, n. 5, p. 601-606, 1998.
- MAHMOUD, K. Recombinant Protein Production: Strategic Technology and a Vital Research Tool, **Research Journal of Cell and Molecular Biology**, Egypt, v. 1, n. 1, p. 9-22, 2007.

MASON, H. S.; WARZECHA, H.; MOR, T.; ARNTZEN, C. J. Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. **Trends in Molecular Medicine**, St. Louis, v. 8, n. 7, p. 324-329, July 2002.

OHYA, K.; MATSUMURA, T.; OHASHI, K.; ONUMA, M.; SUGIMOTO, C. Expression of two subtypes of human IFN- α in transgenic potato plants. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, New Rochelle, v. 21, n. 8, p. 595-602, Aug. 2001.

OTTONE, S.; NGUYEN, X.; BAZIN, J.; BÉRARD, C.; JIMENEZ, S.; LETOURNEUR, O. Expression of hepatitis B surface antigen major subtypes in *Pichia pastoris* and purification for in vitro diagnosis. **Protein Expression and Purification**, St. Louis, v. 56, n. 2, p. 177-188, Dec. 2007.

PAVLOU, A. K.; BELSEY, M. J. The therapeutic antibodies market to 2008. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, St. Louis, v. 59, n. 3, p. 389-396, Apr. 2005.

PAVLOU, A. K.; REICHERT, J. M. Recombinant protein therapeutics: success rates, market trends and values to 2010. **Nature Biotechnology**, New York, v. 22, n. 12, p. 1513-1519, 2004.

PEN, J. Comparison of host systems for the production of recombinant proteins. In: OWEN, M. R. L.; PEN, J. (Ed.). **Transgenic plants: a production system for industrial and pharmaceutical proteins**. Chichester: John Wiley & Sons, 1996. p. 149-167.

PENNISI, E. Bioinformatics: gene counters struggle to get the right answer. **Science**, Washington, v. 301, n. 5636, p. 1040-1041, Aug. 2003.

PIAZZOLLA, G.; NUZZACI, M.; TORTORELLA, C.; PANELLA, E.; NATILLA, A.; BOSCIA, D.; DE STRADIS, A.; PIAZZOLLA, P.; ANTONACI, S. Immunogenic properties of a chimeric plant virus expressing a Hepatitis C Virus (HCV) - derived epitope: new prospects for an HCV vaccine. **Journal of Clinical Immunology**, Heidelberg, v. 25, n.2, p. 142-152, Mar. 2005.

RUGGIERO, F.; EXPOSITO, J. Y.; BOURNAT, P.; GRUBER, V.; PERRET, S.; COMTE, J.; OLAGNIER, B.; GARRONE, R.; THEISEN, M. Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 469, n. 1, p. 132-136, Mar. 2000.

SPARROW, P. A. C.; IRWIN, J. A.; DALE, P. J.; TWYMAN, R. M.; MA, J. K. C. Pharma-Planta: road testing the developing regulatory guidelines for plant-made pharmaceuticals. **Transgenic Research**, London, v. 16, n. 2, p. 147-161, Apr. 2007.

- STAUB, J. M.; GARCIA, B.; GRAVES, J.; HAJDUKIEWICZ, P. T. J.; HUNTER, P.; NEHRA, N.; PARADKAR, V.; SCHLITTLER, M.; CARROLL, J. A.; SPATOL, A. L.; WARD, D.; YE, G.; RUSSELL, D. A. High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, n. 3, p. 333-338, Mar. 2000.
- STEIN, L. D. Human genome: end of the beginning. **Nature**, London, v. 431, n. 7011, p. 915-916, Mar. 2004.
- STREATFIELD, S. J. Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 2-15, Jan. 2007.
- THANAVALA, Y.; YANG, Y. F.; LYONS, P.; MASON, H. S.; ARNTZEN, C. Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - PNAS**, Washington, v. 92, n. 8, p. 3358-3361, Apr. 1995.
- TWYMAN, R. M.; SCHILLBERG, S.; FISCHER, R. Transgenic plants in the biopharmaceutical market. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, London, v. 10, n. 1, p. 185-218, Feb. 2005.
- VAIN, P. Thirty years of plant transformation technology development. **Plant Biotechnology Journal**, Malden, v. 5, n. 2, p. 221-229, Mar. 2007.
- VIEIRA, F. S. Ações judiciais e direito à saúde: reflexão sobre a observância aos princípios do SUS. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 365-369, abr. 2008.
- WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks – 2003. **Nature Biotechnology**, New York, v. 21, n. 8, p. 865-870, Aug. 2003a.
- WALSH, G. **Biopharmaceuticals, biochemistry and biotechnology**. 2. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2003b. 551 p.
- WHITELAM, G. C. The production of recombinant proteins in plants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 68, n. 1, p. 1-9, May 1995.
- WOLF, K. (Ed.). **Nonconventional yeasts in biotechnology: a handbook**. Berlin: Springer-Verlag, 1996. 619 p.
- WOODLEIF, W. G.; CHAPLIN, J. F.; CAMPBELL, C. R.; DEJONG, D. W. Effect of variety and harvest treatments on protein yield of close grown tobacco. **Tobacco Science**, New York, v. 25, p. 40-43, 1981.
- YAMADA, C. S. B. Fitoterapia: sua história e importância. **Revista Racine**, São Paulo, v. 8, n. 43, p. 50-51, 1998.

Embrapa

Meio-Norte

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

