



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES
POR PLANTAS TRANSGÊNICAS**

Trabalho submetido por
Ana Patrícia da Costa Filipe
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Outubro de 2015



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES POR PLANTAS TRANSGÊNICAS

Trabalho submetido por
Ana Patrícia da Costa Filipe
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Mestre Ana Maria Pintão

Outubro de 2015

AGRADECIMENTOS

À minha família, amigos e conhecidos por todo o apoio.

À Mestre Eng^a Ana Pintão pela motivação e orientação.

RESUMO

O desenvolvimento da tecnologia de ADN recombinante permite a introdução de genes exógenos de interesse em células de diferentes sistemas de expressão com o fim de obtenção de características desejáveis. As plantas transgênicas têm sido desenvolvidas para o melhoramento agrícola, para a produção de alimentos funcionais, e mais recentemente, para a produção de proteínas recombinantes.

A utilização de técnicas de cultura de células vegetais, na biotecnologia vegetal, inclui os processos de embriogênese, organogênese e calogênese. A embriogênese e a organogênese permitem a regeneração da planta inteira, a sua transferência para o campo ou estufas e produção *in vivo* de proteínas recombinantes com finalidade terapêutica. A calogênese permite a formação de suspensões de células vegetais com posterior transferência para biorreatores para a produção *in vitro* de proteínas recombinantes.

O sistema de expressão de proteínas recombinantes utilizando plantas transgênicas apresenta vários benefícios, surgindo em vários casos, como um sistema de expressão preferencial. Atualmente diversas citoquinas, anticorpos, vacinas, insulina, enzimas e proteínas do sangue são expressas em plantas transgênicas apresentando eficácia e com custos de produção mais reduzidos. Estão a decorrer diversos ensaios clínicos e algumas proteínas recombinantes produzidas por plantas transgênicas estão já em comercialização.

Palavras-chave: Plantas transgênicas, Proteínas recombinantes humanas, Sistemas de produção vegetais, Proteínas farmacêuticas

ABSTRACT

The development of the recombinant DNA technology allows the introduction of exogenous genes of interest in different expression systems cells to obtain desirable features. Therefore, transgenic plants emerged for improving agriculture, production of functional foods and more recently for the expression of recombinant human proteins.

The use of cell culture techniques of Plant Biotechnology includes embryogenesis, organogenesis and calogenesis. Embryogenesis and organogenesis permits regeneration of the entire plant and transfer it into fields or greenhouses for *in vivo* production of recombinant proteins for clinical uses. Calogenesis and suspension cell culture, later transferred to bioreactors, allows *in vitro* production of recombinant proteins.

Transgenic plants as a expression system of recombinant proteins presents several benefits arising, in some cases, as a preferred expression system. Currently, several cytokines, antibodies, antigens, insulin, enzymes and blood proteins, are expressed in transgenic plants presenting efficient activity and reduction of production costs. There are several clinical trials going on and some recombinant proteins from transgenic plants are already in the market.

Keywords: Transgenic plants, Recombinant human proteins, Plant-based production systems, Pharmaceutical proteins

ÍNDICE GERAL

Índice de figuras.....	11
Índice de tabelas.....	13
Lista de abreviaturas.....	15
1. Introdução.....	17
1.1. Plantas transgênicas	17
1.1.1. Aplicações	18
1.1.2. Importância económica.....	20
1.1.3. Regulamentação aplicável.....	22
1.1.4. Situação atual das plantas transgênicas.....	23
1.2. Produção biotecnológica de proteínas recombinantes farmacêuticas.....	25
1.2.1. Comparação com outros sistemas de produção de proteínas recombinantes.....	26
1.2.2. Eficácia, identidade e funcionalidade das proteínas recombinantes produzidas por plantas transgênicas.....	28
1.3. Objetivos.....	30
2. Desenvolvimento.....	31
2.1 Técnicas <i>in vitro</i> de culturas vegetais.....	32
2.1.1. Embriogénese e Organogénese.....	34
2.1.2. Calogénese e estabelecimento de suspensões.....	35
2.1.3. Produção e cultura de protoplastos.....	37
2.2. Transgênese.....	39
2.2.1. Origem dos genes.....	39
2.2.2. Construção genética	40
2.2.3. Transformação de plantas.....	41
2.2.3.1. Transformação direta.....	42
2.2.3.2. Transformação indireta.....	43
2.2.3.3. Plantas transplastómicas.....	46
2.2.4. Seleção das plantas transgênicas.....	46
2.3. Sistemas de produção vegetais.....	47
2.3.1. Produção <i>in vivo</i> de proteínas recombinantes.....	48
2.3.2. Produção <i>in vitro</i> de proteínas recombinantes.....	49

3. Produção de proteínas farmacêuticas por plantas transgênicas.....	52
3.1. Citoquinas.....	52
3.2. Proteínas do sangue.....	54
3.3. Anticorpos.....	55
3.4. Vacinas.....	57
3.5. Insulina.....	59
3.6. Outras proteínas recombinantes terapêuticas.....	61
4. Avaliação e comparação.....	62
4.1. Comparação com proteínas farmacêuticas de outras origens.....	62
4.2. Avaliação de riscos da utilização de plantas transgênicas para a produção de proteínas farmacêuticas.....	64
4.2.1. Questões sociais e éticas.....	65
5. Conclusões.....	67
Bibliografia.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura nº 1 - Arroz com expressão de β -caroteno.

Figura nº 2 - Países produtores de plantas transgênicas.

Figura nº 3 - Estrutura da cadeia longa do glucano em plantas e humanos.

Figura nº 4 - Produção do antígeno de superfície do vírus da hepatite B em *calli* de alface transgênica e sua regeneração *in vitro*.

Figura nº 5 - *Calli* e suspensão celular de *Rauvolfia serpentina* L.

Figura nº 6 - Protoplastos de células de *Citrus limon* L.

Figura nº 7 - Representação esquemática da construção genética de tabaco transgênico.

Figura nº 8 - Aparelho de biolística ou bombardeamento de micropartículas.

Figura nº 9 - Representação do plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens*.

Figura nº 10 - Doença coroa-de-galha provocada pela bactéria *Agrobacterium tumefaciens*.

Figura nº 11 - A - Raízes pilosas em amendoim transgênico; B - Raízes normais em amendoim.

Figura nº 12 - A proteína interleuquina-10 evidenciada pela presença da proteína verde fluorescente em células vegetais de tabaco transgênico.

Figura nº 13 - Biorreator de agitação mecânica.

Figura nº 14 - Biorreator de recirculação de ar.

Figura nº 15 - Biorreator de recirculação de ar com suspensão de *Salvia cinnabarina*.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela nº 1 - Cronologia da produção de proteínas recombinantes por plantas transgênicas.

Tabela nº 2 - Exemplos de proteínas recombinantes produzidas por plantas transgênicas em diferentes fases de ensaios clínicos.

Tabela nº 3 - Comparação dos diferentes sistemas de expressão de proteínas recombinantes farmacêuticas.

Tabela nº 4 - Exemplos de citocinas expressas em plantas transgênicas.

Tabela nº 5 - Exemplos de proteínas do sangue expressas por plantas transgênicas.

Tabela nº 6 - Exemplos de anticorpos produzidos em tabaco transgênico.

Tabela nº 7 - Exemplos de vacinas produzidas por plantas transgênicas.

Tabela nº 8 - Exemplos de produção de insulina recombinante humana em várias plantas transgênicas.

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D - ácido 2,4-diclorofenoxiacético

AIA -Ácido indolacético

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AgshB - Antígeno de superfície Hepatite B

ARN - Ácido ribonucleico

BAR - Fosfinotricina acetiltransferase

EMA - Agência Europeia de Avaliação dos Medicamentos

EPA - Environmental Protection Agency

EUA – Estados Unidos da América

FAO – Organização da Agricultura e da Alimentação

FDA - Food and Drug Administration

GM-CSF - Fator estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos

GUS - β -glucuronidase

IgA – Imunoglobulina A

IgG - Imunoglobulina G

INF – Interferão

MS - Meio Murashige e Skoog

NAA - Ácido naftalenoacético

NPT II - Neomicina fosfotransferase II

OGM – Organismo Geneticamente Modificado

OMS - Organização Mundial de Saúde

PEG –Polietilenoglicol

PCR - Polymerase Chain Reaction

PVP - Polivinilpirrolidona

ScFv - Fragmentos de cadeia única

STR – "Stirred Tank Reactor"

USDA – United States Department of Agriculture

1. INTRODUÇÃO

1.1. PLANTAS TRANSGÊNICAS

Os organismos geneticamente modificados (OGMs) englobam todos os organismos, quer procariotas quer eucariotas, cujo material genético foi alterado (Brown, 2010).

As plantas transgênicas são plantas geneticamente modificadas mediante inserção de um ou vários genes de outros organismos mediante tecnologia de ADN recombinante que permite efetuar um processo de transferência de genes entre espécies diferentes. As plantas transgênicas têm aplicação nas áreas agrícola, alimentar e indústria farmacêutica (James, 2010).

Em 1973, Boyer e Cohen desenvolveram a tecnologia de ADN recombinante demonstrando que o material genético geneticamente modificado pode ser inserido em células de organismos diferentes (Baeshen *et al.*, 2014). O início da produção de proteínas farmacêuticas começou nos anos oitenta com a produção de insulina recombinante humana (Chan *et al.*, 1981) e da hormona de crescimento recombinante humana em *Escherichia coli* (Ikehara *et al.*, 1983).

A produção de proteínas recombinantes por plantas transgênicas começa em 1986 com a expressão da hormona de crescimento recombinante humana na planta do tabaco (Barta, *et al.* 1986) (Tabela nº 1). Três anos mais tarde, Hiatt *et al.* (1989) obtiveram o primeiro anticorpo em plantas transgênicas. Em 1990, Curtiss e Cardineau obtêm o primeiro antígeno de superfície de *Streptococcus mutans* no tabaco transgénico. No mesmo ano, é produzida a primeira proteína do sangue recombinante humana em batata transgénica e tabaco transgénico. Em 1992, são expressos em tabaco transgénico, o antígeno de superfície do vírus da hepatite B e o interferão beta recombinante humano com atividade biológica. Em 1995, obtém-se a primeira vacina comestível contra o vírus da raiva no tomate (Ma *et al.*, 2003). A primeira expressão de insulina biologicamente ativa em plantas transgênicas ocorre em 2006, em sementes de *Arabidopsis thaliana* L. (Nykiforuk *et al.*, 2006). A primeira vacina recombinante é aprovada em 2006 pela USDA, contra o vírus causador da doença de Newcastle em aves, obtida em células de tabaco transgénico (Rippke, 2006). Em 2010, é produzida em tabaco transgénico a aprotinina (Pogue *et al.*, 2010). A comercialização da vacina do vírus da influenza H5N1 para uso humano na China

surge em 2012 (Shoji *et al.*, 2011). Em 2015, é produzida a vacina do dengue em tabaco transgênico, tendo sido verificado eficácia e atividade biológica mediante ensaios *in vitro* e *in vivo* (Kim *et al.*, 2015).

Tabela nº 1- Cronologia da produção de proteínas recombinantes por plantas transgênicas

ANO	MARCO HISTÓRICO	REFERÊNCIA
1986	Hormona de crescimento humana em tabaco transgênico	Barta <i>et al.</i>
1989	Imunoglobulina G1 em tabaco	Hiatt <i>et al.</i>
1990	Antigénio de superfície A de <i>Streptococcus mutans</i> no tabaco	Curtiss & Cardineau
1990	Albumina sérica recombinante humana inteira em tabaco e batata	Sijmons <i>et al.</i>
1992	Antigénio de superfície do vírus da Hepatite B em tabaco	Mason <i>et al.</i>
1992	Interferão beta recombinante humano em tabaco	Edelbaum <i>et al.</i>
1995	Vacina comestível da glicoproteína do vírus da raiva em tomate	McGarvey <i>et al.</i>
2006	Insulina com atividade biológica em sementes de <i>Arabidopsis thaliana</i> L.	Nykiforuk <i>et al.</i>
2006	Comercialização da vacina contra o vírus Newcastle das aves	Rippke
2010	Aprotinina em tabaco	Pogue <i>et al.</i>
2012	Comercialização da vacina do vírus da Influenza H5N1	Shoji <i>et al.</i> , 2011
2015	Vacina do dengue em tabaco	Kim <i>et al.</i>

1.1.1 Aplicações

As plantas transgênicas, em função das aplicações a que se destinam, distinguem-se em três diferentes gerações que surgiram ao longo do tempo. A primeira geração de plantas transgênicas consiste nas modificações genéticas de plantas que conferem tolerância a herbicidas, resistência a pragas e adaptação ao stress ambiental

(Horsch *et al.*, 1984). Estas características, obtidas mediante tecnologia de ADN recombinante, proporcionam redução de contaminação ambiental por diminuírem as aplicações de pesticidas e inseticidas e aumento da produtividade agrícola (Singh & Singh, 2014). Um exemplo de plantas transgênicas de primeira geração são as plantas *Bt* resistentes a pragas, obtidas pela introdução de genes de *Bacillus thuringiensis* codificadores de endotoxinas e que conferem resistência a insetos (Bobrowski *et al.*, 2003).

As plantas transgênicas de segunda geração são geneticamente alteradas para melhorar as características organoléticas, aumentar a conservação ou aumentar a produção de nutrientes com o objetivo de obter alimentos funcionais (Kawashima *et al.*, 2004). O Tomate Flavr SavrTM, é um exemplo de planta transgênica de segunda geração, obtido através da tecnologia ARN antisense para evitar a deteriorização precoce do tomate e aumentar o tempo de conservação (Singh & Singh, 2014).

A formação do arroz dourado é outro exemplo de planta transgênica de segunda geração. Este arroz geneticamente modificado tem cor amarela porque é rico em β -caroteno, uma molécula precursora de vitamina A (Figura nº 1). O consumo de arroz dourado em países nos quais a sua dieta tem como base o arroz, como a China e a Índia, compensa a deficiência desta vitamina, prevenindo o aparecimento de casos de cegueira (Ye *et al.*, 2000).



Figura nº 1: Arroz com expressão de β -caroteno (Chrispeels & Sadava, 2003)

Consideram-se as plantas de terceira geração as plantas transgênicas das quais se obtêm compostos secundários ou proteínas recombinantes, ambos com atividade farmacêutica (Singh & Singh, 2014). Da produção de proteínas recombinantes, surge o conceito de “Molecular Pharming”, em que as plantas são transformadas geneticamente para produzir uma variedade de anticorpos, citoquinas, hormonas ou vacinas de uso

terapêutico em grandes quantidades e produzidas *in vivo* em explorações agrícolas ou *in vitro* em biorreatores (Goldstein & Thomas, 2004). As diferentes proteínas recombinantes humanas com aplicação imunogênica, antitumoral, antirretroviral, hipertensão, entre outras, encontram-se disponíveis no mercado ou em diferentes fases de ensaios clínicos (Sirko *et al.*, 2011).

Um medicamento biológico é um medicamento obtido por células de organismos vivos. A sua substância ativa é uma proteína que apresenta uma estrutura molecular complexa. Devido ao método de produção e à complexidade estrutural da molécula produzida gera-se uma variabilidade entre as moléculas obtidas. Os biossimilares tratam-se de medicamentos biológicos com estrutura idêntica ao medicamento biológico existente no mercado (EMEA, 2012).

Com a produção de diversos anticorpos recombinantes em plantas transgênicas, surge o conceito "plantibodies", como são a imunoglobulina A, a imunoglobulina G, entre outras, para uso terapêutico em humanos e animais (Daniell *et al.*, 2001).

Têm sido produzidos antígenos em plantas como a banana ou a alface sem necessidade de purificação da proteína recombinante produzida para o desenvolvimento de vacinas comestíveis para imunização passiva (Walmsley & Arntzen, 2000).

1.1.2. Importância económica

A área total de culturas de plantas transgênicas, em todo o globo, supera os 1,8 mil milhões de hectares. Dos 28 países produtores de plantas transgênicas, 8 são países industrializados e 20 são países em desenvolvimento (ISAAA, 2014) (Figura nº 2).

Em 2014, os cinco países que produziram mais plantas transgênicas, por ordem decrescente, foram: Estados Unidos da América, Brasil, Argentina, Índia e Canadá. Os EUA produziram um total de 73,1 milhões de hectares de plantas transgênicas. O Brasil é o país que apresenta maior crescimento anual de área cultivada. Dentro da União Europeia, Espanha, Portugal, Eslováquia, República Checa e Roménia produziram um total de 143000 hectares de milho transgénico, sendo a Espanha o país com mais área plantada. Portugal, Eslováquia, República Checa e Roménia

apresentaram áreas inferiores a 0,05 milhões de hectares de milho transgênico. Em Portugal o nível de produção aumentou em relação ao ano 2013 (ISAAA, 2014).

No continente africano, a África do Sul é o país com mais área plantada com plantas transgênicas. Os países da América Latina, África e Ásia, em conjunto, cultivaram mais plantas transgênicas do que os países industrializados (ISAAA, 2014). A justificação para a maior produção nos países em desenvolvimento tem a ver com a contribuição das culturas de plantas transgênicas para o incremento do vencimento dos agricultores e estimulação da economia nas zonas rurais (Singh & Singh, 2014).

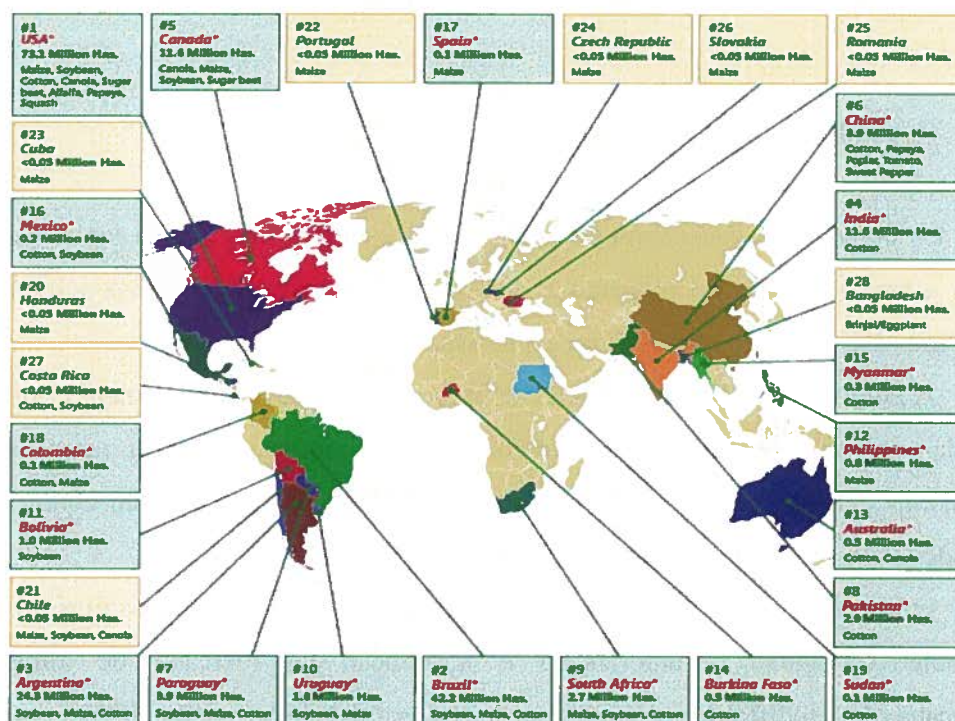


Figura nº 2: Países produtores de plantas transgênicas (ISAAA, 2014)

De acordo com Obembe *et al.* (2011), os fármacos obtidos mediante tecnologia de ADN recombinante têm uma quota de 10% do mercado farmacêutico e estima-se que este número aumente. Os sistemas de expressão utilizando bactérias, leveduras, células de mamífero e animais transgênicos têm custos elevados de investimento e produção. As plantas transgênicas, por outro lado, apresentam baixos custos de produção sendo uma alternativa económica para a produção de proteínas recombinantes de uso farmacêutico.

O custo de produção de proteínas recombinantes farmacêuticas em plantas é, em média, 0,1% do custo de produção de proteínas recombinantes farmacêuticas utilizando células de mamíferos e 6% do custo de produção de proteínas recombinantes farmacêuticas em bactérias (Basaran & Rodriguez–Cerezo, 2008).

Os anticorpos recombinantes produzidos por plantas transgênicas representam, no máximo, 1% dos custos de produção de anticorpos recombinantes em células de mamíferos e 10% utilizando sistemas de expressão microbianos (Obembe *et al.*, 2011).

As plantas transgênicas são capazes de produzir vacinas comestíveis a custos reduzidos porque, além de outros fatores, não é necessária a purificação da proteína recombinante (Sharma & Sood, 2011).

1.1.3. Regulamentação aplicável

Os organismos geneticamente modificados estão sujeitos a uma legislação que regula a sua libertação no mercado e o seu controlo toxicológico com o intuito da proteção pública e ambiental (Chrispeels & Sadava, 2003).

A Diretiva nº 2001/18/CE, de 12 de março, aprovada pelo Parlamento Europeu estipula a proteção da saúde pública e ambiental por meio de autorização renovável de organismos geneticamente modificados (OGMs) a cada decénio e o seu controlo no mercado (Wickson & Wynne, 2012).

O Regulamento nº 1830/2003, de 22 de setembro, do Parlamento Europeu tem por objetivo regular a autorização e introdução no mercado de alimentos geneticamente modificados e certificar a sua rotulagem e rastreabilidade para a proteção humana, animal e ambiental (Reg. nº 1830/2003/CE).

Em 2003, a Comissão Europeia publica o Regulamento nº 1946/2003 que designa um sistema comum de participações e troca de informações em relação aos movimentos transfronteiriços de OGMs entre os Estados Membros e países terceiros (Reg. nº 1946/2003/CE).

O Regulamento nº 65/2004, de 14 de janeiro, da Comissão Europeia, estabelece um sistema de identificação única dos organismos geneticamente modificados (Reg. nº 65/2004/CE).

Em Portugal, o Decreto-Lei nº 164/2004, de 3 de julho, regula a libertação de produtos geneticamente modificados no ambiente, assim como a sua colocação no mercado com o intuito de prevenir quaisquer riscos (DL nº164, 2004).

O Protocolo de Cartagena é um tratado que visa a segurança biológica mediante a prática sustentável dos organismos biológicos e sua conservação, tendo sido assinado por mais de 147 países e transposto no território nacional através do Decreto-Lei nº 7/2004, de 17 de Abril (DL nº7, 2004).

O Decreto-Lei nº 160/2005, de 21 de setembro, da legislação portuguesa estabelece a regulação de culturas de plantas transgênicas próximas a outras culturas de plantas que não são geneticamente modificadas, tendo como finalidade a prevenção de danos para o ambiente e a saúde da população e dos animais (DL nº160, 2005).

A Diretiva nº 2015/412 do Conselho Europeu é a nova Diretiva da Comissão Europeia que visa proporcionar a possibilidade de cada Estado-Membro limitar ou, até mesmo, proibir a produção de organismos geneticamente modificados.

Nos Estados Unidos, os organismos geneticamente modificados estão regulados pela Environmental Protection Agency (EPA), United States Department of Agriculture (USDA) e Food and Drug Administration (FDA). A agência que regula os medicamentos biológicos provenientes de qualquer organismo transgênico, nos Estados Unidos da América, é a FDA. Este órgão visa o controlo, a eficácia e a segurança de qualquer produto geneticamente modificado. As normas dos EUA indicam a rotulagem obrigatória de qualquer produto farmacêutico ou alimento geneticamente modificados com a finalidade de informar os consumidores (Sil & Jha, 2014).

1.1.4. Situação atual das plantas transgênicas

Atualmente, há várias proteínas recombinantes expressas por plantas transgênicas em comercialização nas áreas da cosmética, da veterinária e para fins de diagnóstico, havendo ainda poucas com aplicação terapêutica em humanos. O colagénio, expresso em tabaco transgênico, é utilizado pela indústria cosmética e tem a vantagem de não conter toxinas de origem animal. O α -interferão canino, produzido em morangos transgênicos, apresenta poucos custos de purificação e de produção. A aptotina, expressa em tabaco transgênico, é utilizada como reagente de laboratório. A albumina e a transferrina, produzidas em sementes de arroz transgênico, são

utilizadas como suplementos de meios de cultura de células (Sack, Hofbauer, Fischer & Stoger, 2015).

Um exemplo de uma proteína recombinante humana com utilização medicinal produzida por plantas transgênicas, já existente no mercado, é a glucocerebrosidase indicada na doença de Gaucher e obtida por células de cenoura transgênica (Shaaltiel *et al.*, 2007).

Várias proteínas recombinantes humanas com utilidade farmacêutica têm sido expressas em plantas transgênicas com atividade biológica, estando atualmente em diferentes fases de ensaios clínicos, como a glucocerebrosidase oral, o anticorpo monoclonal utilizado na imunização contra o vírus ébola, a lactoferrina indicada na inflamação, a α -galactosidase indicada na doença de Fabry e a vacina do linfoma folicular, um tipo de linfoma não-Hodgkin (Tabela nº 2). Algumas destas proteínas recombinantes estão patenteadas por empresas de Biotecnologia, como a Protalix e a Ventria. A glucocerebrosidase recombinante disponível no mercado, produzida em cenoura transgênica, não é administrada por via oral. Como as células vegetais têm uma parede celular mais resistente à ação das enzimas evitando a degradação da proteína no estômago e promovendo a sua absorção no intestino, estão a decorrer ensaios clínicos para a glucocerebrosidase oral (Sack, Hofbauer, Fischer & Stoger, 2015).

Tabela nº 2 - Exemplos de proteínas recombinantes produzidas por plantas transgênicas em diferentes fases de ensaios clínicos

MOLÉCULA	APLICAÇÃO	PLANTA	ENSAIOS CLÍNICOS	REFERÊNCIAS
Glucocerebrosidase humana oral (PRX-112)	Doença de Gaucher	Cenoura	Fase II	Protalix
Anticorpo monoclonal	Vírus do Ébola	Tabaco	Fase I	Huang <i>et al.</i> , 2010
α -Galactosidase	Doença de Fabry	Tabaco	Fase II	Protalix
Lactoferrina	Anti-inflamatório	Arroz	Fase III	Ventria
IgG1	Vacina linfoma folicular	Tabaco	Fase I	Tusé <i>et al.</i> , 2014

(Adaptada de Sack, Hofbauer, Fischer & Stoger, 2015)

1.2. PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE PROTEÍNAS FARMACÊUTICAS

Utilizam-se várias plantas para a produção de proteínas recombinantes de uso terapêutico, como o tabaco, o milho, alfalfa, o arroz e a batata. O tabaco é a planta mais utilizada para a produção de proteínas recombinantes porque tem um desenvolvimento rápido com bastante biomassa, cresce facilmente durante todo o ano, não está presente na cadeia alimentar, dispõe de infraestruturas de processamento já existentes e o processo de transformação genética é simples (Obembe *et al.*, 2011).

Os cereais, ao produzirem muitas sementes, têm capacidade de aumento de escala de produção, assim como armazenamento e estabilidade das proteínas recombinantes de uso terapêutico expressas, apresentando segurança e eficácia e crescem em praticamente todo o lado (Ramessar *et al.*, 2008). Os mais comuns são o arroz, o milho, a cevada e o trigo (Lau & Sun, 2009). O arroz é utilizado na produção de proteínas recombinantes por ser um sistema de expressão económico, ter a capacidade de acumulação, conservação e baixo risco de contaminação (Fujiwara *et al.*, 2010). Apresenta altos níveis de expressão de antígeno recombinante sendo a molécula estável a altas temperaturas, o que faz com que possa ser consumido após ser cozinhado (Mishra *et al.* 2008).

As leguminosas têm sido utilizadas para a produção de proteínas recombinantes de uso terapêutico. A ervilha e a soja são as plantas leguminosas que mais se utilizam para a expressão de proteínas recombinantes, como é o caso da obtenção de anticorpos monoclonais (Stoger *et al.*, 2005).

A planta *Arabidopsis thaliana* L. é uma planta modelo muito utilizada porque o seu desenvolvimento é rápido, obtém-se um número elevado de sementes e são facilmente manipuláveis (Watson *et al.*, 1992).

Diversas plantas foram transformadas para a produção de vacinas comestíveis para imunização passiva, utilizando a planta inteira ou partes da mesma (Boehm, 2006). A banana é um alimento presente na dieta infantil e pode ser consumida crua evitando assim a desnaturação da proteína recombinante (Goldstein & Thomas, 2004). O tomate cresce facilmente em numerosos países, a sua maturação é prevenida mediante congelação e é rico em vitamina A que induz a resposta imunológica. Por conseguinte, também é utilizado para a obtenção de vacinas comestíveis (Mishra *et al.*, 2008).

1.2.1. Comparação com outros sistemas de expressão de proteínas recombinantes

Além das plantas transgênicas, existem vários sistemas de expressão de proteínas recombinantes como animais, células de mamífero, insetos, leveduras e bactérias. A adição correta de açúcares nas proteínas recombinantes influencia a estabilidade, a solubilidade, a conformação proteica e, conseqüentemente, a atividade biológica da proteína *in vivo* (Vianna *et al.*, 2011).

Os sistemas de expressão de proteínas recombinantes farmacêuticas utilizando organismos procariotas nem sempre têm a capacidade de levar a cabo as modificações translacionais necessárias para a atividade biológica da proteína (Demain & Vaishnav, 2009). A bactéria mais utilizada para a obtenção de proteínas recombinantes de uso terapêutico é a *Escherichia coli* porque apresenta uma elevada taxa de crescimento, viabilidade e alto rendimento de produção. Embora, atualmente, haja a possibilidade de expressar N-oligosacariltransferases de *Campylobacter jejuni* em *Escherichia coli* promovendo uma melhoria no processo de glicosilação de proteínas recombinantes, ainda continua a apresentar carência de modificações translacionais como fosforilação, processamento proteolítico e formação de ligações dissulfeto (Baeshen *et al.*, 2014).

Relativamente aos organismos eucariotas, são as leveduras as mais utilizadas para a produção de proteínas recombinantes de uso terapêutico, nomeadamente *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* e *Pichia pastoris* porque proliferam rapidamente, são passíveis de manipulações genéticas e secretam proteínas para o meio extracelular. No entanto, as leveduras nem sempre têm a capacidade de efetuar glicosilações proteicas adequadas em proteínas de uso humano porque não efetuam o enrolamento proteico apropriado (Houdebine, 2009). Por exemplo, a glicosilação tipo N das leveduras provoca um incremento da presença de manose, fazendo com que a molécula apresente uma duração de ação curta e seja imunogénica (Gomord *et al.*, 2010).

Os fungos *Acremonium*, *Aspergillus* e *Chrysosporium* são igualmente utilizados como sistemas de expressão de proteínas recombinantes mas apresentam limitações nas modificações translacionais, sendo as proteínas recombinantes produzidas pouco eficazes (Demain & Vaishnav, 2009).

Os insetos, como sistemas de expressão de proteínas recombinantes, nem sempre são capazes de realizar o processo de glicosilação necessário para a atividade biológica da proteína recombinante formada. Existe risco de contaminação e, em

comparação com as plantas transgênicas, os custos de purificação e de produção são elevados (Demain& Vaishnav, 2009) (Tabela nº 3).

A glicosilação formada em células de mamífero de roedores não é totalmente viável, ao contrário da glicosilação que ocorre em plantas transgênicas. As células de mamífero não têm capacidade de produzir em grande quantidade, têm custos elevados de produção, os riscos de contaminação são altos e o tempo de produção de proteínas recombinantes é prolongado (Houdebine, 2009).

Tabela nº 3 - Comparação dos diferentes sistemas de expressão de proteínas recombinantes farmacêuticas (adaptada de Xu *et al.*, 2011)

	Plantas <i>In vivo</i>	Plantas <i>In vitro</i>	Animais	Células de mamífero	Insetos	Leveduras	Bactérias
Custo de produção	Baixo	Médio	Baixo	Alto	Médio	Baixo	Baixo
Escala de produção	Muito Alta	Alta	Média	Média	Média	Alta	Alta
Qualidade proteína	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Média	Baixa
Risco contami- nação	Baixo	Muito Baixo	Alto	Muito Alto	Alto	Médio	Médio
Custo de purifica- ção	Alto	Médio	Alto	Alto	Médio	Alto	Alto
Tempo de produção	Muito Alto	Médio	Alto	Alto	Médio	Baixo	Baixo

Os animais transgênicos que se utilizam para a produção de proteínas no leite ou ovos são normalmente as vacas, as ovelhas, as cabras, as galinhas e os porcos. As proteínas recombinantes formadas apresentam uma identidade similar à proteína humana. Contudo, existe o risco de contaminação devido à presença de agentes patogênicos e riscos para a saúde animal que se verificaram nas experiências efetuadas em animais transgênicos (Demain& Vaishnav, 2009).

A produção de proteínas recombinantes por plantas transgênicas é realizada *in vivo* ou *in vitro*, apresentando diferentes características. Em ambos tipos de produção

verifica-se que as plantas transgênicas são um sistema de produção económico, é possível aumentar facilmente a escala de produção, existem reduzidos riscos de contaminações biológicas e o processo de glicosilação e modificações translacionais ocorrem de forma adequada para a atividade biológica em humanos (Gomord, 2004).

1.2.2. Eficácia, identidade e funcionalidade das proteínas recombinantes produzidas por plantas transgênicas

Para que determinadas proteínas recombinantes sejam produzidas com características idênticas à proteína humana, será necessário adicionar genes complementares de enzimas que favoreçam a formação da proteína idêntica com a mesma atividade biológica (Chen, 2008).

As plantas têm a capacidade de adicionar glucanos tipo N complexos, como a N-acetilglucosamina e manose, similar à glicosilação observada em humanos (Figura nº 3). No entanto, as plantas transgênicas não são capazes de adicionar galactose ou ácido siálico (Wilson, 2002). Ao contrário dos seres humanos as plantas transgênicas adicionam α -(1,3)-fucose e β -(1,2)-xilose à estrutura da proteína recombinante formada. Restringir a produção de proteínas recombinantes no lúmen do retículo endoplasmático e inativar glicosiltransferases no aparelho de Golgi das células vegetais, diminui a formação das estruturas β -1,2-xilose e α -1,3-fucose (Gomord *et al.*, 2004).

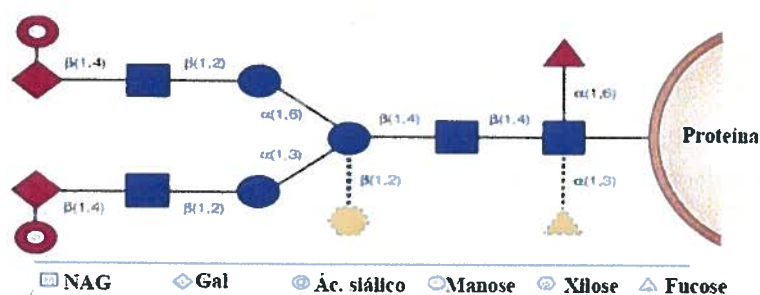


Figura nº 3: Estrutura da cadeia longa do glucano formado em plantas e humanos. As estruturas representadas a azul são comuns a humanos e plantas. As estruturas representadas a vermelho são encontradas em humanos e as estruturas em amarelo são encontradas em plantas. NAG: N-acetilglicosamina; Gal: galactose (Ma *et al.*, 2003)

A presença de galactose, na estrutura proteica recombinante humana, contribui para a correta conformação de anticorpos e atividade imunológica (Wright & Morrison, 1998). Para adicionar a galactose à estrutura molecular, adiciona-se o gene β -(1,4)-galactosiltransferase humano na transformação efetuada para a expressão da proteína recombinante por plantas transgênicas (Palacpac *et al.*, 1999).

A presença de ácido siálico incrementa a duração de ação e eficácia das glicoproteínas. A enzima α -2,6-sialtransferase proveniente de células de mamífero (Wee *et al.*, 1998) e o ácido N-acetilneuramínico sintetase de origem humana promovem a adição do ácido siálico às glicoproteínas produzidas por plantas transgênicas (Misaki *et al.*, 2006).

1.3. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo conhecer o potencial biotecnológico das plantas transgênicas no âmbito da indústria farmacêutica e suas possíveis aplicações. Desta forma, no desenvolvimento deste tema, serão descritas as técnicas envolvidas na transformação de plantas, sua regeneração e produção de moléculas recombinantes *in vivo* e *in vitro*. Serão comparados os diferentes sistemas de expressão de proteínas recombinantes farmacêuticas em termos de eficácia e produtividade e avaliados os respectivos riscos e vantagens.

2. DESENVOLVIMENTO

A biotecnologia vegetal consiste na utilização de plantas para o seu melhoramento, adaptação a condições ambientais adversas ou produção de substâncias de interesse, estando incluídos o aumento de produtividade e da qualidade da produção por meio de cultura de células e tecidos vegetais, regeneração de plantas e técnicas de biologia molecular (Lima & Mota, 2003).

A biotecnologia vegetal divide-se em duas áreas que são a agrobiotecnologia e a biotecnologia vegetal industrial. A agrobiotecnologia trata do estudo de clonagem de plantas, na resistência a pragas e na produção de sementes artificiais. A biotecnologia vegetal industrial é utilizada na produção de compostos resultantes do metabolismo secundário vegetal e na produção de proteínas recombinantes humanas de utilidade terapêutica em plantas transgênicas (Lima & Mota, 2003).

É possível produzir proteínas recombinantes farmacêuticas tanto em plantas cultivadas *in vivo* como em sistemas de células *in vitro*. A técnica *in vitro* consiste na cultura de diferentes partes da planta colocadas em meio nutritivo utilizando recipientes de vidro e sob condições de esterilidade. Para ocorrer os mesmos processos fisiológicos que se observam nas plantas *in vivo*, a cultura de plantas *in vitro* está sujeita a fatores físicos, nutricionais e ambientais adequados ao desenvolvimento do explante vegetal. Fatores como a temperatura, a luminosidade, o fotoperíodo e a presença de reguladores de crescimento são necessários para a aplicação prática da cultura *in vitro* (Fehér, 2003).

A utilização de culturas celulares *in vitro* passou a ser utilizada na indústria para tornar a produção de plantas com independência das condições climáticas, dos campos utilizados e da sazonalidade da espécie vegetal, aumentando o rendimento de produção (Lima & Mota, 2003).

2.1. TÉCNICAS *IN VITRO* DE CULTURAS VEGETAIS

A capacidade que qualquer célula vegetal viva possui de formar uma planta idêntica à qual é originária é denominada de totipotência (Chrispeels & Sadava, 2003). A cultura de células vegetais compreende a utilização da capacidade de totipotência dando lugar aos processos de diferenciação e desdiferenciação. A diferenciação é a formação de tecidos organizados ou meristemas quando se pretende regenerar a planta. A desdiferenciação origina a proliferação de células de maneira desorganizada, denominada *calli*, que depois são transferidas para meio líquido formando suspensões celulares que serão mantidas em biorreator (Dodds & Roberts, 1995).

A capacidade de indução do desenvolvimento das células vegetais depende do tipo de explante, do meio de cultura e da sua composição nutricional, do balanço de reguladores de crescimento e de fatores climáticos (Fehér *et al.*, 2003).

A cultura de tecidos é iniciada pela limpeza e desinfecção do material vegetal. Os explantes transformados são lavados com água destilada, depois são desinfetados com hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio e/ou álcool e uma lavagem com água destilada para remover o composto desinfetante utilizado (Andrade, 2002).

Os meios de cultura são complementados com reguladores de crescimento, como as auxinas e citocininas. As auxinas estimulam o crescimento das células indiferenciadas, o alongamento celular e a formação de raízes adventícias enquanto que as citocininas promovem a citocinese ou divisão celular e regulam o crescimento (Lima & Mota, 2003).

As auxinas mais utilizadas são o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), o ácido indolacético (AIA) e o ácido naftalenoacético (NAA). O ácido 2,4-diclorofenoxiacético é uma auxina sintética e o ácido indolacético é uma auxina endógena. As citocininas frequentemente utilizadas são a cinetina, benziladenina e a zeatina, sendo esta última natural (Proença da Cunha, 2005).

A concentração adicionada de reguladores de crescimento ao meio de cultura depende da espécie vegetal e do objetivo pretendido. O balanço entre as auxinas e as citocininas é fator importante na regulação da citocinese, no alongamento das células, na diferenciação ou desdiferenciação e no desenvolvimento de órgãos. Para que as citocininas desempenhem a sua função no material vegetal é necessária a presença de auxinas no meio de cultura (Stafford & Warren, 1993).

Os meios de cultura vegetal, podem ser sólidos, semissólidos e líquidos aos quais são adicionados nutrientes como, vitaminas, fonte de carbono, compostos inorgânicos e compostos orgânicos como a sacarose que subsequentemente é hidrolisada a frutose e glucose pelas células vegetais para a obtenção de energia (Dodds & Roberts, 1995).

O pH é um fator importante em meios de cultura e para o desenvolvimento e regeneração das plantas. A utilização dos nutrientes do meio por parte das células vegetais depende do valor de pH e a indução da divisão celular depende da acidificação do meio (Pasternak *et al.*, 2002).

As vitaminas biotina, tiamina e piridoxina estão presentes em meios de cultura tendo propriedades catalíticas em reações enzimáticas. Também são adicionadas diversas amidas, como a L-arginina e a L-glutamina (Dodds & Roberts, 1995).

Os compostos inorgânicos, requeridos no meio de cultura para o desenvolvimento vegetal, compreendem os macronutrientes e os micronutrientes. Os macronutrientes são considerados os nutrientes adicionados em maior concentração e os micronutrientes os nutrientes adicionados em menor concentração, embora as suas concentrações estejam adaptadas a cada espécie vegetal. Entre os macronutrientes utilizados encontram-se o potássio, o magnésio, o fósforo, o enxofre, o azoto e o cálcio e entre os micronutrientes utilizados encontram-se o molibdénio, o cobre, o boro, o manganésio, o zinco e o ferro (Fehér *et al.*, 2003).

O carvão ativado é muito utilizado em culturas vegetais porque tem atividade antioxidante e adsorve diversas moléculas no meio de cultura, como são as substâncias fenólicas resultantes do processo de oxidação dos tecidos lesionados durante a cultura *in vitro* (Henrique *et al.*, 2006).

O meio escolhido para a cultura de células vegetais depende da espécie vegetal, do tecido ou célula a utilizar, da idade da planta e da sua finalidade. Existem diversos meios, como o meio Gamborg B5, o meio Murashige e Skoog (MS) caracterizado pela elevada concentração de amónio, nitrato e potássio, os meios propostos por White formados com diversas concentrações de sais e azoto em forma de amónio, entre outros (Stafford & Warren, 1993).

O meio de cultura específico deve ter como base um meio standard com alterações nutricionais de acordo com as necessidades indutivas que cada espécie vegetal requer, com diferentes balanços de reguladores de crescimento e com a adição de compostos importantes para a adaptação vegetal (Gamborg *et al.*, 1976).

O meio de Schenk & Hildebrandt utiliza-se para o desenvolvimento das culturas de plantas monocotiledónias enquanto que o meio de Murashige e Skoog utiliza-se para a iniciação do crescimento celular desdiferenciado das culturas de plantas dicotiledónias (Dodds & Roberts, 1995).

2.1.1. Embriogénese e Organogénese

A embriogénese consiste na formação de embriões sem ligação vascular com o tecido do qual provém e divide-se em embriogénese somática e embriogénese gamética. A embriogénese somática caracteriza-se pela obtenção de embriões a partir de explantes, tecidos somáticos, células em suspensão ou protoplastos (Lima & Mota, 2003).

A embriogénese somática é mais eficaz na velocidade de regeneração das plantas porque os embriões são formados de um único explante. O processo de embriogénese somática não requer muitas transferências de meios de cultura e é mais uniforme em tamanho e forma. A embriogénese somática pode ser direta ou indireta. A embriogénese somática direta consiste na formação dos embriões a partir do explante sem passar pela fase de *calli*. A embriogénese somática indireta consiste na existência de uma fase intermédia de formação de *calli* entre o explante e os embriões (Stafford & Warren, 1993).

A indução da formação de embriões é promovida por uma elevada concentração de 2,4-D e uma concentração reduzida de citocininas (Fehér, 2003). A divisão celular dos meristemas resulta na formação de tecidos, rebentos, raízes e o estabelecimento do desenvolvimento da planta completa (Dodds & Roberts, 1995).

A organogénese somática consiste na formação de rebentos e raízes a partir de estruturas de tecidos vegetais somáticos, sem passar por um desenvolvimento de embriões (Lima & Mota, 2003) (Figura nº 4).

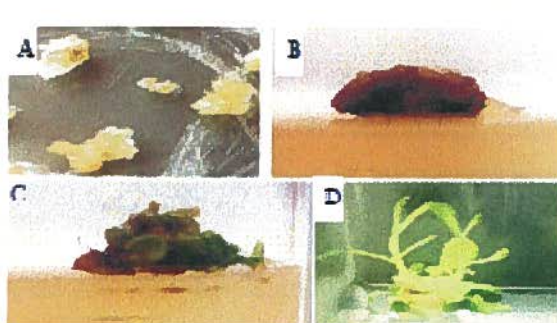


Figura nº 4: Produção do antígeno de superfície do vírus da Hepatite B em *calli* de alfafa transgênica e sua organogênese somática *in vitro*. A - formação de *calli*; B - *calli* em meio de cultura com 3 mg/L de ácido indolacético (AIA) e 0,02 mg/L de cinetina após 45 dias; C - formação de raízes adventícias em 0,2 mg/L de AIA e 0,2 mg/L de cinetina após 45 dias; D – formação de rebentos com 0,2 mg/L de AIA e 0,2 mg/L de cinetina após 60 dias (Marcondes & Hansen, 2008)

O balanço dos reguladores de crescimento depende da espécie vegetal, do tipo de explante e do tipo de auxinas e citocininas. No caso da organogênese a concentração de auxinas é superior à concentração de citocininas. As condições de crescimento para a regeneração das plantas, dependem da espécie vegetal da qual se extraiu o explante, da luminosidade, da humidade e da temperatura, sendo a temperatura ótima normal de 25°C para plantas de climas temperados e 27°C-30°C para plantas tropicais (Stafford & Warren, 1993).

2.1.2. Calogênese e estabelecimento de suspensões

A calogênese consiste no processo de formação de agregados celulares indiferenciados denominados *calli* a partir de um explante esterilizado da planta (Doods & Roberts, 1995).

A indução de *calli* é mais rápida e eficaz ao utilizar tecidos jovens da planta. O explante é colocado em meio de cultura com os compostos necessários para a iniciação de *calli*. Os meios standard que normalmente são utilizados são os meios Murashige & Skoog, Gamborg B5, White e Heller. Contém uma mistura de componentes que incluem elementos orgânicos, inorgânicos, sacarose e balanço de reguladores de crescimento em gel de agar. A auxina 2,4-D apresenta maior eficácia na calogênese, sendo portanto a mais utilizada, em conjunto com a cinetina (Stafford & Warren, 1993).

As fases de desenvolvimento de *calli* dividem-se em resposta de lesão e resposta de crescimento. A fase de resposta de lesão está caracterizada por uma limitada divisão celular e por um rápido incremento da atividade metabólica. A fase de resposta de crescimento está caracterizada por uma divisão celular contínua e é dependente de um suplemento de auxinas. A resposta de crescimento de *calli* está dividida em três partes: indução, divisão e diferenciação. A indução consiste em modificações metabólicas e síntese de macromoléculas. A divisão consiste na iniciação da divisão das células vegetais diminuindo o tamanho celular. A diferenciação consiste no alongamento das células vegetais e diminuição da taxa de divisão celular (Stafford & Warren, 1993).

Para obter suspensões celulares de células vegetais, o *calli* é transferido e colocado em frascos de Erlenmeyer obtendo uma suspensão celular (Figura nº 5). O meio é líquido e contém agitadores que fragmentam o agregado de células e proporcionam condições de aerobiose (Dodds & Roberts, 1995). A velocidade dos agitadores deve ser controlada, pois uma velocidade alta provoca lesões nas células e uma velocidade lenta pode resultar numa fraca mistura homogênea e afetar o metabolismo celular (Stafford & Warren, 1993).

A acumulação de proteínas recombinantes em suspensões de células vegetais transgênicas é obtida através da utilização de inibidores de proteases e da adição de agentes protetores e estabilizantes como o polietilenoglicol (PEG), a polivinilpirrolidona (PVP) e a gelatina (Magnuson *et al.*, 1996).

As culturas de suspensão de células vegetais proporcionam homogeneidade e possibilidade de aumento de escala de produção de proteínas recombinantes com a sua transferência para biorreatores de várias dimensões (Fonseca & Teixeira, 2007).



Figura nº 5: *Calli* e suspensão celular de *Rauvolfia serpentina* L. (Yang & Stöckigt, 2010)

2.1.3. Produção e cultura de protoplastos

Algumas técnicas de transformação de plantas envolvem a utilização de protoplastos por ser mais fácil a introdução do ADN. O protoplasto é a célula vegetal de configuração esférica a qual foi removida a parede celular (Figura nº 6) por métodos mecânicos ou enzimáticos e mantido em meio isotónico com concentração de sais semelhante ao conteúdo vacuolar (Stafford & Warren, 1993).

Os métodos enzimáticos, mais utilizados por originarem maior viabilidade, consistem na digestão da celulose, hemicelulose e pectina presentes na parede celular das células vegetais por meio de misturas enzimáticas de celulasas e pectinases. Além destas enzimas, também estão presentes na mistura lipases, peroxidases, ribonucleases e proteases para obter um rendimento melhor de protoplastos viáveis (Dodds & Roberts, 1995).

Para a obtenção de protoplastos, a osmolaridade do meio é um fator determinante pois se o potencial do meio não está em equilíbrio com o potencial das células, ocorre a plasmólise celular. Para conseguir a isotonicidade, adicionam-se aos meios MS ou Gamborg B5, reguladores osmóticos como o sorbitol e manitol em presença de sacarose e polivinilpirrolidona que atua como estabilizante (Lima & Mota, 2003).

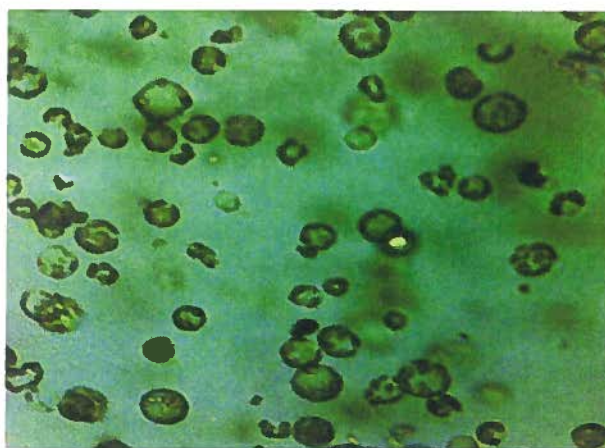


Figura nº 6: Protoplastos de células de *Citrus limon* L. (Chrispeels & Sadava, 2003)

A capacidade de autorregeneração da parede celular dos protoplastos é o método direto indicativo da viabilidade dos mesmos. Por outro lado, existem métodos indiretos de verificação da viabilidade dos protoplastos mediante a observação de movimentos

trabeculares ao microscópio ótico, incapacidade de coloração mediante a utilização de corantes como o azul de metileno e emissão de fluorescência por radiação ultravioleta pela degradação de sais de fluorocromos (Dodds & Roberts, 1995).

Após a obtenção dos protoplastos retiram-se, por meio de centrifugação ou filtração, a mistura enzimática, os restos de tecido não digerido e as células não viáveis (Stafford & Warren, 1993).

A parede celular das células vegetais é removida para facilitar a entrada de material genético exógeno para o interior celular, dando lugar à transformação da planta. Para a obtenção de plantas transformadas, é indispensável a obtenção de grandes quantidades de protoplastos viáveis e, quando colocados em cultura *in vitro*, ocorra a formação de *calli* e ulterior regeneração da planta completa (Dodds & Roberts, 1995). É uma das técnicas mais empregues para a produção de plantas transgênicas porque a transformação genética das plantas através de protoplastos é simples de executar e eficaz (Stafford & Warren, 1993).

A transformação genética de plantas utilizando protoplastos pode ser otimizada pela introdução dos mesmos em solução com o material genético e polietilenoglicol, a uma temperatura entre 22°C-24°C, durante trinta minutos. O polietilenoglicol precipita o material genético facilitando a sua entrada, nos protoplastos da célula vegetal, por endocitose (Brown, 2010).

A imobilização de protoplastos em meios de cultura formados por geles de agar e de agarose permitem o seu suporte e observação. Não obstante, a cultura em gota suspensa, em caixa de Petri previamente esterilizada, é a técnica mais simples para cultivar protoplastos e regenerar plantas inteiras (Stafford & Warren, 1993).

Após um período de tempo em meio de cultura, os protoplastos sintetizam novamente a estrutura da parede celular, dividem-se e formam *calli*. Esta massa desorganizada de células é transferida para frascos de Erlenmeyer, contendo novo meio de cultura suplementado com auxinas e manitol, onde é iniciado o processo de embriogénese ou organogénese a partir das células transformadas (Dodds & Roberts, 1995).

2.2. TRANSGÊNESE

2.2.1. Origem dos genes

A transformação genética permite a introdução controlada de um ou vários genes provenientes de organismos diferentes do hospedeiro com a finalidade de obter uma ou várias características desejáveis (Singh, Ghai, Paul & Jain, 2006).

Um gene de interesse de uma determinada espécie pode ser transferido para uma planta para esta obter resistência a pragas e tolerância a herbicidas (Horsch *et al.*, 1984). O gene *bar* que codifica a enzima fosfinotricina acetiltransferase da bactéria *Streptomyces hygroscopicus* foi inserido na planta do tabaco para conferir tolerância a herbicidas (Sack, Hofbauer, Fischer & Stoger, 2015).

A introdução de genes exógenos nas plantas para aumentar os níveis de produção de metabolitos primários tem vindo a ser desenvolvido. O gene triptófano descarboxilase proveniente da planta vinca-de-madagáscar foi inserido na planta *Peganum harmala* para obtenção de maiores quantidades de serotonina (Berlin *et al.*, 1993).

A modificação genética para a produção proteínas recombinantes tem maior interesse para a indústria farmacêutica. Para tornar a produção eficaz de insulina recombinante em *Escherichia coli* adiciona-se na construção genética o gene da β -galactosidase (Ratledge & Kristiansen, 2001). Os genes α 1-globina humana e β^A -globina humana são introduzidos em porcos para a produção de hemoglobulina recombinante humana (Glick & Pasternak, 1994).

A inserção de genes de origem humana em plantas transgênicas tem como objetivo a síntese de proteínas recombinantes de uso medicinal. Por exemplo, o gene hIL-13 foi introduzido na planta do tabaco para a síntese de interleucina-13 recombinante humana (Wang *et al.*, 2008). O gene 2G12LC foi inserido em tabaco para a expressão do anticorpo monoclonal 2G12 humano com atividade anti-HIV-1 (Sack *et al.*, 2015).

2.2.2. Construção genética

Para a construção genética é necessário isolar o fragmento de ADN que contém o gene de interesse que codifica a proteína recombinante desejável. Para tal, utilizam-se enzimas de restrição ou endonucleases que reconhecem especificamente as sequências genéticas de interesse, cortando as ligações entre os nucleótidos (Brown, 2010).

O promotor consiste numa sequência de ADN responsável pela regulação da expressão genética induzindo um elevado nível de transcrição, resultando em um incremento da quantidade de proteína recombinante expressa (Jani *et al.*, 2002). Os promotores têm a característica de serem independentes do hospedeiro, ou seja, são capazes de conduzir a expressão genética em todos os tecidos vegetais (Huang *et al.*, 2009). O promotor CaMV35S, obtido do vírus do mosaico da couve-flor, é o promotor mais utilizado porque apresenta elevados níveis de expressão, tendo sido usado para produzir determinados antigénios como a subunidade da toxina da cólera e as glicoproteínas do vírus da raiva (Jani *et al.*, 2002).

O gene terminador da construção genética regula a terminação da transcrição, não permitindo a expressão dos genes que se encontrem fora do mesmo (Lima & Mota, 2003). A adição do intrão vegetal na construção genética permite a expressão dos genes somente em células vegetais impedindo a transcrição em células eucariotas (Darbani *et al.*, 2007).

Para ocorrer a clonagem da construção genética, é necessário utilizar vetores, como por exemplo, o plasmídeo de *Escherichia coli*, formado por ADN extracromosómico circular e com conformação de dupla hélice. A ligação do fragmento do ADN de interesse ao vetor de clonagem é estabelecida pela enzima ADN ligase (Glick & Pasternak, 1994).

Na construção genética são colocados genes de interesse que sintetizam a proteína recombinante com finalidade terapêutica e também genes para selecionar as células vegetais transformadas, denominados genes marcadores de seleção e genes marcadores moleculares (Anami *et al.*, 2013). Os genes marcadores de seleção conferem resistência a antibióticos ou herbicidas, fazendo com que as células vegetais transformadas sejam as únicas a crescerem em meio de cultura seletivo. Usam-se por exemplo, os genes neomicina fosfotransferase e gentamicina acetiltransferase que conferem resistência aos antibióticos canamicina e gentamicina, respetivamente (Dale *et*

al., 1993). Os genes marcadores moleculares codificam proteínas que produzem uma resposta detetável por meios físicos. Os genes marcadores moleculares luciferase, cloranfenicol acetiltransferase, proteína verde fluorescente e β -D-glucuronidase, são alguns exemplos. O gene β -D-glucuronidase codifica uma enzima que cataliza a hidrólise do ácido β -D-glucurônico, emitindo fluorescência (Zuo *et al.*, 2001).

A construção genética representada na figura nº 7, foi introduzida em células de tabaco para a expressão de antígenos do vírus da Hepatite B. Para tal, foram utilizados o gene marcador de seleção *bar* que tem tolerância ao herbicida, as enzimas de restrição EcoRI, XbaI, BamHI, PstI e HindIII e o plasmídeo da *Agrobacterium tumefaciens* (Kostrzak *et al.*, 2009).

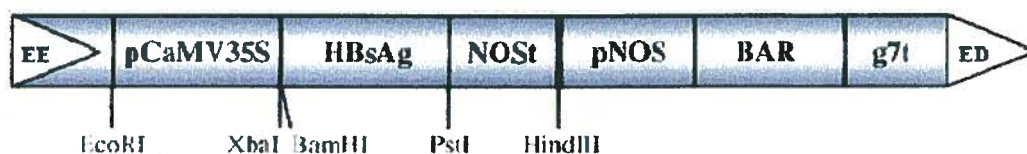


Figura nº 7: Representação esquemática da construção genética de tabaco transgênico; Genes estruturais: HBsAg – gene codificante do antígeno de superfície do VHB; *BAR* – tolerância a herbicida; Promotores: Vírus do Mosaico da Couve-flor (CaMV35S); pNOS – nopalina sintase; Terminação: NOST– nopalina sintase; g7 terminador; ED e EE - extremidade direita e esquerda, respectivamente (Kostrzak *et al.*, 2009)

2.2.3. TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS

A construção genética é introduzida na célula vegetal através de métodos de transferência direta ou indireta, dependendo da espécie vegetal e dos diferentes tipos de tecidos vegetais em causa. A transferência direta fundamenta-se na modificação das membranas celulares causada por processos físicos. A transferência indireta consiste na utilização de agentes patogénicos naturais da planta, designadamente vírus e bactérias como a *Agrobacterium tumefaciens* e a *Agrobacterium rhizogenes* (Dale *et al.*, 1993).

2.2.3.1. Transformação direta

A transformação direta de plantas consiste em introduzir o gene de interesse diretamente nas células vegetais mediante as técnicas de biolística ou bombardeamento de micropartículas, microinjeção, eletroporação, lipossomas e laser (Carrer *et al.*, 2010).

A técnica de biolística (Figura nº8) permite inserir o gene de interesse revestido por micropartículas de ouro ou tungstênio no explante da planta. As micropartículas são disparadas a alta velocidade e atravessam a membrana das células vegetais (Xiong *et al.*, 2013). É a técnica mais utilizada para a transformação de plantas. É simples de executar, rápida e eficaz pois apresenta um grande rendimento de células vegetais transformadas com poucos disparos (Lima & Mota, 2003).



Figura nº 8: Aparelho de biolística ou bombardeamento de micropartículas

(<http://www.biology.washington.edu/sites/washington.edu.dept/files/u894/Biolistic1AdjSm.jpg>)

Embora possam ser utilizados diferentes tipos de explantes na técnica de biolística, a velocidade dos disparos depende da espécie vegetal e dos diferentes tipos de tecidos e células vegetais a serem utilizados na transformação. Deste modo, os disparos devem ser adequados para evitar um reduzido rendimento de transformação genética ou provocar a lise celular (Hammond *et al.*, 1999).

A técnica de microinjeção consiste na inserção específica do gene exógeno na célula vegetal mediante a utilização de microseringas, micropipetas e microscópio em condições de temperatura e esterilidade controladas. Devido ao equipamento complexo para a transformação vegetal, ao baixo rendimento de células vegetais viáveis, à

morosidade do processo e aos custos de produção elevados, esta técnica é pouco aplicada na transformação vegetal (Mrízová *et al.*, 2014).

A técnica de eletroporação de protoplastos consiste na aplicação de descargas elétricas de alta voltagem formando canais de membrana tornando a célula vegetal permeável. A quantidade e o tamanho de canais formados é diretamente proporcional à duração e à intensidade da descarga elétrica aplicada. O tamanho do material genético, o tampão utilizado e a temperatura são também fatores que influenciam a técnica (Stafford & Warren, 1993).

Os lipossomas são vesículas fosfolipídicas de forma esférica que transportam o gene exógeno para o interior dos protoplastos. Em meio de cultura, adicionam-se os lipossomas contendo o gene de interesse juntamente com os protoplastos na presença de polietilenoglicol para promover a fusão (Balazs & Godbey, 2011).

2.2.3.2 Transformação indireta

A transformação indireta para a obtenção de plantas transgênicas consiste na utilização de um vetor, podendo tratar-se de bactérias, como *Agrobacterium tumefaciens* e *Agrobacterium rhizogenes*, ou de vírus (Ratledge & Kristiansen, 2001).

A bactéria *Agrobacterium tumefaciens* tem a capacidade de infectar plantas, inserindo informação genética no genoma da planta. Para além do seu material genético possui um plasmídeo Ti (Bhatia *et al.*, 1986) (Figura nº 9).

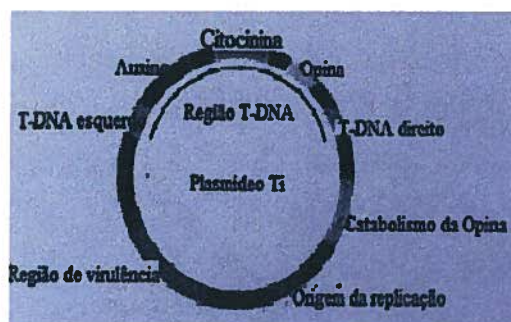


Figura nº 9: Representação do plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens*
(Adaptado da Sebenta prática de Biotecnologia Industrial Farmacêutica)

A região T-DNA do plasmídeo Ti contém genes envolvidos na produção de auxinas e citocininas, fazendo com que as células vegetais infectadas comecem a proliferar. Os genes incluídos na região de virulência são importantes para a transferência e integração da região T-DNA no genoma da célula vegetal. A origem da replicação é formada pelos genes *ori* responsáveis pelo início do processo de replicação do ADN. Na natureza, esta transformação ocorre naturalmente induzindo a doença galha-de-coroa (Glick & Pasternak, 1998) (Figura nº 10).



Figura nº 10: Doença coroa-de-galha provocada pela bactéria *Agrobacterium tumefaciens* (Chrispeels & Sadava, 2003)

Em biotecnologia, a região T-DNA é alterada sendo os genes codificantes para auxinas e citocininas e para a produção de opinas retirados e substituídos pela construção genética que se pretende inserir. Quando a bactéria *Agrobacterium tumefaciens* infeta a célula vegetal para a transformação da planta, a região T-DNA é transferida para o interior celular ligando-se ao genoma nuclear (Brown, 2010).

A transformação de plantas pode ser igualmente obtida mediante a introdução de genes de interesse no T-DNA do plasmídeo Ri da bactéria *Agrobacterium rhizogenes* (Shanks & Morgan, 1999). O plasmídeo Ri promove igualmente a integração do plasmídeo Ti, sendo utilizado um sistema binário de vetores (Stafford & Warren, 1993).

A *Agrobacterium rhizogenes* provoca, na natureza, a formação de raízes pilosas (Figura nº 11) capazes de secretar proteínas, sendo muito utilizadas na produção de culturas de raízes pilosas transgênicas *in vitro* e regeneração de plantas inteiras (Pogue *et al.*, 2010).

As raízes pilosas são geneticamente estáveis e têm índice elevado de crescimento, sem necessidade de adicionar reguladores de crescimento ao meio de cultura (Giri & Narasu, 2000). Devido a estas vantagens, as raízes pilosas têm sido utilizadas na produção de proteínas recombinantes, nomeadamente anticorpos como o anticorpo Guy's 13 que reconhece especificamente a glicoproteína de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* (Drake *et al.*, 2003).

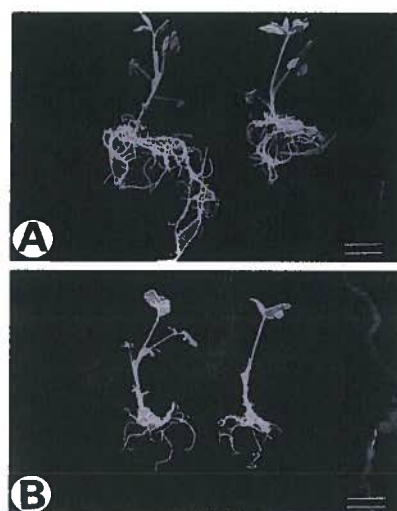


Figura nº 11: A - Raízes pilosas em amendoim transgênico; B - Raízes normais em amendoim (Akasaka *et al.*, 1998).

Os vírus mais utilizados para a realização de transformação indireta pertencem aos géneros *Caulimovirus* e *Geminivirus*. Os genomas dos vírus são pequenos o que torna fácil a sua manipulação *in vitro*. Os caulimovírus são muito específicos relativamente aos hospedeiros vegetais e muito usados em transformação de plantas. A infeção por caulimovírus alastra-se rapidamente pela planta e fica presente na maioria das células vegetais. Os geminivírus têm a vantagem de possuir a capacidade de transformar tanto plantas monocotiledónias como plantas dicotiledónias (Mach, 2014). Contudo, nem sempre conseguem transferir toda a informação genética presente na construção o que, conjuntamente com o possível risco de propagação ou alteração viral, tornam-se vetores pouco utilizados na transformação de plantas (Brown, 2010).

2.2.3.4. Plantas transplastômicas

As células vegetais apresentam material genético no núcleo, nas mitocôndrias e nos cloroplastos. Quando o gene exógeno de interesse é introduzido no material genético cloroplastidial, mediante a técnica de biolística ou através da aplicação de polietilenoglicol, dá lugar à formação de plantas transplastômicas (Yusibov & Rabindran, 2008).

Cada célula vegetal possui até uma centena de cloroplastos e cada cloroplasto contém uma elevada quantidade de ADN, proporcionando uma elevada produção de proteínas recombinantes num curto espaço de tempo (Yap & Smith, 2010).

A produção de proteínas recombinantes produzidas nos cloroplastos é elevada e com formação de uma estrutura conformacional adequada (Sala *et al.*, 2003).

A transformação de cloroplastos é muito utilizada para obter proteínas farmacêuticas na planta do tabaco, embora também tenha sido usada no tomate, na soja e na beringela (Obembe *et al.*, 2011).

2.2.4. Seleção das plantas transgênicas

Após a transformação genética das plantas, é necessário selecionar as células vegetais que foram transformadas das que não foram transformadas. Para isso, são colocadas em meio de cultura contendo os elementos necessários para a regeneração da planta e um componente de seleção, que pode ser um antibiótico ou um herbicida, responsável pelo crescimento das células transformadas (Anami *et al.*, 2013).

Os genes marcadores de seleção, como o gene neomicina fosfotransferase II, conferem resistência a antibióticos. Quando as células vegetais são colocadas em meio de cultura somente as células transformadas irão crescer, eliminando as não transformadas e os organismos não desejáveis (Chrispeels & Sadava, 2003).

Os genes marcadores moleculares conferem fluorescência às células transformadas, sendo visualizada por métodos físicos de microscopia de fluorescência ou radiação ultravioleta. Um exemplo, é a proteína verde fluorescente que proporciona a cor verde às células transformadas (Figura nº 12), sendo visualizada mediante microscopia de fluorescência (Hammond *et al.*, 1999).

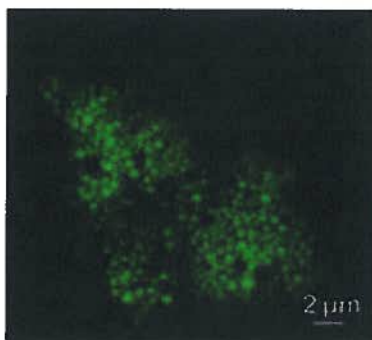


Figura nº 12: A proteína interleuquina-10 evidenciada pela presença da proteína verde fluorescente em células vegetais de tabaco transgênico (Kaldis *et al.*, 2013)

Para verificar a presença ou localização de uma determinada sequência de ADN que foi inserida no genoma da célula vegetal, utilizam-se as técnicas de PCR e Southern blot. A técnica de PCR permite a amplificação de um fragmento de ADN. O gene de interesse é separado em gel de agarose, através da técnica de eletroforese com aplicação de corrente elétrica, ocorrendo a separação dos diferentes fragmentos de acordo com o seu peso molecular. Se o fragmento de ADN é muito pequeno utiliza-se a técnica de hibridização por Southern blot que consiste na utilização de sondas marcadas com substâncias luminescentes ou radioativas (Brown, 2010).

2.3. SISTEMAS DE PRODUÇÃO VEGETAIS

À exceção das plantas comestíveis utilizadas no contexto de imunização passiva, na produção *in vivo* e *in vitro* de proteínas recombinantes por plantas transgênicas os processos de extração, separação e purificação são similares (Stafford & Warren, 1993).

Para a extração das proteínas recombinantes das plantas transgênicas utilizam-se compostos orgânicos polares ou apolares, dependendo da proteína recombinante a extrair. A separação das proteínas recombinantes é efetuada por diferentes técnicas como a filtração, a precipitação e a cromatografia. Utilizam-se frequentemente a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC) (Wilken & Nikolov, 2012).

O teste ELISA ("Enzyme Linked Immunosorbent Assay"), utilizado no processo de quantificação de proteínas recombinantes humanas presentes nas células vegetais,

permitindo detetar e amplificar a reação antígeno-anticorpo pela formação da ligação covalente (Husaini *et al.*, 2011).

2.3.1. Produção *in vivo* de proteínas recombinantes

A produção *in vivo* de proteínas recombinantes humanas de uso farmacêutico consiste na transferência das plantas transgênicas regeneradas para o campo ou estufas. As plantas podem ser colocadas em campo aberto ou em estufas com temperatura, fotoperíodo e humidade controladas. O fotoperíodo, a humidade e o balanço de reguladores de crescimento são fatores que dependem da espécie vegetal (Stafford & Warren, 1993).

A produção de proteínas recombinantes *in vivo* em estufas permite obter condições de produção controladas mas aumenta os custos de produção. A opção de cultivar em estufas depende da quantidade que se quer obter de proteína recombinante e da regulamentação específica de cada país sobre a libertação de plantas transgênicas no ambiente (Boehm, 2006).

A planta utilizada para a produção de proteínas recombinantes *in vivo* deve apresentar uma elevada biomassa, incluindo folhas, sementes e órgãos específicos da planta como tubérculos, para haver um alto rendimento de produção. O tecido onde se acumula a proteína recombinante deve permitir um bom processamento, uma acumulação estável e fácil extração. A acumulação de proteínas recombinantes em sementes permite um alto nível de armazenamento e conservação durante um longo período de tempo, assim como fácil transporte, manutenção da estabilidade e da atividade biológica da proteína recombinante produzida (Hammond *et al.*, 1999). Têm sido utilizadas as sementes de tabaco, trigo, alfalfa e arroz para a acumulação e conservação de anticorpos e antígenos. As leguminosas, por terem um alto conteúdo proteico, apresentam um elevado rendimento de produção de proteínas recombinantes por hectare e a capacidade de formar uma única isoforma da proteína recombinante. A soja é muito usada para a obtenção *in vivo* de caseína e anticorpos, como por exemplo o anticorpo específico contra o vírus Herpes simplex (Stoger *et al.*, 2005).

Os anticorpos recombinantes expressos em plantas transgênicas apresentam estabilidade proteica, da temperatura ambiente até a temperatura de 4°C, podendo ser armazenados e conservados durante um longo período de tempo (Warzecha & Mason,

2003). A acumulação de 1,3% de proteína solúvel de imunoglobulina G recombinante humana foi obtida em folhas de tabaco transgênico, equivalente a um rendimento de produção de 18 Kg de proteína solúvel por cada hectare (Hiatt *et al.*, 1989). Em folhas de tabaco transgênico foi obtida a concentração de 500 µg/g de IgA recombinante humana, sendo a quantidade máxima obtida de um anticorpo em plantas transgênicas (Loza-Rubio & Gómez-Lim, 2006).

As folhas de plantas transgênicas permitem uma elevada expressão de proteínas recombinantes. A alfalfa apresenta uma produção de biomassa de 50 toneladas por hectare ao ano e o tabaco uma produção de biomassa de 17 toneladas por hectare ao ano (Loza-Rubio & Gómez-Lim, 2006).

A alface, o tomate e o milho transgênicos têm sido utilizados para a produção e consumo direto de vacinas comestíveis devido a que apresentam níveis altos de expressão de proteína solúvel e serem consumidos frescos evitando a desnaturação proteica. A subunidade B termolábil da toxina de *Escherichia coli* foi obtida na semente do milho, a uma concentração de 0,1% do peso fresco, apresentando atividade imunogênica em ensaios com ratinhos (Streatfield *et al.* 2003).

2.3.2. Produção *in vitro* de proteínas recombinantes

A produção de proteínas recombinantes *in vitro* é independente das condições ambientais, existência de pragas e contaminantes (Lima & Mota, 2003). A produção de proteínas recombinantes humanas *in vitro* é realizada em suspensões de células vegetais em frascos de Erlenmeyer ou e colocadas em biorreatores sob determinadas condições ambientais e suplementadas com certos componentes para aumentar o rendimento de produção. Várias proteínas recombinantes humanas foram obtidas em suspensões de células vegetais. A interleucina 2 e a interleucina 4, ambas substâncias importantes na função imunológica, foram secretadas por suspensões celulares de tabaco em Erlenmeyers com agitação de 150 rpm e com uma temperatura de 29°C (Magnuson *et al.*, 1998).

O anticorpo monoclonal anti-HBsAg foi obtido em culturas de células de tabaco em suspensão (Yano *et al.*, 2004). O antígeno de superfície do vírus da Hepatite B foi obtido em suspensões de células de soja transgênica (Smith *et al.*, 2002).

A proteína α -1-antitripsina recombinante humana foi obtida em suspensões efetuadas em meio basal rico em aminoácidos contendo 30 g/L de sacarose e incubadas no escuro a uma temperatura de 25 °C e com agitação de 130 rpm (McDonald *et al.*, 2005).

Para a produção de compostos de forma controlável e para um maior nível de produção utilizam-se biorreatores. Há diferentes tipos de biorreatores de acordo com a dimensão, com o meio de cultura e o design. A escolha do tipo de biorreator, depende das características da espécie vegetal e da proteína recombinante que se vai obter. Existem vários tipos de biorreatores mas os mais utilizados são os biorreatores de agitação mecânica ou "Stirred Tank Reactor" (Figura nº 13) e os biorreatores de recirculação de ar ou "Air-Lift" (Lima & Mota, 2003) (Figura nº 14).

Os biorreatores de agitação mecânica proporcionam o arejamento da cultura, a mistura homogênea, um elevado grau de transferência de massa, pouca massa gasosa e prevenção de formação de agregados celulares de grandes dimensões (Hooker *et al.*, 1990). Os biorreatores de recirculação de ar (Figura nº 15) possuem maior capacidade de manutenção das condições de assepsia e melhor distribuição das forças de tensão, sendo por isso os mais utilizados (Huang *et al.*, 2009).

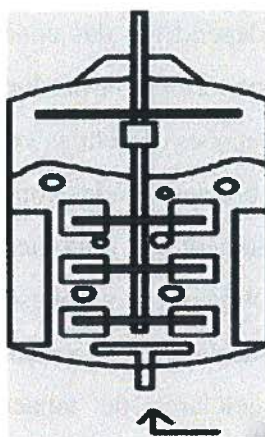


Figura nº 13: Biorreator de agitação mecânica (Huang & McDonald, 2009)

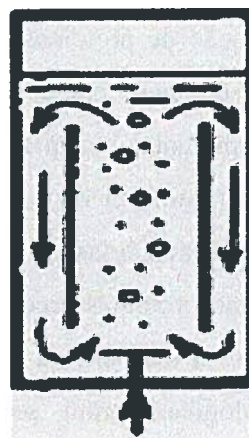


Figura nº 14: Biorreator de recirculação de ar (Huang & McDonald, 2009)

O processo de produção de proteínas recombinantes em biorreatores é realizado com concentrações controladas de minerais, carboidratos, reguladores de crescimento, pH, oxigênio e dióxido de carbono para a obtenção de uma taxa de produção adequada, evitar a contaminação e ter reduzidos custos de produção (Sharma & Sharma, 2009).



Figura nº 15: Biorreator de recirculação de ar com suspensão de *Salvia cinnabarina* (Ruffoni *et al.*, 2009)

Diversas proteínas recombinantes humanas têm sido expressas em biorreatores. O anticorpo específico de estreptococos foi obtido em biorreator de agitação mecânica utilizando células de tabaco transgênico (Wongsamuth & Doran, 1997). A proteína GM-CSF recombinante humana foi obtida em biorreator de agitação mecânica, utilizando células de tabaco transgênico (Lee *et al.*, 2004). Em células de arroz transgênico foi obtida a concentração de 45 mg/L de α -1-antitripsina recombinante humana em biorreator de agitação mecânica (Trexler *et al.*, 2002). A interleucina-12 recombinante foi obtida em raízes pilosas de tabaco transgênico, utilizando o biorreator "Air-Lift", com temperatura de 25°C e agitação de 100 rpm (Huang & McDonald, 2012).

3. PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS FARMACÊUTICAS POR PLANTAS TRANSGÊNICAS

3.1. Citoquinas

Várias plantas têm sido usadas para a produção de citoquinas recombinantes (Tabela nº 4). As citoquinas representam um conjunto de proteínas que regulam a hematopoiese e a resposta imunológica sendo responsáveis pela comunicação entre as células do sistema imunológico (Sirko *et al.*, 2011).

Para a obtenção de interleucina-4 recombinante humana foram transformadas as células vegetais do tabaco e as células vegetais da batata, utilizando a *Agrobacterium tumefaciens* contendo o gene hIL-4 e o promotor CaMV35S para controlar a expressão genética. A concentração de interleucina-4 obtida foi de 0,1% de proteína solúvel total nas folhas de tabaco e 0,08% de proteína solúvel total no tubérculo da batata, sendo demonstrada sua atividade biológica ao promover a proliferação das células T, em ensaios *in vitro*. A produção da proteína interleucina-4 recombinante humana proporciona a potencialidade para o tratamento de doenças virais e autoimunes (Ma *et al.*, 2005).

Gutiérrez-Ortega *et al.* (2005), obtiveram 4,3 µg por g de interleucina-12 recombinante em tomate transgênico sendo a transformação das células vegetais efetuada por *Agrobacterium tumefaciens*. A atividade biológica da proteína recombinante foi demonstrada em ensaios utilizando ratinhos, sendo igual à atividade biológica da interleucina-12 obtida por células de "Chinese Hamster Ovary" que se encontra disponível no mercado (Sánchez-Hernández *et al.*, 2010).

A citoquina interleucina-13 recombinante humana foi obtida na planta de *Nicotiana tabacum* L. transgênica, alcançando a concentração de 0,15% da proteína solúvel total em cultura de células em suspensão. Foi utilizado o gene hIL-13 e foi verificada a sua presença no genoma da planta por técnica de PCR. Foram efetuados ensaios *in vitro* com a interleucina-13 recombinante, tendo sido demonstrado que possui atividade biológica idêntica à interleucina-13 humana. A interleucina-13 tem sido expressa em sistemas de expressão de bactérias obtendo um reduzido rendimento de produção e em células de roedores embora a interleucina-13 recombinante não apresentasse atividade biológica (Wang *et al.*, 2008).

Ning *et al.* (2008), obtiveram 14 µg de GM-CSF por cada grão de arroz transgênico. A transformação foi realizada por bombardeamento de micropartículas e cultivado em estufas para o seu desenvolvimento. Na construção genética foram utilizados o gene hgm-csf para a expressão de GM-CSF recombinante, o gene marcador de seleção hpt (higromicina fosfotransferase) que confere resistência ao antibiótico higromicina B e o gene marcador molecular gus (β-glucuronidase). Foi demonstrado, em ensaios *in vivo*, a sua eficácia e atividade biológica, sendo necessário o início de ensaios clínicos em humanos para administração oral de GM-CSF recombinante humana (Sirko *et al.*, 2011).

Tabela nº 4 - Exemplos de citoquinas expressas em plantas transgênicas

Molécula	Planta	Nível de expressão	Referência
Interleucina-4	Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i> L.)	0,1% PST* Folhas <i>In vivo</i>	Ma <i>et al.</i> , 2005
	Batata (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	0,08% PST* Tubérculo <i>In vivo</i>	
Interleucina-12	Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	4,3 µg/g <i>In vivo</i>	Gutierrez-Ortega <i>et al.</i> , 2005
Interleucina-13	Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i> L.)	0.15% PST* <i>In vitro</i>	Wang <i>et al.</i> , 2008
GM-CSF	Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	14 µg Semente <i>In vivo</i>	Ning <i>et al.</i> , 2008
Eritropoietina	Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i> L.)	88 ng/mg PST* <i>In vivo</i>	Conley <i>et al.</i> , 2009
Interleucina-10	Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	2 mg/g Semente <i>In vivo</i>	Fujiwara <i>et al.</i> , 2010

*PST - Proteína Solúvel Total

A concentração de 88 ng/mg de proteína solúvel total de eritropoietina recombinante humana foi obtida em folhas de tabaco transgênico transformadas por *Agrobacterium tumefaciens* contendo o gene EPO humano. A regulação da expressão gênica foi efetuada pelo promotor CaMV35S. A atividade biológica da molécula foi demonstrada em ensaios *in vivo*, utilizando ratinhos (Conley *et al.*, 2009).

Fujiwara *et al.* (2010) obtiveram 2 mg/g de interleucina-10 recombinante humana em arroz transgênico com conformação estrutural adequada. A transformação

foi realizada com *Agrobacterium tumefaciens* contendo o gene IL-10. Em ensaios clínicos de fase II, foi verificado que ainterleucina-10 recombinante humana obtida em arroz transgênico apresenta maior eficácia do que a interleucina-10 comercializada (Sirko *et al.*, 2011).

3.2. Proteínas do sangue

Diversas proteínas do sangue têm sido expressas por plantas transgênicas (Tabela nº 5). A proteína C recombinante humana foi obtida em folhas de tabaco transgênico mediante transformação indireta por *Agrobacterium tumefaciens* e utilizado o promotor CaMV35S. A quantidade obtida de proteína C recombinante humana foi superior a 10% da proteína solúvel total, sendo a proteína recombinante idêntica à proteína C humana (Collins & Shepherd, 1996).

Tabela nº 5 - Exemplos de proteínas do sangue expressas por plantas transgênicas

Molécula	Planta	Nível de expressão	Referências
Proteína C	Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i> L.)	> 10% PS* <i>In vivo</i>	Collins & Shepherd, 1996
Transferrina	Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	10 g/kg <i>In vivo</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2010
Fator de coagulação sanguíneo IX	Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i> L.)	----- <i>In vivo</i>	Verma <i>et al.</i> , 2010
Albumina sérica humana	Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	10,6% PTS* <i>In vivo</i>	He <i>et al.</i> , 2011

*PS - Proteína Solúvel; *PTS - Proteína Solúvel Total

A albumina sérica humana é uma proteína de estrutura globular com função de estabilizar o volume sanguíneo, o transporte de moléculas, entre outras (Peters, 1995). He *et al.* (2011) obtiveram 10,6% da proteína solúvel total de albumina sérica humana em cada grão de arroz, mediante a técnica de bombardeamento de partículas inserindo o gene HSA. A proteína recombinante humana produzida apresentou uma taxa de purificação ao nível de 99%. Em ensaios *in vivo*, a albumina sérica

recombinante humana promoveu a redução de cirrose hepática e promoveu o crescimento celular em ratinhos. Demonstrou-se ainda que tem a mesma imunogenicidade que a albumina sérica derivada do plasma humano em estudos *in vitro* e em animais (Sack *et al.*, 2015).

Em arroz transgênico cultivado em estufas foi obtida a concentração de 10 g/kg de transferrina com 95% de pureza. A transformação genética deu-se com transferência do gene hTF em *Agrobacterium tumefaciens*. Apresentou identidade similar e atividade biológica igual à transferrina humana, sendo capaz de efetuar ligações reversíveis ao ferro e promover o crescimento celular (Zhang *et al.*, 2010).

O fator de coagulação sanguíneo IX, indicado no tratamento de hemofilia B, foi expresso em cloroplastos de tabaco transgênico mediante inserção do gene FIX. Foi verificado em ensaios *in vivo*, utilizando ratinhos, que a proteína chegou ao sistema circulatório duas horas depois da administração oral, apresentando eficácia e atividade biológica (Verma *et al.*, 2010).

3.3. Anticorpos

A planta mais utilizada para a expressão de anticorpos recombinantes humanos é o tabaco transgênico porque é a planta mais estudada para a produção de proteínas recombinantes, apresenta maior segurança e podem ser usados muitos tipos diferentes de promotores para promover a expressão das proteínas recombinantes nas diferentes partes da planta (Ma *et al.*, 2003).

Os anticorpos são estruturas proteicas que desempenham um papel importante na resposta imunológica ao reconhecerem antígenos específicos, neutralizando-os e prevenindo o desenvolvimento de doenças. Também são utilizados como auxiliares de diagnóstico de laboratório (Schillberg *et al.*, 2003).

Larrick *et al.* (2001) obtiveram o anticorpo quimérico de secreção IgA/IgG com capacidade de reconhecer o antígeno de superfície da bactéria *Streptococcus mutans* que provoca a cárie dental. A planta transformada foi a planta de *Nicotiana tabacum* L. e foi obtida uma concentração de 500 µg/g nas folhas. Foi demonstrado, em ensaios clínicos de fase II, que após remoção da bactéria o anticorpo recombinante previne nova colonização da mesma tendo este sido aprovado para comercialização como dispositivo

médico na União Europeia, sob o nome comercial de CaroRx™ (Obembe *et al.*, 2011) (Tabela nº 6).

Em culturas de células de tabaco transgênico em suspensão foi obtida a concentração de 0,6% da proteína solúvel total do anticorpo monoclonal recombinante humano que atua contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B. A construção genética, possuindo o gene CL4MAb, foi efetuada com *Agrobacterium tumefaciens* e utilizando o promotor CaMV35S. Em ensaios *in vivo*, foi demonstrada que a atividade da proteína recombinante produzida é igual à atividade biológica das imunoglobulinas humanas anti-Hepatite B utilizadas clinicamente (Yano *et al.*, 2004).

Tabela nº 6 - Exemplos de anticorpos produzidos em tabaco transgênico (Adaptada de Wiktorek-Smagurek *et al.*, 2012)

Molécula	Aplicação	Produção	Referências
Anticorpo quimérico IgA/IgG	Cárie dental	500 µg/g Folha <i>In vivo</i>	Larrick <i>et al.</i> , 2001
Anticorpo monoclonal anti-Hepatite B	Hepatite B	0,6% PST* <i>In vitro</i>	Yano <i>et al.</i> , 2004
Anticorpo monoclonal Cancro	Antitumoral	1,2mg/Kg Folha <i>In vivo</i>	Rodriguez <i>et al.</i> , 2005
Anticorpo monoclonal	Raiva	30 µg/g <i>In vitro</i>	Girard <i>et al.</i> , 2006
Imunoglobulina G2a	Antitumoral	30mg/Kg Folha <i>In vivo</i>	Brodzik <i>et al.</i> , 2006
Anticorpo monoclonal H10	Antitumoral	100mg/Kg Folha <i>In vivo</i>	Villani <i>et al.</i> , 2009
Anticorpo monoclonal 2G12	Anti-HIV1	11,9µg/ml -----	Sack <i>et al.</i> , 2015

*PST - Proteína Solúvel Total

O anticorpo recombinante humano específico contra o recetor do factor de crescimento epidérmico foi expresso em folhas de *Nicotiana tabacum* L. transformadas com *Agrobacterium tumefaciens*, obtendo uma concentração de 1,2 mg/Kg. Em ensaios de imunofluorescência indireta, foi demonstrado que o anticorpo recombinante reconhece o recetor presente nas células tumorais humanas (Rodríguez *et al.*, 2005).

A concentração de 30 µg por g de peso fresco do anticorpo monoclonal recombinante humano contra o vírus da raiva foi obtida em suspensões celulares de células vegetais de tabaco transgênico. Foi verificado, mediante ensaios realizados *in vitro*, que a atividade neutralizante do anticorpo monoclonal recombinante humano produzido em tabaco transgênico apresenta a mesma atividade biológica que o anticorpo monoclonal recombinante produzido em células humanas (Girard *et al.*, 2006).

A imunoglobulina IgG2a foi expressa em folhas de tabaco transgênico por transformação genética efetuada por *Agrobacterium tumefaciens*, obtendo a concentração de 30 mg/kg de peso fresco. Em ensaios utilizando ratinhos, foi demonstrado que a imunoglobulina IgG2a reconhece o antígeno específico, produzido por células neoplásicas, ligando-se a este e inibindo a evolução do tumor (Brodzik *et al.*, 2006).

O anticorpo monoclonal H10 foi expresso em tabaco por Villani *et al.* (2009), com uma concentração de 100 mg/kg de peso fresco, tendo sido feita a transformação indireta por *Agrobacterium tumefaciens*. Foi demonstrado, mediante análise imunohistoquímica, o reconhecimento específico do antígeno tenascina C responsável pela formação de tumores, revelando acumulação específica à volta dos tecidos tumorais (Villani *et al.*, 2009).

O anticorpo monoclonal 2G12 responsável por reconhecer o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 foi expresso em folhas de *Nicotiana tabacum* L. transgênico. A transformação genética foi realizada com *Agrobacterium tumefaciens*. Para a produção *in vivo* do anticorpo monoclonal 2G12 com atividade neutralizante anti-HIV1, a planta do tabaco transgênica foi colocada em estufas com uma temperatura de 20°C, humidade entre 45%-50% e 50% de luz natural. Em ensaios *in vivo* foi demonstrada a atividade biológica do anticorpo recombinante, estando a decorrer ensaios clínicos de fase I (Sack *et al.*, 2015).

3.4. Vacinas

As vacinas são produzidas para proporcionar proteção contra agentes patogénicos, por meio de desenvolvimento de anticorpos contra o antígeno específico que se encontra neutralizado. Quando ocorre um novo contacto com o mesmo antígeno

há uma resposta imunológica secundária que neutraliza o agente patogénico, prevenindo o desenvolvimento da infeção (Glick & Pasternak, 1994).

McCormick *et al.* (1999) utilizaram o sistema de expressão de culturas de células de *Nicotiana benthamiana* para a expressão de idiótipos de linfoma folicular de células B. A transformação genética das células de tabaco transgénico foi realizada por vírus e foi obtida cerca de 30 mg/Kg de peso seco em folhas de tabaco com 95% de pureza. Em ensaios *in vitro* e *in vivo*, utilizando ratinhos, verificou-se eficácia e segurança do fragmento de anticorpo scFv recombinante. Os ensaios clínicos em humanos decorrem em fase I (McCormick *et al.*, 2008) (Tabela nº 7).

Tabela nº 7 – Exemplos de vacinas produzidas por plantas transgênicas

Molécula	Planta	Nível de Produção	Referências
Idiótipo Linfoma não-Hodgkin	Tabaco (<i>Nicotiana benthamiana</i>)	30,2 mg/Kg Folhas <i>In vivo</i>	McCormick <i>et al.</i> , 1999
Proteína VP6 Cápside Rotavírus	Batata (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	0,01% PST* <i>In vivo</i>	Yu & Landgridge, 2003
Proteína L1 HPV-16	Tabaco (<i>Nicotiana benthamiana</i>)	24% PST* <i>In vivo</i>	Fernández-San Millán <i>et al.</i> , 2008
Proteína da cápside do vírus Norwalk	Tabaco (<i>Nicotiana benthamiana</i>)	0,8 mg/g Folha <i>In vivo</i>	Santi <i>et al.</i> , 2009
Vacina H5N1	Tabaco (<i>Nicotiana benthamiana</i>)	50 mg/Kg <i>In vivo</i>	Shoji <i>et al.</i> , 2011
Subunidade HAC1	Tabaco (<i>Nicotiana benthamiana</i>)	90 mg/Kg <i>In vivo</i>	Shoji <i>et al.</i> , 2011

*PST - Proteína Solúvel Total

Adaptada de Wiktorek-smagur *et al.*, 2012

O gene da proteína VP6 da cápside do Rotavírus foi inserido no genoma de *Solanum tuberosum* L. através de *Agrobacterium tumefaciens* obtendo-se 0,01% de proteína solúvel total. Foi demonstrada a identidade da proteína e atividade biológica *in vivo*, em ratinhos (Yu & Langridge, 2003).

Fernández-San Millán *et al.* (2008), obtiveram em cloroplastos de *Nicotiana tabacum* L. a concentração de 3 mg/g peso fresco, equivalente a 24% proteína solúvel total, da proteína da cápside do vírus do papiloma humano subtipo 16. A transformação foi efetuada por bombardeamento de micropartículas com introdução do gene L1 do vírus do papiloma humano para a expressão da proteína recombinante. A proteína demonstrou atividade biológica em ratinhos tendo sido detetados anticorpos neutralizantes.

Santi *et al.* (2009), descreveram a acumulação de partículas imunogénicas recombinantes do vírus Norwalk, causante de gastroenterites, obtendo a concentração de 0,8 mg/g em folhas de *Nicotiana benthamiana* após transformação genética por *Agrobacterium*. A imunogenicidade foi alcançada em ratos e humanos, provando a atividade biológica e a formação de uma vacina. Em ensaios clínicos de fase I demonstrou segurança e resposta imunológica rápida dos linfócitos B (Sundararajan *et al.*, 2015).

Shoji *et al.* (2011) obtiveram em folhas de *Nicotiana benthamiana* a subunidade HAC1 da hemaglutinina recombinante do vírus da influenza H1N1 e a subunidade HAI-05 da hemaglutinina recombinante do vírus da influenza H5N1, com concentrações de 90 mg/Kg e 50 mg/Kg, respetivamente. Em ensaios *in vivo*, a molécula apresentou propriedades imunogénicas neutralizando os anticorpos específicos em ambas estirpes dos vírus. Devido a estes resultados, estão em curso ensaios clínicos em humanos, estando em fase II a vacina para o vírus H1N1 e a vacina H5N1 está a ser comercializada (Pelosi *et al.*, 2012).

3.5. Insulina

A insulina tem sido produzida em várias plantas transgénicas *in vivo* e *in vitro*. Trata-se de uma hormona sintetizada pelo pâncreas e é constituída por duas cadeias polipeptídicas ligadas por pontes dissulfeto. Esta hormona diminui o nível de glucose no sangue, sendo indicada em doentes diabéticos (Ratledge & Kristiansen, 2001).

A insulina recombinante humana foi produzida em sementes de *Arabidopsis thaliana* L. por Nykiforuk *et al.* (2006) (Tabela nº 8), representando a concentração de 0,13% de proteína total acumulada na parte lípida das sementes, com atividade

biológica verificado em ensaios *in vitro* e *in vivo*. A acumulação nas sementes de *Arabidopsis thaliana* L. não interfere com o metabolismo endógeno da planta, permite o seu armazenamento sem perder a estabilidade proteica e a purificação é mais rápida e económica (Baeshen *et al.*, 2014).

Boothe *et al.* (2010), obtiveram 1,2% da proteína solúvel total de insulina recombinante humana em sementes de cártamo produzidas *in vivo*, sendo secretada na parte lipídica da semente onde são melhores as condições de armazenamento, conservação e extração da insulina recombinante produzida. Os ensaios *in vivo* realizados em ratos e macacos, provaram a eficácia da molécula e a sua segurança, tendo sido iniciados os ensaios clínicos de fase III (Thomas *et al.*, 2011).

Tabela nº 8 - Exemplos de produção de insulina recombinante humana em várias plantas transgênicas

PLANTA	NÍVEL DE PRODUÇÃO	REFERÊNCIAS
Arabeta (<i>Arabidopsis thaliana</i> L.)	0,13% Proteína Total <i>In vivo</i>	Nykiforuk <i>et al.</i> , 2006
Cártamo (<i>Carthamus tinctorius</i>)	1,2% PST* <i>In vivo</i>	Boothe <i>et al.</i> , 2010
Tabaco (<i>Nicotiana benthamiana</i>)	47% PST* Folhas <i>In vivo</i>	Boyhan & Daniell, 2011
Alface (<i>Lactuca sativa</i>)	53% PST* Folhas <i>In vivo</i>	

*PST - Proteína Solúvel Total

O gene da proinsulina foi introduzido nos cloroplastos das folhas de tabaco e das folhas de alface transgênicos pela técnica de bombardeamento de partículas. Os meios de cultura foram colocados no escuro durante 48 horas. Para a seleção das células vegetais transformadas foram utilizados os meios contendo 500 mg/L de espectinomicina para as células do tabaco e 100 mg/L de espectinomicina para as células da alface. A quantidade de proinsulina recombinante humana chegou a alcançar 47% de proteína total em folhas de tabaco e 53% de proteína total em folhas de alface. A atividade biológica foi demonstrada *in vivo* (Boyhan & Daniell, 2011).

3.6. Outras proteínas recombinantes terapêuticas

Uma grande variedade de outros agentes terapêuticos são expressos em plantas apresentando identidade das proteínas produzidas com as do organismo humano (Goldstein & Thomas, 2004).

Chong & Langridge (2000), inseriram o gene da lactoferrina humana no genoma da batata (*Solanum tuberosum* L.) transformado por *Agrobacterium tumefaciens*. Foi obtida a concentração de 0,1% de proteína solúvel total tendo apresentado, em ensaios *in vivo*, atividade biológica antimicrobiana contra quatro agentes bacterianos patogênicos do ser humano, tendo indicação em casos de inflamação e imunomodulação. Efetuam-se ensaios clínicos de fase II, testando a sua eficácia através da ingestão de batata transgênica contendo a lactoferrina (Wiktorek-Smagur *et al.*, 2012).

Rabindran *et al.* (2009), obtiveram uma concentração de 60 mg/Kg de hormona de crescimento recombinante humana em folhas de *Nicotiana benthamiana* utilizando a transformação indireta por vírus do mosaico do tabaco. A atividade biológica da proteína recombinante produzida foi demonstrada em ensaios com ratinhos, tendo sido observado um aumento de peso mediante a administração de 60 µg de hormona de crescimento recombinante humana, durante 10 dias.

As proteínas β -defensinas humanas, tipo hBD-1 e hBD-2 apresentam um amplo espectro de atividade antimicrobiana. Estas proteínas foram obtidas em plantas de tabaco transgênico, mediante a transformação por *Agrobacterium tumefaciens*. Para a seleção das células transformadas foi utilizado o meio Murashige e Skoog com concentração de 300 mg/L de canamicina. O nível de produção atingiu 1,27 µg hBD-1/g de tecido vegetal e 1,29 µg hBD-2/g de tecido vegetal. Ambas proteínas demonstraram atividade biológica *in vitro*, com resultados de 75% de inibição do crescimento de *Escherichia coli* e 85% de inibição do crescimento de *Salmonella typhimurium* (Patro *et al.*, 2014).

A concentração de 2,2% de proteína solúvel total de glutamato descarboxilase inativa foi obtida por Avesani *et al.* (2010), através da transformação das folhas de *Nicotiana tabacum* L. por *Agrobacterium tumefaciens*. Foi demonstrada atividade biológica em ensaios *in vitro* fazendo com que a sua produção em tabaco transgênico seja uma estratégia para produzir a proteína com qualidade a custos reduzidos de produção para o tratamento Diabetes Mellitus tipo 1 autoimune. Encontra-se em ensaios clínicos de fase III (Avesani *et al.*, 2010).

4. AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO

4.1. COMPARAÇÃO COM PROTEÍNAS FARMACÊUTICAS DE OUTRAS ORIGENS

Os sistemas de expressão de proteínas recombinantes de uso farmacêutico utilizando bactérias apresentam elevada quantidade de proteína recombinante produzida a níveis baixos de custos de produção. No entanto, ao contrário das plantas transgênicas, não são capazes de realizar as modificações pós-translacionais adequadas para a identidade e funcionalidade da proteína recombinante sintetizada (Demais & Vaishnav, 2009). A presença de contaminantes no processo de produção de proteínas recombinantes em bactérias requer a purificação fazendo com que os custos de produção aumentem (Houdebine, 2009).

As leveduras, embora sejam organismos eucariotas, não são capazes de realizar algumas modificações pós-translacionais necessárias para produzir proteínas recombinantes humanas complexas. Há risco de presença de contaminantes sendo necessário realizar processos de purificação (Gomord *et al.*, 2005).

As células de mamífero produzem proteínas mais semelhantes às humanas mas têm altos custos de produção e existe risco contaminações por vírus ou príões (Gomord & Faye, 2004).

Os animais transgênicos, em comparação com as plantas transgênicas, apresentam pouca capacidade para aumentar a escala de produção de proteínas recombinantes no leite ou ovos e apresentam o risco de transmissão de agentes patogênicos como vírus, príões e oncogenes, sendo necessário um processo de purificação mais complexo (Houdebine, 2009).

Quando se necessita de uma grande produção de proteínas recombinantes farmacêuticas, as plantas transgênicas constituem o sistema de expressão mais económico porque as plantas têm a capacidade de produzir modificações pós-translacionais e requerem apenas como água, minerais, luz e dióxido de carbono (Vianna *et al.*, 2011). O processo de purificação é menor porque o risco de contaminantes é reduzido e os agentes patogênicos das plantas não causam doenças nos humanos (Boothe *et al.*, 2010). As proteínas recombinantes podem ser armazenadas em folhas e sementes por períodos prolongados e em diferentes condições ambientais com posterior extração mantendo a estabilidade e a eficácia (Daniell *et al.*, 2001).

Os cloroplastos das plantas transgênicas são capazes de sintetizar proteínas com estrutura complexa em elevada concentração e de forma estável, ao contrário dos sistemas de expressão por *Escherichia coli*, células de roedores ou insetos, onde pode ocorrer degradação das proteínas recombinantes produzidas (Ferreira-Camargo *et al.*, 2015).

A produção de vacinas recombinantes por plantas transgênicas possui mais e melhores benefícios face a outros sistemas de expressão, nomeadamente a eficácia, segurança, estabilidade. No caso da produção em sementes não é necessária a refrigeração e podem ser administradas por via oral como alimentos (Obembe *et al.*, 2011). A produção de vacinas comestíveis cria uma maior facilidade de acesso da vacinação pois os custos de produção são reduzidos, apresenta menores custos de armazenamento e refrigeração e mantém a estabilidade da proteína recombinante (Sharma & Sood, 2011).

Os custos de produção de citoquinas são elevados e as plantas transgênicas, por serem um sistema de expressão de proteínas recombinantes económico, são um meio eficiente para reduzir esses mesmos custos (Sirko *et al.*, 2011). A identidade funcional da eritropoietina recombinante humana produzida por plantas transgênicas tem grande importância pois permite ultrapassar a limitação e os custos elevados verificados na produção por células de mamíferos (Conley *et al.*, 2009).

Como a procura da hormona do crescimento humana, indicada em casos de nanismo, está a aumentar é necessário haver maior produção a custos mais baixos. Desta forma, a sua expressão por plantas transgênicas poderá vir a ser uma alternativa económica, segura e eficaz (Obembe *et al.*, 2011).

A expressão de insulina recombinante em plantas de tabaco e alface transgênicos é elevada e tem custos reduzidos de produção. A insulina recombinante expressa pode ficar armazenada durante longos períodos nas folhas, mantendo a estabilidade proteica e atividade biológica em humanos (Boyhan & Daniell, 2011). A insulina comercial produzida por *Escherichia coli*, requer um elevado investimento de produção e custos elevados de extração e purificação. A obtenção de insulina em sementes transgênicas de cártamo reduz 70% dos custos de produção relativamente à insulina produzida por *E. coli*, sendo a insulina recombinante produzida nos dois sistemas, bioequivalente (Boothe *et al.*, 2009).

O anticorpo monoclonal humano 2F5 que atua contra o HIV-1, produzido em tabaco e em células de mamífero de "Chinese Hamster Ovary", possui propriedades

cinéticas, capacidade de ligação ao HIV-1 e atividade neutralizante indistinguíveis (Sack *et al.*, 2007).

A produção da enzima glucocerebrosidase em células de "Chinese Hamster Ovary", é dispendiosa e a glicosilação não é eficaz pois não adiciona cadeias de manose à estrutura proteica recombinante. Desta forma, a produção em células de cenoura transgênica torna-se mais rentável e a glicosilação é igual à humana (Shaaltiel *et al.*, 2007).

A produção da imunoglobulina 2G12 em tabaco transgênico é mais econômica e rápida do que em células de mamífero. Mediante ensaios *in vitro*, verificou-se que ambas imunoglobulinas têm atividade biológica similar (Sainsbury *et al.*, 2010).

A proteína de superfície PyMSP4/5 do parasita *Plasmodium yoelii* expressa em tabaco transgênico é, desde o ponto de vista estrutural, similar à produzida por *Escherichia coli*. Depois de um longo período de armazenamento nas folhas secas da planta transgênica, continua a apresentar atividade biológica, em ensaios *in vitro* (Webster *et al.*, 2009).

A interleucina-10 recombinante humana produzida por plantas transgênicas é mais eficaz do que a comercializada (Fujiwara *et al.*, 2010).

A enzima glutamato descarboxilase é produzida em células de insetos com elevados custos de produção, reduzido rendimento e dificuldade no aumento de escala. As plantas oferecem uma alternativa mais econômica para a produção desta enzima para o tratamento de Diabetes Mellitus, sem perder a qualidade da proteína recombinante formada (Avesani *et al.*, 2010).

4.2. AVALIAÇÃO DE RISCOS DA UTILIZAÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS PARA A PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS FARMACÊUTICAS

Os riscos relacionados com as culturas de plantas transgênicas envolvem a segurança alimentar e a preservação do meio ambiente. A segurança alimentar trata da alergenicidade e toxicidade das proteínas em humanos e animais. Os riscos ambientais abarcam a possível extinção da biodiversidade, a presença de toxinas na água dos solos e a transferência de genes (Chrispeels & Sadava, 2003).

O risco para a saúde pública envolve a passagem dos genes para os humanos. Para evitar a transferência dos genes utilizam-se espécies vegetais, como a planta do tabaco ou alfalfa, que não formam parte do consumo humano como uma das várias medidas para evitar o risco de ingestão de proteínas recombinantes (Houdebine, 2009). Os intrões vegetais, inseridos na construção genética, permitem que somente haja expressão dos genes de interesse, assim como a extremidade esquerda e direita da *Agrobacterium tumefaciens* que apresenta afinidade para o genoma vegetal (Miki & McHugh, 2004).

Para evitar a contaminação de genes não desejáveis para culturas vizinhas em campos abertos efetua-se a produção de proteínas recombinantes em suspensões celulares, biorreatores ou estufas, evitando a disseminação de pólenes de plantas transgênicas. Para maior segurança, podem ser utilizadas espécies vegetais masculinas estéreis (Obembe *et al.*, 2011) e o material genético exógeno pode ser inserido nos cloroplastos (Yap *et al.*, 2010). A utilização de sementes geneticamente modificadas para não germinarem e a introdução de genes suicidas na construção genética são outras possibilidades para evitar a disseminação de pólenes de plantas transgênicas para culturas vizinhas em campos abertos (Obembe *et al.*, 2011).

Embora tenham sido realizados estudos toxicológicos e de alergenicidade, não existe a completa certeza sobre os riscos para a saúde pública da ingestão de vacinas comestíveis na cadeia alimentar, pela dose desajustada que possa ser administrada ou pelo aparecimento de efeitos secundários (Kirk *et al.*, 2005).

4.2.1. Questões sociais e éticas

A avaliação ética e moral sobre as plantas transgênicas incidem na transformação genética, nas consequências da utilização das plantas transgênicas, nos riscos e benefícios do consumo de OGMs e nos riscos de contaminação alimentar e ambiental (Robert *et al.*, 2006). A transformação genética das plantas é ética e moralmente errada quando se danifica propositamente a planta e quando ocorre interferência com a evolução natural (Andric, 2011).

A ética da virtude centra-se na moral e atitudes pessoais do indivíduo que realiza a transformação genética para promover o bem estar geral da população (Gregorowius *et al.*, 2012). As condições éticas para a investigação clínica baseiam-se no valor social

e científico da utilização de plantas transgênicas e pelo consentimento informado e respeito pelos indivíduos (Emanuel *et al.*, 2015).

A biologia molecular e a tecnologia do ADN recombinante são matérias científicas e específicas, sendo desconhecidas para uma parte da população. A falta de informação e a informação equivocada sobre estas matérias resulta em uma desconfiança e receio por parte dos consumidores sobre a produção e comercialização de proteínas recombinantes por plantas transgênicas (Obembe *et al.*, 2011). Existe a dúvida sobre a competência das instituições que regulam os OGMs e que as mesmas não compreendem a preocupação por parte dos consumidores (Bawa & Anilakumar, 2012).

A comunicação social não aborda o contexto inteiro da importância da utilização de plantas transgênicas, e somente fala das desvantagens e dos possíveis perigos que pode levar e a incerteza das consequências que podem surgir. Desta forma, a população recebe conceitos errados e incompletos sobre o papel da biotecnologia vegetal e os riscos associados aos OGMs (Chrispeels & Sadava, 2003).

A falta de informação e o receio por parte da população fazem com que surja uma pressão social que dificulta a autorização de introdução no mercado de proteínas recombinantes expressas por plantas, assim como o baixo investimento para a sua produção. Por conseguinte, existem poucas empresas que trabalham com culturas de células vegetais transgênicas (Singh & Singh, 2014).

De acordo com o relatório do International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications (ISAAA, 2014), a produção de plantas transgênicas tem vantagens como diminuir a fome entre as populações, compensar carências nutricionais, aumentar a sustentabilidade dos agricultores e prevenir a mudança climática devido à redução da utilização de pesticidas (ISAAA, 2014).

Vários países de terceiro mundo necessitam de desenvolver vacinas para imunização em massa ou enzimas com valor diagnóstico, a preços reduzidos. Para tal, coordenam apoios governamentais de projetos para a produção de proteínas recombinantes por plantas transgênicas (Molefe, 2010).

O projeto Pharma-Planta, criado pela Comissão Europeia, co-financia a produção de proteínas recombinantes por plantas transgênicas. Mediante este projeto, obteve-se o anticorpo monoclonal MAb2F5 do HIV-1 em milho transgênico na África do Sul, entre outras proteínas recombinantes (Barros & Nelson, 2010).

5. CONCLUSÕES

O sistema de expressão de proteínas recombinantes utilizando plantas transgênicas apresenta diversas vantagens como segurança pelo baixo risco de contaminação por agentes patogênicos, elevada produção de proteínas recombinantes de uso farmacêutico com atividade biológica e custos reduzidos de produção quando produzidas *in vivo* (Daniell *et al.*, 2001).

Embora as células de mamífero humanas sejam o sistema de expressão que produzem as proteínas recombinantes mais eficazes, têm menos possibilidade de aumento de escala, apresentam mais riscos de contaminação e é mais dispendiosa. As bactérias e leveduras têm um elevado rendimento de produção de proteínas recombinantes mas o processo de glicosilação é incompleto. Desta forma, a utilização das plantas transgênicas para a produção de proteínas recombinantes de uso farmacêutico está a aumentar devido às vantagens que possui (Houdebine, 2009).

A produção de proteínas recombinantes por plantas transgênicas realiza-se, *in vivo*, obtendo, sementes, folhas e plantas inteiras transgênicas com conservação e estabilidade da proteína recombinante ou, *in vitro*, com suspensões celulares e biorreatores com taxas de produção superiores, embora mais dispendiosa (Xu *et al.*, 2011).

Atualmente, a metodologia mais utilizada para a transformação de plantas é a utilização da bactéria do solo *Agrobacterium tumefaciens* por ser rápida, eficaz e simples (Pitzschke & Hirt, 2010).

Existem diversas proteínas recombinantes humanas produzidas por plantas transgênicas comercializadas para diversos fins, tais como prevenção e tratamento de doenças em humanos e animais, reagentes para análise de diagnóstico e cosmética. Muitas outras proteínas recombinantes estão a ser avaliadas em diferentes fases de ensaios clínicos, tendo demonstrado previamente eficácia e atividade biológica *in vitro* e em animais (Sirko *et al.*, 2011).

Os maiores desafios da produção de proteínas recombinantes por plantas transgênicas, para além de obter a identidade e a eficácia da proteína, são a aceitação social, no caso da produção *in vivo*, e a regulamentação. A regulamentação sobre a autorização no mercado das proteínas recombinantes produzidas por plantas transgênicas é heterógenea, originando ambiguidade e desconfiança por parte da opinião pública (Sil & Jha, 2014).

O sistema de expressão utilizando plantas transgênicas é uma alternativa segura, eficaz e económica de produzir elevadas quantidades de proteínas recombinantes com utilidade terapêutica, tornando-se uma oportunidade para desenvolver medicamentos, especialmente em países em desenvolvimento onde os medicamentos são mais caros (Rybicki *et al.*, 2012).

BIBLIOGRAFIA

Akasaka, Y., Mii, M., Daimon, H. (1998). Morphological Alterations and Root Nodule Formation in *Agrobacterium rhizogenes*-mediated Transgenic Hairy Roots of Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Annals of Botany*, 355–362.

Anami, S., Njuguna, E., Coussens, G., Aesaert, S., & Van Lijsebettens, M. (2013). Higher plant transformation: principles and molecular tools. *The International Journal of Developmental Biology*, 57(6-7-8), 483–494. doi:10.1387/ijdb.130232mv

Andrade, S. R. M. (2002). Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais. *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*, 58, 9.

Andrić, V. (2011). Objective consequentialism and the licensing dilemma. *Philosophical Studies*, 162(3), 547–566. doi:10.1007/s11098-011-9781-7

Avesani, L., Vitale, A., Pedrazzini, E., Devirgilio, M., Pompa, A., Barbante, A., Pezzotti, M. (2010). Recombinant human GAD65 accumulates to high levels in transgenic tobacco plants when expressed as an enzymatically inactive mutant. *Plant Biotechnology Journal*, 8(8), 862–72. doi:10.1111/j.1467-7652.2010.00514.x

Baeshen, N. A., Baeshen, M. N., Sheikh, A., Bora, R. S., Ahmed, M. M. M., Ramadan, H. A. I., Redwan, E. M. (2014). Cell factories for insulin production, 1–9.

Balazs, D. A., & Godbey, W. (2011). Liposomes for Use in Gene Delivery. *Journal of Drug Delivery*, 2011, 1–12. doi:10.1155/2011/326497

Barros, E., Nelson, S. W. (2010). Creation of a high-yielding recombinant maize hybrid for the production of a microbicide to prevent HIV-1 transmission. *South African Journal of Science*, 106(5–6):77–81.

Barta, A., Sommergruber, K., Thompson, D., Hartmuth, K., Matzke, M. A., Matzke, A. J. M. (1986). The expression of a nopaline synthase — human growth-hormone chimeric gene in transformed tobacco and sunflower callus-tissue. *Plant Molecular Biology*, 6, 347–57.

Basaran, P. & Rodriguez-Cerezo, E. (2008). Plant molecular farming: opportunities and challenges. *Critical Reviews in Biotechnology*, Vol. 28, No. 3, pp. 153-172, ISSN 1549-7801.

Bawa, a. S., & Anilakumar, K. R. (2013). Genetically modified foods: Safety, risks and public concerns - A review. *Journal of Food Science and Technology*, 50(6), 1035–1046. doi:10.1007/s13197-012-0899-1

Berlin, J., Ruegenhagen, C., Dietze, P., Fecker, L. F., Goddijn, O., Hoge, J. (1993). Increased production of serotonin by suspension and root cultures of *Peganum harmala* transformed with a tryptophan decarboxylase cDNA clone from *Catharanthus roseus*. *Transgenic Res*, 2, 336–44.

Bhatia, C. R., Viegas, P., Bhagwat, A., Mathews, H., & Notani, N. K. (1986). Genetic transformation of plants. *Proceedings: Plant Sciences*, 96(2), 79–112. doi:10.1007/BF03053326

Bobrowski, V. L., Fiuza, L. M., Pasquali, G., & Bodanese-Zanettini, M. H. (2003). Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. *Ciência Rural*, 33(5), 843–850. doi:10.1590/S0103-84782003000500008

Boehm, R. (2006). The use of plants and plant cell cultures for the bioproduction of proteins. *Journal Für Verbraucherschutz Und*, 1, 120–125. doi:10.1007/s00003-006-0087-1

Boothe, J., Nykiforuk, C., Shen, Y., Zaplachinski, S., Szarka, S., Kuhlman, P., Moloney, M. M. (2010). Seed-based expression systems for plant molecular farming. *Plant Biotechnology Journal*, 8(5), 588–606. doi:10.1111/j.1467-7652.2010.00511.x

Boyhan, D., & Daniell, H. (2011). Low-cost production of proinsulin in tobacco and lettuce chloroplasts for injectable or oral delivery of functional insulin and C-peptide. *Plant Biotechnology Journal*, 9(5), 585–598. doi:10.1111/j.1467-7652.2010.00582.x

Brodzik, R., Glogowska, M., Bandurska, K., Okulicz, M., Deka, D., Ko, K., Koprowski, H. (2006). Plant-derived anti-Lewis Y mAb exhibits biological activities for efficient immunotherapy against human cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(23), 8804–9. doi:10.1073/pnas.0603043103

Brown, T. A. (2010). Gene cloning and DNA analysis. An introduction. Edição Wiley-Blackwell, 6ª Edição.

Carrer, H., Barbosa, A., Ramiro D. (2010). Biotecnologia na Agricultura. *Estudos Avançados*, 24, 156-157.

Chan, S. J., Weiss, J., Konrad, M., White, T., Bahl, C., Yu, S. D., Steiner, D. F. (1981). Biosynthesis and periplasmic segregation of human proinsulin in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(9), 5401–5405. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/7029534>

Chen, Q. (2008). Expression and Purification of Pharmaceutical Proteins in Plants. *Biological Engineering*, 1(Cidv), 291–321. doi:10.13031/2013.26854

Chong, D. K., & Langridge, W. H. (2000). Expression of full-length bioactive antimicrobial human lactoferrin in potato plants. *Transgenic Research*, 9(1), 71–8. doi:10.1023/A:1008977630179

Chrispeels, M. J., Sadava, D. E. (2003). *Plants, Genes and Crop Biotechnology*. Jones and Bartlett Publishers, 2^a edition, London, United Kingdom.

Conley, A. J., Mohib, K., Jevnikar, A. M., & Brandle, J. E. (2009). Plant recombinant erythropoietin attenuates inflammatory kidney cell injury. *Plant Biotechnology Journal*, 7, 183–99. doi:10.1111/j.1467-7652.2008.00389.x

Curtiss, R. I., Cardineau, C. A. (1990). Oral immunization by transgenic plants. WO90/02484

Dale, P., Irwin, J., & Scheffler, J. (1993). The experimental and commercial release of transgenic crop plants. *Plant Breeding*, 111, 1–22. doi:10.1111/j.1439-0523.1993.tb00602.x

Daniell, H., Streatfield, S. J., & Wycoff, K. (2001). Medical molecular farming: Production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Science*, 6(5), 219. doi:10.1016/S1360-1385(01)01922-7

Darbani, B., Eimanifar, A., Stewart, C. N., & Camargo, W. N. (2007). Methods to produce marker-free transgenic plants. *Biotechnology Journal*, 2(1), 83–90. doi:10.1002/biot.200600182

Decreto - Lei n.º 7/2004 de 7 de janeiro - Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território

Decreto - Lei n.º 164/2004 de 3 de julho - Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território

Decreto - Lei n.º 160/2005 de 21 de setembro - Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas

Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27(3), 297–306. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.01.008

Diretiva 2001/18/CE de 12 de março de 2001 - Parlamento Europeu e do Conselho

Diretiva 2015/412/CE de 11 de março de 2015 - Parlamento Europeu e do Conselho

Doods, J.H., Roberts, L. W., (1995). Experiments in Plant Tissue Cultures, 2ª Edição, pp 50-123, Cambridge University Press, Cambridge

Drake, P., Chargelegue, D., Vine, N., Van Dolleweerd, C.J., Obregon, P., Ma J. (2003). Rhizosecretion of a monoclonal antibody protein complex from transgenic tobacco roots. *Plant Molecular Biology*, 52, 233–41.

Edelbaum, O., Stein, D., Holland, N., Gafni, Y., Livneh, O., Novick, D., Rubinstein, M., Sela, I. (1992). Expression of active human interferon-beta in transgenic plants. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 12, 449-453

Emanuel, E. J., Wendler, D., & Grady, C. (2015). What makes clinical research ethical?

JAMA: The Journal of the American Medical Association, 283(20), 2701–2711.
doi:10.1001/jama.283.20.2701

Fehér, A., Pasternak, T. P., & Dudits, D. (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74(3), 201–228.
doi:10.1023/A:1024033216561

Fernández-San Millán, A., Ortigosa, S. M., Hervás-Stubbs, S., Corral-Martínez, P., Seguí-Simarro, J. M., Gaétan, J., Veramendi, J. (2008). Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Plant Biotechnology Journal*, 6(5), 427–41. doi:10.1111/j.1467-7652.2008.00338.x

Ferreira-Camargo, L. S., Tran, M., Beld, J., Burkart, M. D., & Mayfield, S. P. (2015). Selenocystamine improves protein accumulation in chloroplasts of eukaryotic green algae. *AMB Express*, 5(1), 39. doi:10.1186/s13568-015-0126-3

Fonseca M. M., Teixeira J. A. (2007). Reactores Biológicos - Fundamentos e Aplicações. Lidel - Edições Técnicas Lda, 1ª Edição, pp 438 - 460, Portugal

Fujiwara, Y., Aiki, Y., Yang, L., Takaiwa, F., Kosaka, A., Tsuji, N. M., Sekikawa, K. (2010). Extraction and purification of human interleukin-10 from transgenic rice seeds. *Protein Expression and Purification*, 72(1), 125–130. doi:10.1016/j.pep.2010.02.008

Gamborg, O.L., Murashige, T., Thorpe, T. A. , Vasil, I. K. (1976). Plant tissue culture media. *In Vitro*, 7, 473–8.

Girard, L. S., Fabis, M. J., Bastin, M., Courtois, D., Pétiard, V., & Koprowski, H. (2006). Expression of a human anti-rabies virus monoclonal antibody in tobacco cell

culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345(2), 602–607. doi:10.1016/j.bbrc.2006.03.219

Giri, A., & Narasu, M. L. (2000). Transgenic hairy roots. *Biotechnology Advances*, 18(1), 1–22. doi:10.1016/S0734-9750(99)00016-6

Glick, B. R., Pasternak, J. J. (1994) Molecular Biotechnology. Principles and Applications of Recombinant DNA. *ASM Press*, Washington D.C., pp 25-79

Goldstein, D. a., & Thomas, J. a. (2004). Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants. *QJM - Monthly Journal of the Association of Physicians*, 97(11), 705–716. doi:10.1093/qjmed/hch121

Gomord, V., Chamberlain, P., Jefferis, R., & Faye, L. (2005). Biopharmaceutical production in plants: Problems, solutions and opportunities. *Trends in Biotechnology*, 23(11), 559–565. doi:10.1016/j.tibtech.2005.09.003

Gomord, V., Fitchette, A. C., Menu-Bouaouiche, L. & Saint-Jore-Dupas, C. (2010). Plant Specific Glycosylation Patterns in the Context of Therapeutic Protein Production. *Plant Biotechnology Journal*, Vol. 8, No. 5, 2010, pp. 564-587

Gomord, V., & Faye, L. (2004). Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(2), 171–181. doi:10.1016/j.pbi.2004.01.015

Gomord, V., Sourrouille, C., Fitchette, A. C., Bardor, M., Pagny, S., Lerouge, P., & Paye, L. (2004). Production and glycosylation of plant-made pharmaceuticals: The antibodies as a challenge. *Plant Biotechnology Journal*, 2(October 2015), 83–100. doi:10.1111/j.1467-7652.2004.00062.x

Gregorowius, D., Lindemann-Matthies, P., & Huppenbauer, M. (2012). Ethical discourse on the use of genetically modified crops: A review of academic publications in the fields of ecology and environmental ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 25(3), 265–293. doi:10.1007/s10806-011-9330-6

Gutiérrez-Ortega, A., Sandoval-Montes, C., de Olivera-Flores, T. J., Santos-Argumedo, L., & Gómez-Lim, M. A. (2005). Expression of functional interleukin-12 from mouse in transgenic tomato plants. *Transgenic Research*, 14(6), 877–85. doi:10.1007/s11248-005-1464-8

Hammond, J., McGarvey P. Yusibov V. (1999). Plant Biotechnology. New Products and Applications. Springer, pp 88-145

He, Y., Ning, T., Xie, T., & Qiu, Q. (2011). Large-scale production of functional human serum albumin from transgenic rice seeds. *Proceedings of the* doi:10.1073/pnas.1109736108//DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1109736108

Henrique, F., Silva, D. A., Everson, J., Pereira, S., Aparecida, M., Pereira, A., & Oliveira, J. P. D. E. (2006). Efeito Da Interação Entre Carvão Ativado E N 6 -Benzilaminopurina Na Propagação in Vitro De Bananeira , Cv . Grand Naine (Aaa) 1 Interaction Effect Between Activated Charcoal and N 6 -Benzylaminopurine in the in, 280–283.

Hiatt A., Cafferkey R., Bowdish K. (1989). Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, 342, pp.76-78

Hooker, B. S., Lee, J.M., An, G. H. (1990). Cultivation of plant-cells in a stirred vessel — effect of impeller design. *Biotechnol Bioengineering*, 35, 296–304.

Horsch, R. B, Fraley, R. T., Rogers, S. G., Sanders P. R., Lloyd A, Hoffmann N.(1984). Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science*, 223, 496–498

Houdebine, L. M. (2009). Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 32(2), 107–121. doi:10.1016/j.cimid.2007.11.005

Huang, T.-K., & McDonald, K. a. (2009). Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 45, 168–184. doi:10.1016/j.bej.2009.02.008

Huang, T.-K., & McDonald, K. a. (2012). Bioreactor systems for in vitro production of foreign proteins using plant cell cultures. *Biotechnology Advances*, 30(2), 398–409. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.07.016

Huang, T.-K., Plesha, M. a, Falk, B. W., Dandekar, A. M., & McDonald, K. a. (2009). Bioreactor strategies for improving production yield and functionality of a recombinant human protein in transgenic tobacco cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(2), 508–20. doi:10.1002/bit.22061

Huang, Z., Phoolcharoen, W., Lai, H., Piensook, K., Cardineau, G., Zeitlin, L., ... Chen, Q. (2010). High-level rapid production of full-size monoclonal antibodies in plants by a single-vector DNA replicon system. *Biotechnology and Bioengineering*, 106(1), 9–17. doi:10.1002/bit.22652

Husaini, A. M., Rashid, Z., Mir, R. U., & Aquil, B. (2011). Approaches for gene targeting and targeted gene expression in plants. *GM Crops*, 2(3), 150–162. doi:10.4161/gmcr.2.3.18605 [pii]

Ikehara, M., Ohtsuka, E., Tokunaga, T., Taniyama, Y., Iwai, S., Kitano, K., ... Fujiyama, K. (1984). Synthesis of a gene for human growth hormone and its expression

in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(19), 5956–5960. doi:10.1073/pnas.81.19.5956

James, C. (2014). Global status of commercialized biotech/GM crops: 2014. ISAAA, Brief 49-2014.

<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/49/executivesummary/default.asp>

Jani, D., Meena, L., Rizwan-ul-Haq, Q., Singh, Y., Sharma, A., Tyagi, A. (2002). Expression of cholera toxin B subunit in transgenic tomato plants. *Transgenic Research*, 11, 447–54

Kaldis, A., Ahmad, A., Reid, A., Mcgarvey, B., Brandle, J., Ma, S., Menassa, R. (2013). High-level production of human interleukin-10 fusions in tobacco cell suspension cultures. *Plant Biotechnology Journal*, 11, 535–545. doi:10.1111/pbi.12041

Kawashima, C.G., Noji, M., Nakamura, M., Ogra, Y., Suzuki, K.T. and Saito, K. (2004). Heavy Metal Tolerance of Transgenic Tobacco Plants Over-Expressing Cysteine Synthase. *Biotechnology Letters*, 26, 153-157.

Kim, M.-Y., Reljic, R., Kilbourne, J., Ceballos-Olvera, I., Yang, M.-S., Reyes-del Valle, J., & Mason, H. S. (2015). Novel vaccination approach for dengue infection based on recombinant immune complex universal platform. *Vaccine*, 33(15), 1830–1838. doi:10.1016/j.vaccine.2015.02.036

Kirk, D. D., McIntosh, K., Walmsley, A. M., & Peterson, R. K. D. (2005). Risk analysis for plant-made vaccines. *Transgenic Research*, 14(4), 449–462. doi:10.1007/s11248-005-5697-3

Kostrzak, A., Cervantes Gonzalez, M., Guetard, D., Nagaraju, D. B., Wain-Hobson, S., Tepfer, D., Sala, M. (2009). Oral administration of low doses of plant-based HBsAg induced antigen-specific IgAs and IgGs in mice, without increasing levels of regulatory

T cells. *Vaccine*, 27(35), 4798–4807. doi:10.1016/j.vaccine.2009.05.092

Lau, O. S., & Sun, S. S. M. (2009). Plant seeds as bioreactors for recombinant protein production. *Biotechnology Advances*, 27(6), 1015–1022. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.05.005

Lee, S. Y., Kim, Y. H., Roh, Y. S., Myoung, H. J., Lee, K. Y., & Kim, D. Il. (2004). Bioreactor operation for transgenic *Nicotiana tabacum* cell cultures and continuous production of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by perfusion culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(6-7), 663–671. doi:10.1016/j.enzmictec.2004.08.019

Lima, N., Mota, M. (2003). *Biotecnologia - Fundamentos e Aplicações*. Lidel-edições técnicas, pp.330-560

Ma, J. K.-C., Drake, P. M. W., & Christou, P. (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews. Genetics*, 4(October), 794–805. doi:10.1038/nrg1177

Ma, S., Huang, Y., Davis, A., Yin, Z., Mi, Q., Menassa, R., Jevnikar, A. M. (2005). Production of biologically active human interleukin-4 in transgenic tobacco and potato. *Plant Biotechnology Journal*, 3(3), 309–18. doi:10.1111/j.1467-7652.2005.00125.x

Mach, J. (2014). Geminivirus vectors deliver reagents for plant genome engineering. *The Plant Cell*, 26(1), 2. doi:10.1105/tpc.114.122606

Magnuson, N. S, Linzmaier, P. M, Gao, J. W., Reeves. R., An, G., Lee, J. M. (1996). Enhanced recovery of a secreted mammalian protein from suspension culture of genetically modified tobacco cells. *Protein Expression and Purification*, 7, 220–8.

Magnuson, N. S., Linzmaier, P. M., Reeves, R., An, G., HayGlass, K., & Lee, J. M. (1998). Secretion of biologically active human interleukin-2 and interleukin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture. *Protein Expression and Purification*, 13(1), 45–52. doi:10.1006/prep.1998.0872

Marcondes, J., & Hansen, E. (2008). Transgenic lettuce seedlings carrying hepatitis B virus antigen HBsAg. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases: An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 12, 469–471.

Mason, H.S., Lam, D. M., Arntzen, C. J. (1992). Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 11745–11749

McCormick, A. A., Kumagai, M. H., Hanley, K., Turpen, T. H., Hakim, I., Grill, L. K., Levy, R. (1999). Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single-chain Fv epitopes in tobacco plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(2), 703–708. doi:10.1073/pnas.96.2.703

McCormick, A. A., Reddy, S., Reinl, S. J., Cameron, T. I., Czerwinski, D. K., Vojdani, F., Levy, R. (2008). Plant-produced Idiotypic Vaccines for the Treatment of non-Hodgkin's Lymphoma: Safety and Immunogenicity in a Phase I Clinical Study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(29), 10131–10136. doi:10.1073/pnas.0803636105

McDonald, K. a, Hong, L. M., Trombly, D. M., Xie, Q., & Jackman, A. P. (2005). Production of human alpha-1-antitrypsin from transgenic rice cell culture in a membrane bioreactor. *Biotechnology Progress*, 21(3), 728–34. doi:10.1021/bp0496676

McGarvey, P. B., Hammond, J., Dienelt, M. M., Hooper, D. C., Fu, Z. F., Dietzschold B. (1995). Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Biotechnology NY*, 13, 1484–7.

Miki, B., & McHugh, S. (2004). Selectable marker genes in transgenic plants: Applications, alternatives and biosafety. *Journal of Biotechnology*, 107(3), 193–232. doi:10.1016/j.jbiotec.2003.10.011

Misaki, R., Fujiyama K., Seki T. (2006). Expression of human CMP-N-acetylneuraminic acidsynthetase and CMP-sialic acid transporter in tobacco suspension-cultured cell. *Biochem Biophys Res Commun*, 339, 1184–9.

Mishra, N., Gupta, P., Khatri, K., Goyal, A. K., Vyas, S. P. (2008). Edible vaccines a new approach to oral immunozation. *Indian J Biotechnol* 7:283–294

Molefe M. (2010). Strategy to strengthen the bio-economy, biotechnology landscape in SouthAfrica. *National Science and Technology Forum*, Cape PeninsulaUniversity of Technology, Cape Town, South Africa, p. 27–30.

Mrízová, K., Holasková, E., Öz, M. T., Jiskrová, E., Frébort, I., & Galuszka, P. (2014). Transgenic barley: A prospective tool for biotechnology and agriculture. *Biotechnology Advances*, 32(1), 137–157. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.09.011

Ning, T., Xie, T., Qiu, Q., Yang, W., Zhou, S., Zhou, L., Yang, D. (2008). Oral administration of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor expressed in rice endosperm can increase leukocytes in mice. *Biotechnology Letters*, 30(9), 1679–86. doi:10.1007/s10529-008-9717-2

Nykiforuk, C. L., Boothe, J. G., Murray, E. W., Keon, R. G., Goren, H. J., Markley, N. a., & Moloney, M. M. (2006). Transgenic expression and recovery of biologically active recombinant human insulin from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Biotechnology*

Journal, 4(1), 77–85. doi:10.1111/j.1467-7652.2005.00159.x

Obembe, O. O., Popoola, J. O., Leelavathi, S., & Reddy, S. V. (2011). Advances in plant molecular farming. *Biotechnology Advances*, 29(2), 210–222. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.11.004

Palacpac, N. Q., Yoshida, S., Sakai, H., Kimura, Y., Fujiyama K., Yoshida T. (1999). Stable expression of human beta1, 4-galactosyltransferase in plant cells modifies N-linked glycosylation patterns. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 4692–7.

Pasternak T., Prinsen E., Ayaydin F., Miskolczi P., Potters G., Asard H., Van Onckelen H., Dudits D. & Fehér A. (2002). The role of auxin, pH and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol*, 129, 1807–1819

Patro, S., Maiti, S., Panda, S. K., & Dey, N. (2014). Utilization of plant-derived recombinant human β -defensins (hBD-1 and hBD-2) for averting salmonellosis. *Transgenic Research*, 24(2), 353–364. doi:10.1007/s11248-014-9847-3

Pelosi, A., Shepherd, R., & Walmsley, A. M. (2012). Delivery of plant-made vaccines and therapeutics. *Biotechnology Advances*, 30(2), 440–448. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.07.018

Peters, T. (1995). All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. *Academic*, San Diego.

Pitzschke, A., & Hirt, H. (2010). New insights into an old story: Agrobacterium-induced tumour formation in plants by plant transformation. *The EMBO Journal*, 29(6), 1021–1032. doi:10.1038/emboj.2010.8

Pogue, G. P., Vojdani, F., Palmer, K. E., Hiatt, E., Hume, S., Phelps, J., Bratcher, B.

(2010). Production of pharmaceutical-grade recombinant aprotinin and a monoclonal antibody product using plant-based transient expression systems. *Plant Biotechnology Journal*, 8(5), 638–654. doi:10.1111/j.1467-7652.2009.00495.x

Proença da Cunha, A. (2005). *Farmacognosia e Fitoquímica*. Fundação Calouste Gulbenkian, 1ª Edição, Portugal

Rabindran, S., Stevenson, N., Roy, G., Fedorkin, O., Skarjinskaia, M., Ensley, B., & Yusibov, V. (2009). Plant-produced human growth hormone shows biological activity in a rat model. *Biotechnology Progress*, 25(2), 530–534. doi:10.1021/bp.130

Ramessar, K., Sabalza, M., Capell, T., & Christou, P. (2008). Maize plants: An ideal production platform for effective and safe molecular pharming. *Plant Science*, 174(4), 409–419. doi:10.1016/j.plantsci.2008.02.002

Ratledge, C., Kristiansen, B. (2001). *Basic Biotechnology*. – Cambridge University Press, 2nd edition, pag 442 –480.

Regulamento 65/2004/CE de 14 de janeiro - Parlamento Europeu e do Conselho

Regulamento 1946/2003/CE de 15 de julho - Parlamento Europeu e do Conselho

Regulamento 1830/2003/CE de 22 de setembro - Parlamento Europeu e do Conselho

Rippke, B. E. (2006). Center For Veterinary Biologics Notice. *U.S.D. Agriculture*, No. 06–10, Washington, D.C: Center for Veterinary Biologics, USDA

Robert, J. S., Kirk, D. D., & Biodesign, T. (2006). *Health: The Development of*

Vaccines in Transgenic Plants. *World Health*, 6(4), 29–42. doi:10.1080/15265160600843551

Rodríguez, M., Ramírez, N. I., Ayala, M., Freyre, F., Pérez, L., Triguero, A., Pujol, M. (2005). Transient expression in tobacco leaves of an aglycosylated recombinant antibody against the epidermal growth factor receptor. *Biotechnology and Bioengineering*, 89(2), 188–194. doi:10.1002/bit.20333

Ruffoni, B., Pistelli, L., Bertoli, A., & Pistelli, L. (2009). Plant cell cultures: Bioreactors for industrial production. *Plant Cell*

Rybicki, E. P., Chikwamba, R., Koch, M., Rhodes, J. I., & Groenewald, J. H. (2012). Plant-made therapeutics: An emerging platform in South Africa. *Biotechnology Advances*, 30(2), 449–459. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.07.014

Sack, M., Hofbauer, A., Fischer, R., & Stoger, E. (2015). The increasing value of plant-made proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, 32C, 163–170. doi:10.1016/j.copbio.2014.12.008

Sack, M., Rademacher, T., Spiegel, H., Boes, A., Hellwig, S., Drossard, J., Fischer, R. (2015). From gene to harvest: insights into upstream process development for the GMP production of a monoclonal antibody in transgenic tobacco plants. *Plant Biotechnology Journal*, 13(8), 1094–1105. doi:10.1111/pbi.12438

Sánchez-Hernández, C., Gutiérrez-Ortega, A., Aguilar-León, D., Hernández-Pando, R., Gómez-Lim, M., & Gómez-García, B. (2010). In vivo activity of plant-based interleukin-12 in the lung of Balb/c mouse. *BMC Research Notes*, 3, 151. doi:10.1186/1756-0500-3-151

Santi, L., Batchelor, L., Huang, Z., Hjelm, B., & Kilbourne, J. (2009). NIH Public Access, 26(15), 1846–1854. doi:10.1016/j.vaccine.2008.01.053.An

Sainsbury, F., Sack, M., Stadlmann, J., Quendler, H., Fischer, R., & Lomonossoff, G. P. (2010). Rapid transient production in plants by replicating and non-replicating vectors yields high quality functional anti-HIV antibody. *PloS One*, 5(11), e13976. doi:10.1371/journal.pone.0013976

Sala, F., Rigano, M. M., Barbante, A., Basso, B., Walmsley, A. M., & Castiglione, S. (2003). Vaccine antigen production in transgenic plants: Strategies, gene constructs and perspectives. *Vaccine*, 21(7-8), 803–808. doi:10.1016/S0264-410X(02)00603-5

Schillberg, S., Fischer, R., & Emans, N. (2003). Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60, 433–445. doi:10.1007/s000180300037

Shaaltiel, Y., Bartfeld, D., Hashmueli, S., Baum, G., Brill-Almon, E., Galili, G., ... Aviezer, D. (2007). Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant Biotechnology Journal*, 5(5), 579–590. doi:10.1111/j.1467-7652.2007.00263.x

Shanks, J. V., & Morgan, J. (1999). Plant “hairy root” culture. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(2), 151–155. doi:10.1016/S0958-1669(99)80026-3

Sharma, A. K., & Sharma, M. K. (2009). Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances*, 27(6), 811–832. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.06.004

Sharma, M., & Sood, B. (2011). A banana or a syringe: Journey to edible vaccines.

World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27(3), 471–477.
doi:10.1007/s11274-010-0481-9

Shoji, Y., Chichester, J. a, Jones, M., Manceva, S. D., Damon, E., Mett, V., ... Yusibov, V. (2011). Plant-based rapid production of recombinant subunit hemagglutinin vaccines targeting H1N1 and H5N1 influenza. *Human Vaccines*, 7 Suppl(February), 41–50.
doi:10.4161/hv.7.0.14561

Sijmons P. C., Dekker B. M. M., Schrammeijer B., Verwoerd T. C., Van den Elzen P. J. M., Hoekema A. (1990). Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Bio/Technol*, 8, pp. 217-221

Sil, B., & Jha, S. (2014). Plants: The Future Pharmaceutical Factory. *American Journal of Plant Sciences*, 05(03), 319–327. doi:10.4236/ajps.2014.53044

Singh, H., & Singh, B. (2014). Genetic Engineering of Field, Industrial and Pharmaceutical Crops. *American Journal of Plant Sciences*, (December), 3974–3993.
Retrieved from http://file.scirp.org/Html/26-2601778_52773.htm

Singh, O. V., Ghai, S., Paul, D., & Jain, R. K. (2006). Genetically modified crops: Success, safety assessment, and public concern. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(5), 598–607. doi:10.1007/s00253-006-0449-8

Sirko, A., Vaněk, T., Góra-Sochacka, A., & Redkiewicz, P. (2011). Recombinant cytokines from plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 3536–3552.
doi:10.3390/ijms12063536

Smith, M. L., Mason, H. S., & Shuler, M. L. (2002). Hepatitis B surface antigen (HBsAg) expression in plant cell culture: Kinetics of antigen accumulation in batch

Santi, L., Batchelor, L., Huang, Z., Hjelm, B., & Kilbourne, J. (2009). NIH Public Access, 26(15), 1846–1854. doi:10.1016/j.vaccine.2008.01.053.An

Sainsbury, F., Sack, M., Stadlmann, J., Quendler, H., Fischer, R., & Lomonosoff, G. P. (2010). Rapid transient production in plants by replicating and non-replicating vectors yields high quality functional anti-HIV antibody. *PloS One*, 5(11), e13976. doi:10.1371/journal.pone.0013976

Sala, F., Rigano, M. M., Barbante, A., Basso, B., Walmsley, A. M., & Castiglione, S. (2003). Vaccine antigen production in transgenic plants: Strategies, gene constructs and perspectives. *Vaccine*, 21(7-8), 803–808. doi:10.1016/S0264-410X(02)00603-5

Schillberg, S., Fischer, R., & Emans, N. (2003). Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60, 433–445. doi:10.1007/s000180300037

Shaaltiel, Y., Bartfeld, D., Hashmueli, S., Baum, G., Brill-Almon, E., Galili, G., ... Aviezer, D. (2007). Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher’s disease using a plant cell system. *Plant Biotechnology Journal*, 5(5), 579–590. doi:10.1111/j.1467-7652.2007.00263.x

Shanks, J. V., & Morgan, J. (1999). Plant “hairy root” culture. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(2), 151–155. doi:10.1016/S0958-1669(99)80026-3

Sharma, A. K., & Sharma, M. K. (2009). Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances*, 27(6), 811–832. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.06.004

Sharma, M., & Sood, B. (2011). A banana or a syringe: Journey to edible vaccines.

World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27(3), 471–477.
doi:10.1007/s11274-010-0481-9

Shoji, Y., Chichester, J. a, Jones, M., Manceva, S. D., Damon, E., Mett, V., ... Yusibov, V. (2011). Plant-based rapid production of recombinant subunit hemagglutinin vaccines targeting H1N1 and H5N1 influenza. *Human Vaccines*, 7 Suppl(February), 41–50.
doi:10.4161/hv.7.0.14561

Sijmons P. C., Dekker B. M. M., Schrammeijer B., Verwoerd T. C., Van den Elzen P. J. M., Hoekema A. (1990). Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Bio/Technol*, 8, pp. 217-221

Sil, B., & Jha, S. (2014). Plants: The Future Pharmaceutical Factory. *American Journal of Plant Sciences*, 05(03), 319–327. doi:10.4236/ajps.2014.53044

Singh, H., & Singh, B. (2014). Genetic Engineering of Field, Industrial and Pharmaceutical Crops. *American Journal of Plant Sciences*, (December), 3974–3993.
Retrieved from http://file.scirp.org/Html/26-2601778_52773.htm

Singh, O. V., Ghai, S., Paul, D., & Jain, R. K. (2006). Genetically modified crops: Success, safety assessment, and public concern. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(5), 598–607. doi:10.1007/s00253-006-0449-8

Sirko, A., Vaněk, T., Góra-Sochacka, A., & Redkiewicz, P. (2011). Recombinant cytokines from plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 3536–3552.
doi:10.3390/ijms12063536

Smith, M. L., Mason, H. S., & Shuler, M. L. (2002). Hepatitis B surface antigen (HBsAg) expression in plant cell culture: Kinetics of antigen accumulation in batch

culture and its intracellular form. *Biotechnology and Bioengineering*, 80(7), 812–822. doi:10.1002/bit.10444

Stafford, A., Warren, G. (1993). Plant cell and tissue culture. Wiley Biotechnology Series, 1ª Edição

Stoger, E., Ma, J. K. C., Fischer, R., & Christou, P. (2005). Sowing the seeds of success: Pharmaceutical proteins from plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 167–173. doi:10.1016/j.copbio.2005.01.005

Streatfield, S., Lane, J., Brooks, C., Barker, D., Poage, M., Mayor, J., Lamphear, B., Drees, C., Jilka, J., Hood, E., & Howard, J.(2003). Corn as a production system for human and animal vaccines. *Vaccine*, 21: 812–815. doi:10.1016/S0264-410X(02)00605-9.

Sundararajan, A., Sangster, M. Y., Frey, S., Atmar, R. L., Chen, W. H., Ferreira, J., Topham, D. J. (2015). Robust mucosal-homing antibody-secreting B cell responses induced by intramuscular administration of adjuvanted bivalent human norovirus-like particle vaccine. *Vaccine*, 33(4), 568–76. doi:10.1016/j.vaccine.2014.09.073

Thomas, D. R., Penney, C. A., Majumder, A., & Walmsley, A. M. (2011). Evolution of Plant-Made Pharmaceuticals. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(12), 3220–3236. doi:10.3390/ijms12053220

Trexler, M. M., McDonald, K. a, & Jackman, A. P. (2002). Bioreactor production of human alpha(1)-antitrypsin using metabolically regulated plant cell cultures. *Biotechnology Progress*, 18(3), 501–8. doi:10.1021/bp020299k

Tusé, D., Ku, N., Bendandi, M., Becerra, C., Jr, R. C., Langford, N., ... Butler-ransohoff, J. E. (2014). Clinical Safety and Immunogenicity of Vaccines for Follicular Lymphoma.

Verma, D., Moghimi, B., LoDuca, P. A., Singh, H. D., Hoffman, B. E., Herzog, R. W., & Daniell, H. (2010). Oral delivery of bioencapsulated coagulation factor IX prevents inhibitor formation and fatal anaphylaxis in hemophilia B mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(15), 7101–7106. doi:10.1073/pnas.0912181107

Vianna, G. R., Cunha, N. B., Murad, A. M., & E. L. Rech (2011). Soybeans as Bioreactors for Biopharmaceuticals and Industrial Protein. *Genetics and Molecular Research*, Vol. 10, No. 3, 2011, pp. 1733-1752.

Villani, M. E., Morgun, B., Brunetti, P., Marusic, C., Lombardi, R., Pisoni, I., ... Donini, M. (2009). Plant pharming of a full-sized, tumour-targeting antibody using different expression strategies. *Plant Biotechnology Journal*, 7(1), 59–72. doi:10.1111/j.1467-7652.2008.00371.x

Walmsley, A. M., & Arntzen, C. J. (2000). Plants for delivery of edible vaccines. *Current Opinion in Biotechnology*, 11, 126–129. doi:10.1016/S0958-1669(00)00070-7

Wang, D. J., Brandsma, M., Yin, Z., Wang, A., Jevnikar, A. M., & Ma, S. (2008). A novel platform for biologically active recombinant human interleukin-13 production. *Plant Biotechnology Journal*, 6(5), 504–15. doi:10.1111/j.1467-7652.2008.00337.x

Warzecha, H., & Mason, H. S. (2003). Benefits and risks of antibody and vaccine production in transgenic plants. *Journal of Plant Physiology*, 160, 755–764. doi:10.1078/0176-1617-01125

Watson, J. D., Gilman, M., Witkowski, J., Zoller, M. (1992). Recombinant DNA. Scientific American Books, Second Edition, United States of America

Webster, D. E., Wang, L., Mulcair, M., Ma, C., Santi, L., Mason, H. S., Wesselingh, S.L.; Ross L. & Coppel, R.L. (2009). Production and characterization of an orally immunogenic Plasmodium antigen in plants using a virus-based expression system. *Plant Biotechnology Journal*, Vol. 7, No. 9, pp. 846–855, ISSN 14677644

Wee, E. G., Sherrier, D. J., Prime, T. A., Dupree, P. (1998). Targeting of active sialyltransferase to the plant Golgi apparatus. *Plant Cell*, 10:1759–68.

Wickson, F., & Wynne, B. (2012). Ethics of Science for Policy in the Environmental Governance of Biotechnology: MON810 Maize in Europe. *Ethics, Policy & Environment*, 15(3), 321–340. doi:10.1080/21550085.2012.730245

Wiktorek-smagur, A., Hnatuszko-konka, K., & Gerszberg, A. (2009). Green Way of Biomedicine – How to Force Plants to Produce New Important Proteins, 1–29.

Wilken, L. R., & Nikolov, Z. L. (2012). Recovery and purification of plant-made recombinant proteins. *Biotechnology Advances*, 30(2), 419–433. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.07.020

Wongsamuth, R., & Doran, P. M. (1997). Production of monoclonal antibodies by tobacco hairy roots. *Biotechnology and Bioengineering*, 54(5), 401–15. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19970605)54:5<401::AID-BIT1>3.0.CO;2-I

Wright, A., Morrison, S.L. (1998). Effect of C2-associated carbohydrate structure on Ig effector function: studies with chimeric mouse-human IgG1 antibodies in glycosylation mutants of Chinese hamster ovary cells. *J Immunol*, 160:3393-402.

Xiong, Y., Jung, J., Zeng, Q., Gallo, M., & Altpeter, F. (2013). Comparison of

procedures for DNA coating of micro-carriers in the transient and stable biolistic transformation of sugarcane. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 112(1), 95–99. doi:10.1007/s11240-012-0208-8

Xu, J., Ge, X., & Dolan, M. C. (2011). Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures. *Biotechnology Advances*, 29(3), 278–299. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.01.002

Yang, L., & Stöckigt, J. (2010). Trends for diverse production strategies of plant medicinal alkaloids. *Natural Product Reports*, 27(10), 1469. doi:10.1039/c005378c

Yano, A., Maeda, F., & Takekoshi, M. (2004). Transgenic tobacco cells producing the human monoclonal antibody to hepatitis B virus surface antigen. *Journal of Medical Virology*, 73(2), 208–15. doi:10.1002/jmv.20077

Yap, Y.-K., & Smith, D. R. (2010). Strategies for the plant-based expression of dengue subunit vaccines. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 57(2), 47–53. doi:10.1042/BA20100248

Ye, X., Al-Babili, S., Kloti, A., Zhang, J., Lucca, P. and Potrykus, I. (2000). Engineering the Provitamin A (β -Carotene) Biosynthetic Pathway into (Carotinoid-Free) Rice Endosperm. *Science*, 287, 303-305.

Yu, J., & Langridge, W. (2003). Expression of rotavirus capsid protein VP6 in transgenic potato and its oral immunogenicity in mice. *Transgenic Research*, 12(2), 163–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12739884>

Yusibov, V., Rabindran, S. (2008). Recent progress in the development of plant derived vaccines. *Expert Review of Vaccines*.

Zhang, D., Nandi, S., Bryan, P., Pettit, S., Nguyen, D., Santos, M. A., & Huang, N. (2010). Expression, purification, and characterization of recombinant human transferrin from rice (*Oryza sativa* L.). *Protein Expression and Purification*, 74(1), 69–79. doi:10.1016/j.pep.2010.04.019

Zuo, J., Niu, Q., Møller, S. G., & Chua, N. (2001). Chemical-Regulated, Site-Specific Excision in Transgenic Plants. *Nature Biotechnology*, 19 (February), 157–161.

