

Cláudia Isabel Silva Duarte

“VACINAS E PLANTAS, RELAÇÃO EM LARGA ESCALA”

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, Setembro de 2016

Vacinas e plantas, relação em larga escala

Vacinas e plantas, relação em larga escala

Cláudia Isabel Silva Duarte

“VACINAS E PLANTAS, RELAÇÃO EM LARGA ESCALA”

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, Setembro de 2016

Vacinas e plantas, relação em larga escala

Cláudia Isabel Silva Duarte

“VACINAS E PLANTAS, RELAÇÃO EM LARGA ESCALA”

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

SUMÁRIO

As vacinas atualmente são consideradas imprescindíveis para o início do desenvolvimento do ser humano, sendo responsáveis pela proteção contra várias doenças infecciosas. Surgiram no século XIX com a produção da vacina contra a varíola. Vírus como a raiva, poliomielite, influenza e hepatite B foram combatidos com o desenvolvimento de vacinas ao longo dos séculos e, até aos dias de hoje ainda estão em comercialização. Este tipo de preparações é eficaz, conferindo proteção em alguns casos para toda a vida, ou por um determinado período de tempo. Fatores económicos e falhas no sistema de produção de proteínas terapêuticas levaram a investigar outros tipos de biofábricas. Os organismos fotossintéticos são os que apresentam mais vantagens, são económicos, crescem facilmente e permitem um melhor controlo de contaminações. As plantas podem expressar os antigénios ou anticorpos por dois sistemas o estável e o transitório, sendo o último o mais utilizado na produção de vacinas. O conceito de *Plant Molecular Pharming* é a mais recente tecnologia, existindo fábricas especializadas em produzir produtos terapêuticos baseados em plantas. A vacina contra o vírus Influenza e contra o Ébola são dois exemplos que estão bem encaminhados para atingir o sucesso.

ABSTRACT

Vaccines are currently considered essential for the beginning of human development, being responsible for the protection against various infectious diseases. They emerged in the nineteenth century with the production of the vaccine against smallpox. Viruses such as rabie, polio, influenza and hepatitis B have been combated with the development of vaccines over the centuries and to the present day are still in commercialization. This type of preparations is effective, conferring protection in some cases for life, or for a certain period of time. Economic factors and failure in therapeutic proteins production systems have led to investigate other types of biofactories. The photosynthetic organisms are those which have further advantages, are economical, grow easily and allow better control of contamination. The plants can express the antigens or antibodies of two systems stable and transient, but the most used in production of vaccine is the transient system. The concept of Plant Molecular Pharming is the new technology, existing factories specialized in producing therapeutic products based on plants. The vaccines against the influenza virus and Ebola are two examples that are on track to achieve success.

Vacinas e plantas, relação em larga escala

*Ao meu Pai, ao meu Avô Chico
e ao Mico*

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à minha Mãe, a minha guerreira, que apesar de todos os obstáculos que a vida lhe colocou pela frente nunca deixou de acreditar em mim e sempre me ajudou a lutar pelo meu futuro.

À minha Avó e à minha Tia, os pilares da minha vida, agradeço por estarem tão presentes e por me incentivarem todos os dias a concretizar o meu sonho.

Agradeço ao meu orientador, Professor Doutor Ricardo Magalhães, por todo o apoio, rigor, paciência, e disponibilidade que foram essenciais para a realização deste trabalho.

Obrigado aos meus amigos e colegas, Daniela, Carol, Raquel, Carolina, Albana, Joana, Bruno e Ivo por me apoiarem sempre que precisei e por partilharem momentos inesquecíveis. Sem vocês não teria sido possível.

ÍNDICE

I.	Introdução.....	1
II.	Perspetiva histórica da vacinação.....	3
1.1	Era animal.....	3
1.2	Era da cultura de tecidos.....	4
1.3	Era das culturas em ovos.....	4
1.4	Era da cultura celular.....	5
1.5	Era das células humanas fetais.....	5
1.6	Era do sangue.....	6
1.7	Era do DNA.....	6
III.	Vacinas.....	7
1.1	Vacinas ativas.....	7
i.	Desvantagens.....	8
ii.	Exemplo recente da produção de vacina ativa.....	9
1.2	Vacinas passivas.....	10
IV.	Plantas.....	11
1.1	<i>Nicotiana benthamiana</i>	12
1.2	Desenvolvimento da indústria biofarmacêutica à base de plantas.....	14
V.	Vacinas baseadas em plantas.....	15
1.1	Sistemas de expressão em plantas.....	16
1.2	Sistema de expressão estável.....	17
1.3	Sistema de expressão transitória.....	18
i.	Sistema do vetor launch (lançamento).....	19
ii.	Sistema MagnICON.....	19

Vacinas e plantas, relação em larga escala

iii.	Cassete de expressão do gene plastocianina	19
iv.	Série de vetor pEAQ	19
1.4	Vetores virais	20
i.	Vantagens.....	20
ii.	Desvantagens.....	20
VI.	Terapias à base de anticorpos baseados em plantas	21
1.1	Tecnologia transgênica para produção de mAbs	21
1.2	Tecnologia transitória para produção de mAbs	22
VII.	Plant molecular pharming.....	22
1.1	Fábricas automatizadas de plantas terapêuticas	23
1.2	Modo de funcionamento	24
VIII.	Exemplos de vacinas baseadas em plantas	26
1.1	Vacina contra vírus Influenza	26
1.2	Vacina contra Aterosclerose	26
1.3	Vacina contra a Hepatite B	27
1.4	Vacina contra o Antraz	28
1.5	Vacina contra o Ébola.....	29
IX.	Conclusão	31
X.	Bibliografia.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Fases de Produção de uma vacina convencional.	2
Figura 2 - Exemplo de vacinas ativas.	8
Figura 3 - Processo de produção de VLPs.	10
Figura 4 - (A) Planta Nicotiana antes e após infiltração de genes. (B) Exemplo de um vetor utilizado no sistema transitório.	13
Figura 5 - Aplicações de produtos baseados em plantas.	15
Figura 6 - Sistemas de expressão em Plantas.	17
Figura 7 - Estrutura da IgG e IgA.	22
Figura 8 - Exemplificação da planta de Fábricas Automatizadas.	23
Figura 9 - Disposição vertical de alta intensidade de plantas em estantes.	24
Figura 10 - Produção de vacinas industriais baseadas em plantas.	25
Figura 11 – Planta da mostarda, <i>Sinapis alba</i>	28
Figura 12 - Produção do ZMapp.	30

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Diferenças entre vacina e medicamento.....	2
Tabela 2 - Cronologia da vacinação.	7
Tabela 3 - Tipos de imunização passiva.....	11
Tabela 4 - Eventos chave no desenvolvimento da Indústria à base de Plantas.	14
Tabela 5 - Exemplos de empresas que produzem produtos terapêuticos à base de plantas	16

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADCC – Citotoxicidade celular dependente do anticorpo

APC – Células apresentadoras de antigénio

ApoB100 – Epítotope do vírus Aterosclerose

CETP – Epítotope do vírus Aterosclerose

CDC – Citotoxicidade dependente do complemento

CO₂ – Dióxido de carbono

CRPV-L1 e CRPV-L2 – Epítotope do vírus Papiloma Humano

CTB – Subunidade B da toxina da cólera

DC – Células dendríticas

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EIC – Complexo imune de Ébola

FDA – US Food and Drug Administration

GFP – Proteína verde fluorescente

GP – Glicoproteína de superfície

HA – Hemaglutinina

HBsAg – Antigénio de superfície da Hepatite B

HBV – Vírus da Hepatite B

HPV – Vírus do Papiloma humano

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

L1 e L2 – Proteínas da superfície do vírus Papiloma Humano

LTB – Enterotoxina B lábil

Vacinas e plantas, relação em larga escala

MAb – Anticorpo monoclonal

MHC – Complexo major de histocompatibilidade

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

NA – Neuraminidase

NDV – Vírus da doença de Newcastle

NK – Células “natural killers”

PA – Antigénio protetor

PMP – Agricultura molecular de plantas

PNV – Programa Nacional de Vacinação

RNA – Ácido ribonucleico

rRNA – Ácido ribonucleico ribossomal

sIgA – Imunoglobulina A secretora

tRNA – Ácido ribonucleico de transferência

UV – Ultravioleta

VLP – Partículas semelhantes a vírus

I. Introdução

A vacinação é das intervenções de saúde mais rentáveis e eficientes que surgiu como forma de revolução na medicina. (Lernout, T.*et al.*, 2014). O surgimento desta medida contribuiu para a redução da taxa de mortalidade e morbidade a nível mundial de um número importante de doenças infecciosas. Segundo Arrazola e colaboradores “com exceção da disponibilidade de água potável, nenhuma outra intervenção, nem mesmo a utilização de antibióticos, teve um efeito tão importante na redução da mortalidade e no crescimento populacional em todo o mundo.” (Arrazola Martinez, M. P.*et al.*, 2014).

Louis Pasteur é considerado o impulsionador desta área, isto porque no século XIX conseguiu compreender o papel dos microrganismos na transmissão das doenças e desmitificar o conceito de atenuação de agentes patogênicos. A sua experiência consistiu em provocar doença de forma atenuada num animal e constatou que o animal ganhou defesas contra essa mesma doença. (Plotkin, S., 2014).

A vacina contra o vírus da varíola foi a primeira a ser desenvolvida, por Edward Jenner, inoculando o agente infeccioso em vacas. (Offit, P., 2007). Mais tarde, Pasteur elaborou a vacina contra a raiva, através de outro método por atenuação do agente patogênico em coelhos. (Plotkin, S., 2014).

Ao longo do século XX foram criadas vacinas contra a poliomielite, tuberculose, difteria, tétano, tosse convulsa, sarampo e febre-amarela. No caso das vacinas contra a difteria, sarampo e tosse convulsa o impacto das vacinas foi muito rápido, atingindo a comercialização mais facilmente. (Lernout, T., Theeten, H.*et al.*, 2014). A revolução no campo da vacinação centrou-se na descoberta da capacidade que as células possuíam ao serem ativadas *in vitro* e, poderem ser utilizadas como substrato viral. (Plotkin, S., 2014).

Uma vacina pode ser definida como uma preparação que administrada num indivíduo, induz uma resposta imunitária específica. Tem a capacidade de interromper ou diminuir a transmissão de um patogênico que circule no organismo do ser humano, eliminando a infeção através de proteção direta ou indireta. (Lernout, T., Theeten, H.*et al.*, 2014). Pode ser considerada um medicamento, mas com diferenças a nível da ação e benefício como podemos comprovar na tabela 1.

Vacinas e plantas, relação em larga escala

Tabela 1- Diferenças entre vacina e medicamento.

	Vacina	Medicamento
Ação	Preventiva	Terapêutica
Benefício	Individual e coletivo. O efeito é impercetível (não contrai a doença)	Individual. O efeito é visível (ocorre melhoria)
Indivíduos	Saudáveis	Doentes

A produção de vacinas a partir de microrganismos centra-se em torno dos componentes que a constituem, o componente microbiano e o farmacêutico. Assim podemos distinguir duas fases distintas, como ilustra a Figura 1 (Saúde, M. D., 2004):



Figura 1 - Fases de Produção de uma vacina convencional.
(Adaptado de www.vacinas.com.pt)

Hoje em dia, administrar uma vacina é um ato imprescindível no início de vida de um ser vivo. Em Portugal existe um Programa Nacional de Vacinação (PNV), no qual estão

descritas todas as vacinas contra doenças infecciosas existentes em Portugal. Foi implementado em 1965, com a finalidade de assegurar boas medidas de saúde a nível mundial e fortalecer a confiança nos benefícios das vacinas. (Lernout, T., Theeten, H.*et al.*, 2014).

Contudo, investigadores têm vindo a efetuar pesquisas sobre novos microrganismos causadores de doença, implicando uma procura da expressão de compostos noutros sistemas vivos. As plantas constituem uma linha relevante das escolhas na produção de produtos terapêuticos. (Fahad, S.*et al.*, 2014).

II. Perspetiva histórica da vacinação

A história da vacinação pode ser explicada por eras, em que cada uma é diferenciada pelo recurso a diferentes sistemas para a produção de vacinas. (Offit, P., 2007).

1.1 Era animal

- 1798: Vacina contra a Varíola

Foi a primeira vacina a ser produzida a partir das vacas. Estas apresentavam umas bolhas nas patas e quem entrasse em contato com o animal desenvolvia doença. Contudo, a imunidade era adquirida quando as pessoas eram expostas a essas bolhas de vacas doentes. Assim, para erradicar o problema foi administrado a todas as pessoas o fluido das bolhas, comprovando a eficácia da imunidade. (Offit, P., 2007).

- 1885: Vacina contra a Raiva

Pasteur foi o responsável pelo desenvolvimento desta vacina e para a produzir usou coelhos. O vírus da raiva era inoculado na espinha dorsal dos coelhos, de forma atenuada, e quando fosse atingido pelo antigénio havia uma resposta imune contra esse agente. O único problema encontrado foi o desenvolvimento de reações adversas no cérebro do coelho, isto porque a espinha dorsal tem a mielina, que faz ligação ao cérebro. (Offit, P., 2007).

- Século XX: Vacina contra a Poliomielite

Na década de 30, a vacina da poliomielite foi estudada por dois grupos de investigadores. Para a inoculação do vírus foram usados cérebros e espinhas dorsais de macacos, contudo foram utilizados diferentes agentes químicos: o formaldeído e o

ricinóleo. Estes agentes protegiam o vírus ao invés de o matar, resultando na morte dos macacos. (Offit, P., 2007).

1.2 Era da cultura de tecidos

As culturas de tecidos vieram sofisticar o uso de animais no crescimento dos vírus. Nesta fase não se utilizava o animal todo, mas sim partes desse. Os animais eram sacrificados com a remoção dos rins ou da pele, os quais, cresciam posteriormente num meio de fluidos enriquecidos com nutrientes. Este processo trouxe vantagens para o crescimento de inúmeros vírus, bem como a facilidade na produção. (Offit, P., 2007).

- 1935: Vacina contra a Febre-amarela

Foi a primeira vacina a ser produzida com a aplicação da cultura de tecidos. O método baseou-se na passagem do vírus da febre-amarela em preparações de cérebros de ratos, rins ou embriões de galinha e rato embebidos num meio nutrido. Esta passagem é designada por “Atenuação Viral”, isto porque concluiu-se que a passagem do vírus por células não-humanas atenuava o crescimento viral em células humanas. Havia assim só uma resposta imune e ausência de sintomas da doença. (Offit, P., 2007).

1.3 Era das culturas em ovos

Foi descoberto através da investigação que cerca de 30 espécies de vírus cresciam em ovos. Na altura o ovo era classificado como um meio estéril, onde não havia contaminação bacteriana, sendo também um meio barato e fácil de manusear. (Offit, P., 2007).

- 1936: Vacina contra Influenza

Até aos dias de hoje, a vacina contra o vírus Influenza, ou vacina contra a gripe, é produzida a partir de ovos de embrião de galinha. O vírus é propagado numa membrana que rodeia o embrião designada por membrana alantóica. A técnica de produção baseia-se na inoculação do vírus em ovos, sendo posteriormente colhido o fluido alantóico. Este fluido é purificado com formaldeído que mata o vírus influenza, impedindo a sua multiplicação no hospedeiro e consequente proteção quando administrado ao indivíduo. Este vírus tem a particularidade de se alterar ano após ano, daí a necessidade de administrar esta vacina anualmente. (Offit, P., 2007).

1.4 Era da cultura celular

- 1955: Vacina contra a Poliomielite

A descoberta da possibilidade do vírus da poliomielite crescer em células não cerebrais de macacos, isto é células que não comprimem o cérebro e a espinha dorsal, como por exemplo, rins de macacos valeu um prémio nobel na década de 50. Esta investigação centrou-se em resolver o maior problema encontrado na década de 30, a indução da resposta imune à mielina, o que produzia efeitos irreversíveis. Assim, com a produção da vacina contra o vírus poliomielite recorrendo a culturas celulares evitou-se um grande número de mortes. (Offit, P., 2007).

- 1963: Vacina do Sarampo

A produção desta vacina baseou-se no isolamento do vírus do sarampo e a passagem deste mais de quarenta vezes por fibroblastos de embrião de galinha. O facto de permanecer em contato com a cultura celular por um longo período de tempo permitiu que esta vacina adquirisse uma elevada eficácia e uma resposta imune adequada. (Offit, P., 2007).

1.5 Era das células humanas fetais

Esta era centrou-se nas desvantagens do uso de animais como recurso para o crescimento de vírus. Um grupo de investigadores utilizou a vacina da poliomielite como exemplo para as suas descobertas. Ao usar o macaco, este tinha que ser importado e sacrificado com a remoção dos rins. Os rins seriam então colocados num meio estéril e eram inoculados com o vírus. O que os investigadores supuseram foi a probabilidade do animal estar infetado com um vírus, e quais seriam as consequências quando se administrava a vacina. E obtiveram duas respostas: se a preparação fosse tratada com formaldeído não haveria consequências graves, porque este agente químico mata vírus não-humanos; se não fosse utilizado o formaldeído havia surgimento de tumores, como foi comprovado em ratinhos. (Offit, P., 2007).

A vantagem destas células constituírem um meio estéril permitiu o desenvolvimento de vacinas contra a raiva, rubéola, varicela e hepatite A.

1.6 Era do sangue

- 1981: Vacina da Hepatite B (primeira)

Foi a única vacina com recurso a sangue humano. O procedimento inicial consistia na recolha de plasma de indivíduos infetados com o vírus, apresentando o antígeno HbsAg positivo. O plasma posteriormente era colocado em colunas imunogénicas, a fim de isolar a parte do vírus correspondente à proteína da hepatite B. Esta proteína era purificada com uma conjugação de três agentes químicos que matam qualquer vírus não humano: pepsina, ureia e formaldeído. Apesar do risco de usar sangue de pessoas infetadas, era uma vacina que apresentava uma eficácia de 99,9%. (Offit, P., 2007).

1.7 Era do DNA

Esta era centrou-se no desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, a qual se baseava na expressão de proteínas não-bacterianas em células bacterianas.

- 1986: Vacina da Hepatite B

Este método não apresentava tantos riscos quando se produziu a primeira vacina. Neste caso, era extraído um gene que codificava a proteína de superfície do vírus da hepatite B e inserido numa sequência de DNA de uma célula hospedeira, esta ao replicar-se não só produzia proteínas bacterianas mas também proteínas específicas para o vírus. Quando encapsulada e administrada ao indivíduo eram as responsáveis pela aquisição da imunidade contra o vírus da Hepatite B. (Offit, P., 2007).

Vacinas e plantas, relação em larga escala

Tabela 2 - Cronologia da vacinação.
(adaptado de (Plotkin, S., 2014))

Live attenuated	Killed whole organisms	Purified proteins or polysaccharides	Genetically engineered
18th Century			
Smallpox (1798)			
19th Century			
Rabies (1885)	Typhoid (1896) Cholera (1896) Plague (1897)		
Early 20th Century, first half			
Tuberculosis (bacille Calmette-Guérin) (1927) Yellow fever (1935)	Pertussis (1926) Influenza (1936) <i>Rickettsia</i> (1938)	Diphtheria toxoid (1923) Tetanus toxoid (1926)	
20th Century, second half			
Polio (oral) (1963)	Polio (injected) (1955)	Anthrax secreted proteins (1970)	Hepatitis B surface antigen recombinant (1986)
Measles (1963) Mumps (1967)	Rabies (cell culture) (1980) Japanese encephalitis (mouse brain) (1992)	Meningococcus polysaccharide (1974) Pneumococcus polysaccharide (1977)	Lyme OspA (1998) Cholera (recombinant toxin B) (1993)
Rubella (1969)	Tick-borne encephalitis (1981)	<i>Haemophilus influenzae</i> type B polysaccharide (1985) <i>H. influenzae</i> type b conjugate (1987)	
Adenovirus (1980) Typhoid (<i>Salmonella</i> TY21a) (1989) Varicella (1995)	Hepatitis A (1996) Cholera (WC-rBS) (1991) Meningococcal conjugate (group C) (1999)	Typhoid (Vi) polysaccharide (1994) Acellular pertussis (1996)	
Rotavirus reassortants (1999) Cholera (attenuated) (1994) Cold-adapted influenza (1999)		Hepatitis B (plasma derived) (1981)	
21st Century			
Rotavirus (attenuated and new reassortants) (2006) Zoster (2006)	Japanese encephalitis (2009) (Vero cell) Cholera (WC only) (2009)	Pneumococcal conjugates* (heptavalent) (2000) Meningococcal conjugates* (quadrivalent) (2005) Pneumococcal conjugates* (13-valent) (2010)	Human papillomavirus recombinant (quadrivalent) (2006) Human papillomavirus recombinant (bivalent) (2009) Meningococcal group B proteins (2013)

*Capsular polysaccharide conjugated to carrier proteins.

III. Vacinas

As vacinas são o método mais seguro na prevenção profilática de uma doença. O seu desenvolvimento tem sido assente em escolhas racionais desde o século XX, altura em que a imunologia descobriu a distinção entre proteção mediada pelo anticorpo ou por linfócitos. (Plotkin, S., 2014).

1.1 Vacinas ativas

A vacinação ativa envolve a administração do agente patogénico, ou parte deste – o imunogénico, uma molécula padrão associada ao agente patogénico. (Baxter, D., 2014).

Após a administração, estes agentes são reconhecidos por células específicas designadas Células Apresentadoras de Antígenos (APC), normalmente são células dendríticas (DC) que se encontram, maioritariamente, na periferia do nosso organismo. De seguida, ocorre a degradação do imunogénico a pequenos péptidos e estes a fragmentos, que são adicionalmente processados de acordo com o local de degradação. (Baxter, D., 2014).

Vacinas e plantas, relação em larga escala

O reconhecimento e processamento do imunogénico, através do complexo Major de Histocompatibilidade (MHC), fazem migrar a célula APC para órgãos linfoides, onde este complexo é apresentado a células T. Estas células sofrem expansão e transformam-se em células de memória, que são as responsáveis pela eficácia de uma vacina. (Baxter, D., 2014).

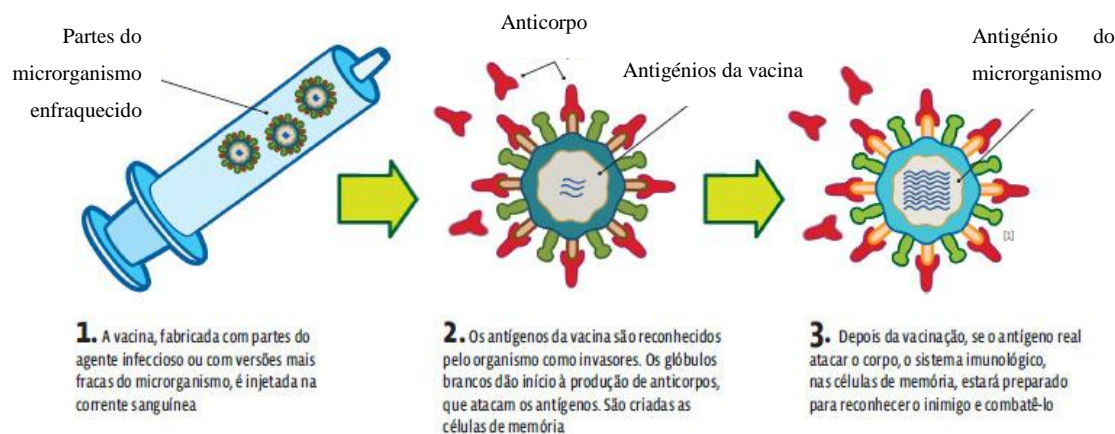


Figura 2 - Exemplo de vacinas ativas.

(adaptado de www.guidoestudante.abril.com)

Este tipo de vacinas pode ainda ser dividido em três grandes subgrupos: as vacinas atenuadas – onde o microrganismo é obtido a partir de um indivíduo infetado, o qual fica atenuado; as vacinas inativadas – onde os microrganismos são mortos por agentes químicos e as vacinas de síntese – onde é produzido o material responsável pela resposta imune (Arrazola Martinez, M. P., De Juanes Pardo, J. R.*et al.*, 2014). Cada grupo envolve um método de produção diferente. Nas vacinas atenuadas, o passo essencial centra-se na separação da parte do vírus que provoca a doença, da parte que é responsável pela imunidade. No caso das vacinas inativas, o vírus é sujeito à ação de um agente ativo, normalmente o formaldeído, que torna inativo o vírus mas não danifica as proteínas que induzem a imunização, não afetando a sua multiplicação. (Offit, P., 2007).

i. Desvantagens

Vacinas que envolvam a administração do agente patogénico são eficazes e seguras, contudo o seu sistema de produção apresenta algumas limitações. O facto de requerer um período de tempo de adaptação às culturas (seja ovo ou levedura) implica que a resposta imunitária não seja imediata, daí estas vacinas não serem adequadas para casos de surtos. (Technology, P.).

Estas vacinas são mais suscetíveis de contaminar o ser humano, visto que são utilizadas células eucarióticas e, devido à semelhança de organelos, afetam diretamente o organismo humano (Redkiewicz, P.*et al.*, 2014). No caso do uso de formaldeído nas vacinas inativadas, pode desenvolver reações adversas tóxicas. Todos os contaminantes que interfiram durante as fases de expressão e não forem eliminados na fase da purificação podem trazer consequências na saúde dos indivíduos. (Ebrahimi, S. M. e Tebianian, M., 2009).

ii. Exemplo recente da produção de vacina ativa

O vírus do Papiloma Humano (HPV) é constituído por duas proteínas estruturais, designadas por L1 e L2. Ambas estão no centro do desenvolvimento das vacinas profiláticas com a finalidade de combater o HPV. (Hassan, S. W.*et al.*, 2014).

A vacina contra o vírus HPV pode ser utilizada como exemplo de uma vacina ativa de síntese, sendo o resultado de investigações que tinham a finalidade de combater as desvantagens que apresentavam os outros tipos de vacinas ativas. (Ungaro, F.*et al.*, 2013).

A proteína L1 tem a capacidade de se agrupar em pentâmeros e subsequentemente em Partículas semelhantes a Vírus (VLPs). As VLPs apesar de se assemelharem a um virião têm a particularidade de não possuir informação genética viral, logo não apresentam poder infeccioso. (Whitehead, M.*et al.*, 2014). Assim, as vacinas produzidas para combater o vírus do HPV são baseadas em VLPs sem envelope, que induzem a produção de anticorpos e anulam a infeção. (Ribeiro-Muller, L. e Muller, M., 2014).

Atualmente existem duas vacinas comercializadas, Gardasil® e Cervarix®. Estas vacinas porém são direcionadas só para tipos de HPV em que a proteína L1 está presente e não para todos os tipos do vírus. Daí ter-se desenvolvido preparações baseadas em VLPs quiméricas de HPV, que resultaram da co expressão dos péptidos L1 e L2. (Ungaro, F., Conte, C.*et al.*, 2013).

Vacinas e plantas, relação em larga escala

Assim, e como ilustra a figura 3, para produzir uma vacina é necessário que o gene que codifica a proteína específica da superfície vírus seja inserido no genoma de uma célula de levedura. Posteriormente, esta célula vai-se replicar produzindo proteínas da superfície não contendo o DNA viral. Estas ao agruparem-se formam as VLPs que, ao serem injetadas no ser humano vão despoletar uma resposta imunitária específica no recetor das células. (Hassan, S. W., Waheed, M. T.*et al.*, 2014).

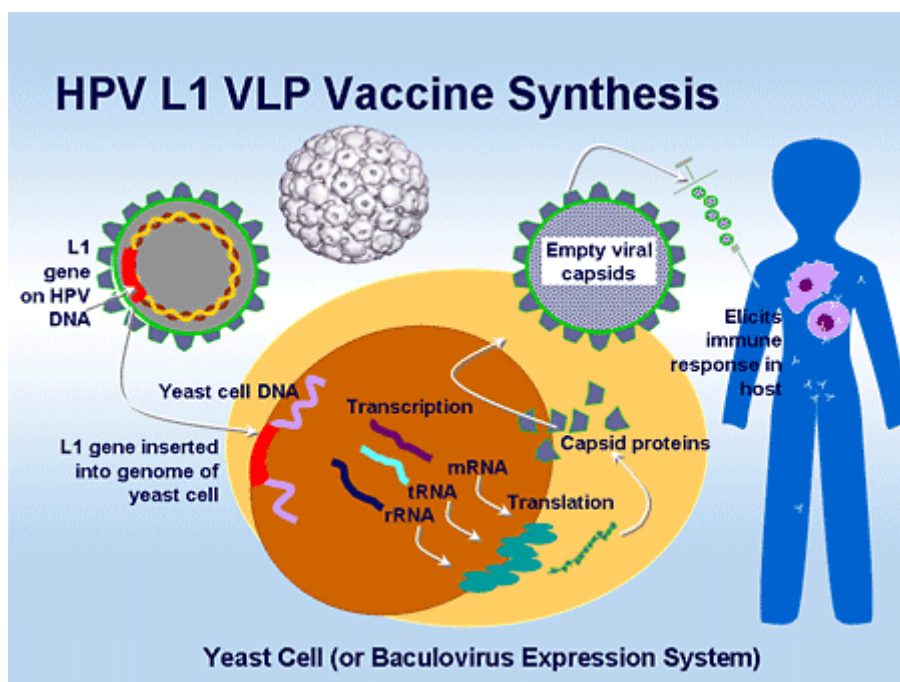


Figura 3 - Processo de produção de VLPs.

(adaptado de www.medscape.org)

1.2 Vacinas passivas

A imunização passiva baseia-se na administração de anticorpos preformados, que são obtidos a partir de um dador. (Baxter, D., 2014).

Os anticorpos administrados exercem os seus efeitos profiláticos contra doenças infecciosas de três formas distintas:

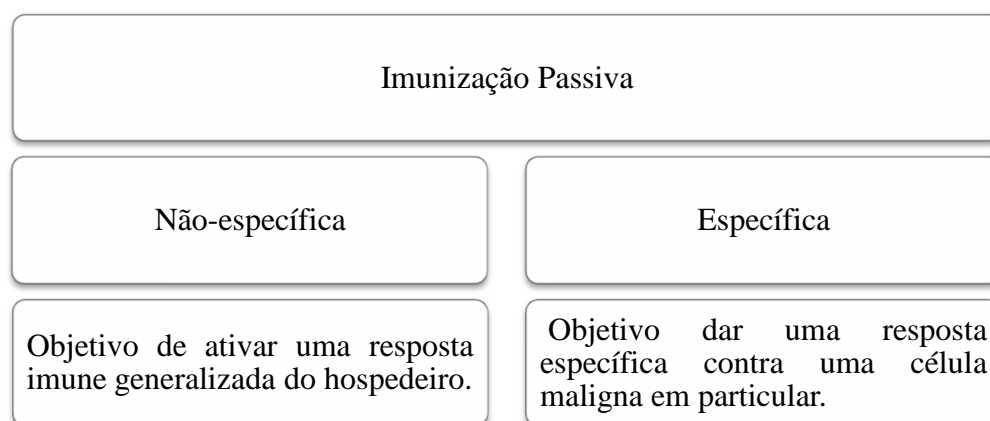
- Bloqueando uma molécula fixa ao agente patogénico ou uma toxina secretada – anticorpos neutralizantes;
- Ativando o complemento pela via clássica – Citotoxicidade dependente do complemento (CDC);
- Facilitando o mecanismo Citotoxicidade celular dependente do anticorpo (ADCC).

Vacinas e plantas, relação em larga escala

A ADCC envolve células *Natural killers* (NK), macrófagos, neutrófilos e eosinófilos que reconhecem uma molécula de imunoglobulina G (IgG), que após ligação dá origem à lise celular dessa célula infetada. Daí, as vacinas passivas terem a capacidade de serem específicas para um determinado imunogénico. (Baxter, D., 2014).

Tabela 3 - Tipos de imunização passiva.

(adaptado de (Baxter, D., 2014)



As vacinas passivas têm ainda a vantagem de poderem ser utilizadas para administrar um medicamento a uma célula maligna definida, em que os anticorpos interagem com os antígenos da célula, permitindo assim um melhor seguimento e posterior fornecimento do fármaco. (Baxter, D., 2014).

IV. Plantas

A evolução das tecnologias do DNA têm proporcionado ferramentas ideais para a produção de proteínas recombinantes, que podem ser usadas como agentes terapêuticos. Os avanços nesta área têm sido efetuados recorrendo a plantas como biorreatores com a capacidade de produzir proteínas terapêuticas direcionadas contra doenças infecciosas e tumores. (Fahad, S., Khan, F. A.*et al.*, 2014)

As plantas podem providenciar compostos terapêuticos em diversas formas, incluindo na célula ou em culturas de raiz, em estufas ou no campo. Os benefícios mais importantes do uso de plantas como biofábricas incluem a sua facilidade de crescimento (só requerem CO₂ e minerais), baixo consumo de água, custos de armazenamento reduzidos, capacidade de adaptação à cultura celular e maior controlo sob a contaminação. (Fahad, S., Khan, F. A.*et al.*, 2014). Deve-se ressaltar que as plantas têm

uma maquinaria de síntese de proteínas semelhante aos dos humanos, o que permite acomodar proteínas complexas. (Yusibov, V., 2013).

A agricultura molecular pode ser definida com um método fácil, rápido e seguro, visto que a informação genética necessária para a produção de proteínas alvo é introduzida na planta através de vetores virais que são inofensivos para os humanos. O facto de as plantas serem geneticamente modificadas evita alterações genéticas noutras plantas. (Yusibov, V.*et al.*, 2014).

Contudo, as plantas apresentam certas limitações na expressão do gene alvo, o que impulsiona os investigadores a pesquisar expressão de proteínas heterólogas em plantas e a desenvolver novas estratégias para assegurar a expressão de péptidos que podem induzir respostas imunes. (Fahad, S., Khan, F. A.*et al.*, 2014).

1.1 *Nicotiana benthamiana*

A planta *Nicotiana*, mais conhecida por planta do tabaco, é a espécie vegetal mais utilizada na produção de vacinas à base de plantas. Devido à potencial engenharia genética, ao baixo custo de obtenção e ao elevado rendimento, esta planta torna-se acessível para todos os centros de investigação responsáveis por estes estudos. (Yusibov, V., 2013). É o modelo de planta escolhido para o sistema de expressão transitório devido ao rápido crescimento e ser suscetível de agroinfiltração. (Conley, A. J.*et al.*, 2010).

A plataforma de expressão em plantas do tabaco utiliza as folhas como substrato, o que elimina a fase de floração, reduzindo significativamente fugas de genes para o ambiente através do pólen ou sementes de dispersão. Outro benefício associado a esta planta resume-se ao facto de não ser uma planta alimentar, eliminando a entrada de proteínas recombinantes em cadeias alimentares. (Conley, A. J., Zhu, H.*et al.*, 2010).

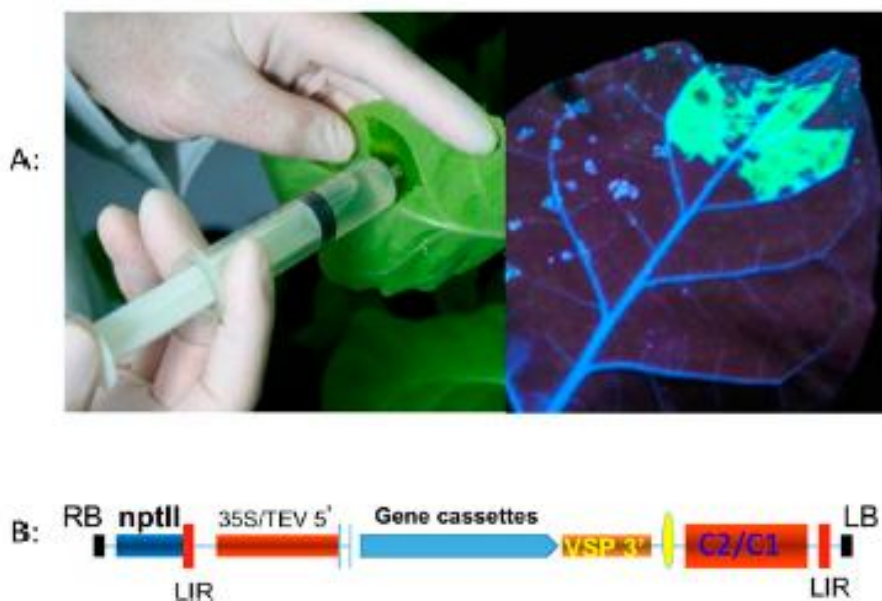


Figura 4 - (A) Planta *Nicotiana* antes e após infiltração de genes. (B) Exemplo de um vetor utilizado no sistema transitório.

(adaptado de (Yao, J.*et al.*, 2015)

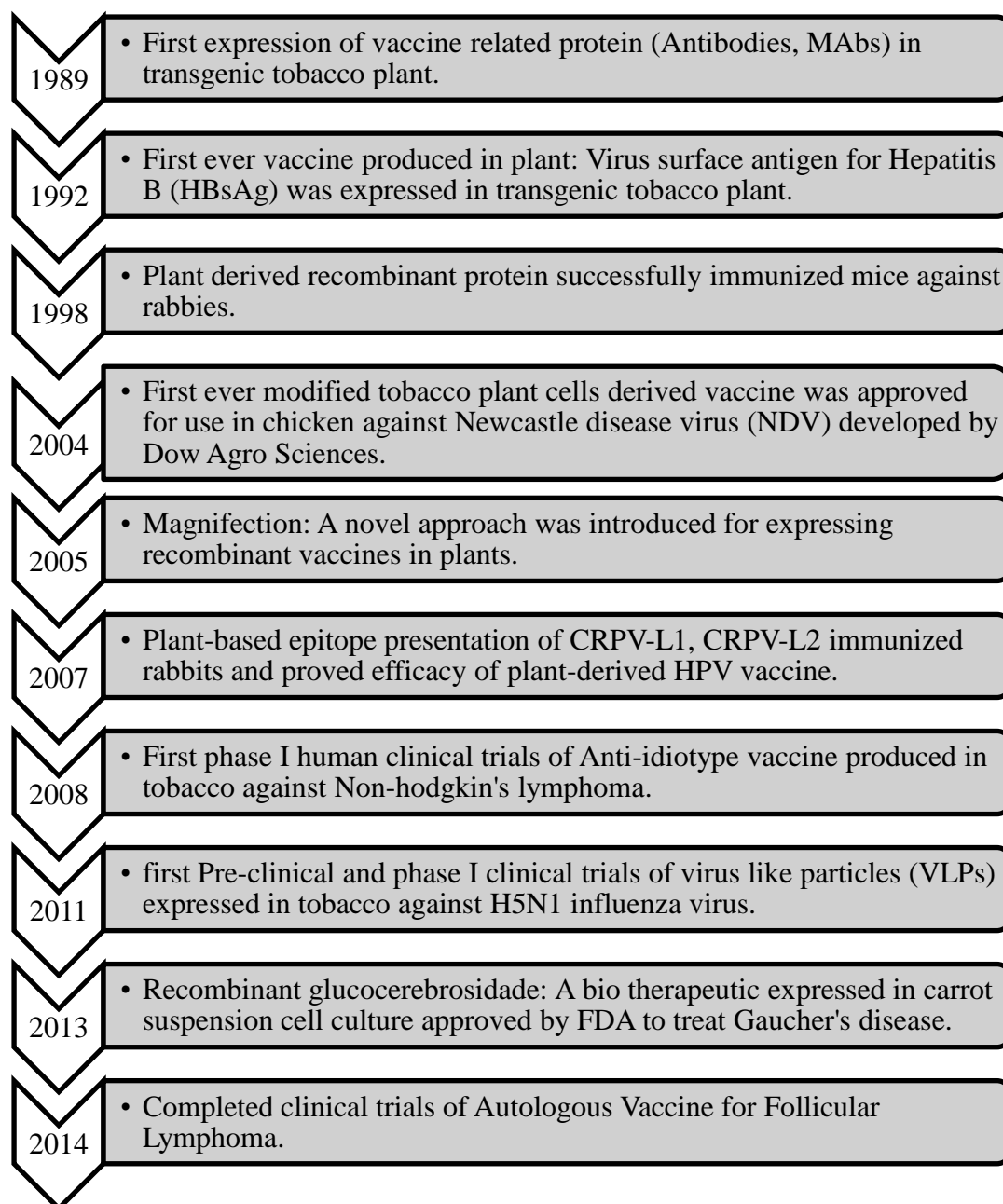
Durante a produção de vacinas estas plantas são sujeitas a um método de hidroponia, caracterizado por cultivo sob condições constantes. Têm a vantagem de se propagar facilmente por estacas e não produzir pólen viável, o que elimina potenciais perigos com bio contaminação. (Redkiewicz, P., Sirko, A.*et al.*, 2014). Em certos casos e, como ilustra a figura 4, para ser mais fácil de detetar introduz-se juntamente com o gene um vetor que tem em composição uma proteína, a Green fluorescent protein (GFP) que desenvolve fluorescência quando incidida por luz ultravioleta (UV). Esta coloração é desenvolvida normalmente após quatro dias da infiltração. (Yao, J., Weng, Y.*et al.*, 2015).

A principal desvantagem desta planta como biorreator de produtos farmacêuticos é a presença de uma elevada concentração de um alcaloide tóxico, a piridina, que se opõe à aplicação direta do extrato vegetal bruto. Para combater este obstáculo, e com recurso a engenharia genética, cruzaram-se duas linhagens transgênicas de *Nicotiana*, o resultado final designa-se por *Nicotiana* híbrida interespecífica, não apresentando alcaloides na sua composição. (Redkiewicz, P., Sirko, A.*et al.*, 2014).

1.2 Desenvolvimento da indústria biofarmacêutica à base de plantas

Tabela 4 - Eventos chave no desenvolvimento da Indústria à base de Plantas.

(adaptado de (Fahad, S., Khan, F. A. *et al.*, 2014)



Como mostra a tabela 4, o impulso de usar plantas como biofábricas aumentou quando foi expressa, em 1989, uma vacina em plantas transgênicas de tabaco. A década seguinte foi uma década de avanços e, em 1992 foi expresso o antígeno de superfície da Hepatite B (HBsAg) em plantas de tabaco. Foi também apresentada uma bactéria da malária, que produz a Enterotoxina B lábil ao calor (LTB) que é produzida em plantas *Solanum tuberosum* (planta da batata) e orientou o caminho para a produção de vacinas

Vacinas e plantas, relação em larga escala

comestíveis. O baixo nível de expressão de proteínas recombinantes em plantas era a grande dificuldade até que, em 2004, foi expresso um antígeno em sistema à base de cloroplastos, eficaz na imunização de ratinhos. Este ano, foi também marcado pela aprovação da primeira vacina vegetal para imunizar galinhas contra o vírus da doença de Newcastle. (Fahad, S., Khan, F. A.*et al.*, 2014).

No ano seguinte, 2005, surgiu um conceito inovador, designado de *Manifestation Technology* com o objetivo de aumentar a expressão heteróloga de proteínas. Em 2013, foram realizados ensaios de fase clínica I e II de compostos terapêuticos derivados de plantas, a partir de uma cultura em suspensão de células de cenoura, contra a doença de Gaucher. Em 2014, foram concluídos os ensaios clínicos para a vacina autóloga contra o linfoma folicular. (Fahad, S., Khan, F. A.*et al.*, 2014).

V. Vacinas baseadas em plantas

As vacinas baseadas em organismos fotossintéticos são um marco importante no setor de produção de vacinas e são os primeiros produtos com sucesso resultante da agricultura molecular. Foi necessário desenvolver uma alternativa às vacinas convencionais que superasse no campo da eficácia, tempo e custos de produção.

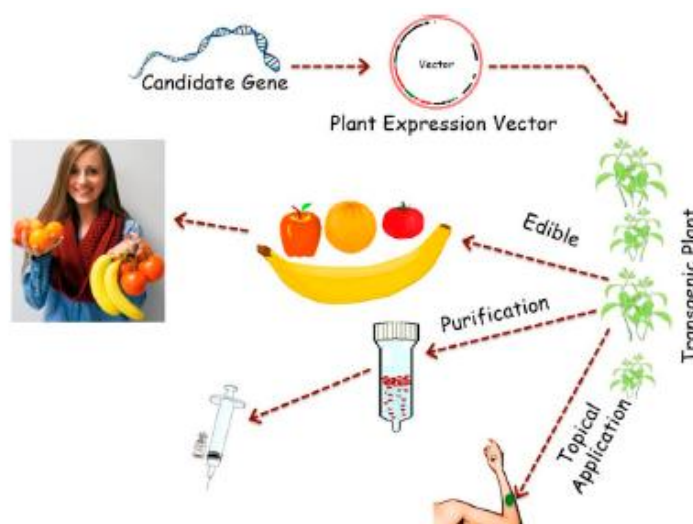


Figura 5 - Aplicações de produtos baseados em plantas.

(adaptado de (Yao, J., Weng, Y.*et al.*, 2015)

Inicialmente a ideia que prevalecia para o uso de vacinas produzidas a partir de plantas era que estas podiam ser administradas via oral, ou seja, vacinas comestíveis sem requerer ajuda de profissionais de saúde ou ambiente esterilizado. No entanto este

Vacinas e plantas, relação em larga escala

conceito perdeu credibilidade com a percepção de que a administração de uma vacina comestível requer a normalização da dose, purificação e controlo de qualidade. (Yao, J., Weng, Y.*et al.*, 2015).

Esta tecnologia à base de plantas despertou tanto interesse na indústria da vacinação, que já existem diversas empresas a testar produtos utilizando a agricultura molecular. (Yao, J., Weng, Y.*et al.*, 2015).

Tabela 5 - Exemplos de empresas que produzem produtos terapêuticos à base de plantas

(adaptado de (Yao, J., Weng, Y.*et al.*, 2015))

Company	Host	Lead Product	Expression Technology	Advantage
Mapp Biopharmaceutical/ LeafBiol, USA	Tobacco leaves	ZMapp™ for Ebola crisis	MagniCON Transient expression	Speed
Protalix, Carmiel, Israel	Carrot or tobacco cell culture	ELELYSO™ (taliglucerase alfa) Enzyme replacement	ProCellEx® Stable Expression	Quality
Icon Genetics, München, Germany	<i>Nicotiana benthamiana</i> leaves	Vaccine for non-Hodgkin's Lymphoma	MagniCON Transient expression	Speed and Personalization
Ventria Bioscience, Junction City, KS, USA	Rice seeds	VENISO for HIV-associated chronic inflammation	Express Tec Stable Expression	Scale Cost
Greenovation Biotech GmbH, Heilbronn, Germany	Moss	Moss-GAA for Pompe Disease, Moss-GBA for Gaucher's Disease, Moss-AGAL for Fabry Disease	Moss <i>Physcomitrella patens</i> based Broytechnology	Speed Scale and Customized
Kentucky BioProcessing, Owensboro, KY, USA	<i>Nicotiana benthamiana</i> leaves	Contract service	Geneware Transient expression	Speed
Phycobiologics Inc. Bloomington, IN, USA	Algae	Vaccines Growth Factor and enzymes	Microalgae expression	Speed Scale
Medicago, Québec, QC, Canada	<i>Nicotiana benthamiana</i> Alfalfa	Vaccine for influenza, Pandemic market, Rabies and Rotavirus	Proficia™ Transient Expression; Stable Expression	Speed
Synthor, Nijmegen, The Netherlands	Duckweed LeafyBiomass	Antibody for non-Hodgkin's Lymphoma	LEX system Stable expression	Speed Quality
Fraunhofer IME, Aachen, Germany	Tobacco leaves	HIV Antibody	Stable Nuclear Expression	Scale Cost
Fraunhofer CMB/iBio, Newark, DE, USA	<i>Nicotiana benthamiana</i> leaves	Influenza vaccine	Transient expression	Speed
Healthgen, Wuhan, Hubei, China	Rice seed	Serum albumin	Stable Expression	Quality Scale
PlanetBiotechnology, Hayward, CA, USA	Tobacco leaves	CaroRx for dental caries; PBI-220 antibody for anthrax; DPP4-Fc for MERS coronavirus infection	Stable Expression	Quality Scale

1.1 Sistemas de expressão em plantas

Estas vacinas exigem uma elevada expressão de genes. Os sistemas de expressão em plantas podem ser divididos em dois grandes grupos: os dependentes e os independentes do sistema de expressão. (Redkiewicz, P., Sirko, A.*et al.*, 2014).

O primeiro grupo inclui modificações de elementos das cassetes de expressão (vetores plasmídeos) e melhoria do rendimento na amplificação de vetores virais. O segundo grupo inclui modificações das sequências alvo, aumentando a fase de tradução e acumulação de proteínas. (Redkiewicz, P., Sirko, A.*et al.*, 2014). Este grupo pode ser ainda subdividido em dois outros grupos, a Expressão Estável e a Expressão Transitória, como ilustra a figura 6. (Fahad, S., Khan, F. A.*et al.*, 2014).

Estes sistemas oferecem diversas vantagens a nível de tempo e custo de produção, apresentam menor risco de contaminação e possibilidade de produção em escala. (Redkiewicz, P., Sirko, A.*et al.*, 2014).

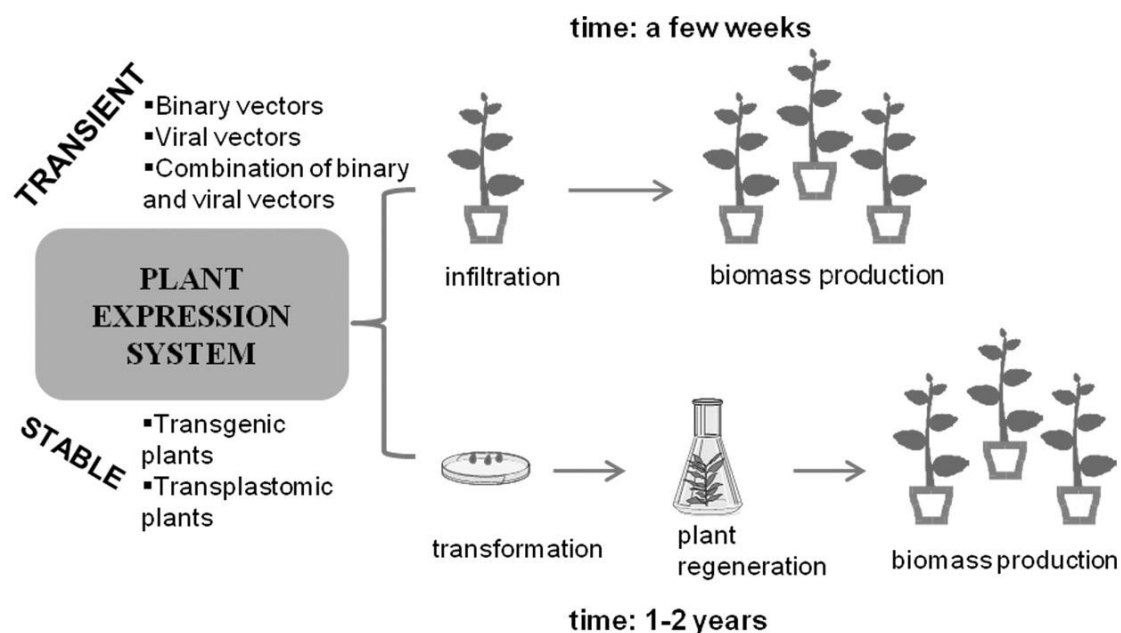


Figura 6 - Sistemas de expressão em Plantas.

(adaptado de (Redkiewicz, P., Sirko, A.*et al.*, 2014)

1.2 Sistema de expressão estável

A expressão estável consiste na transferência de um gene estranho (transgene) para o núcleo da planta ou, em alternativa, para os cloroplastos. (Redkiewicz, P., Sirko, A.*et al.*, 2014).

A entrega do gene ao núcleo da célula vegetal é efetuada com recurso a bombardeamento de micropartículas ou, de preferência, mediada por uma cultura de bactérias designada por *Agrobacterium*. Esta estratégia acarreta alguns problemas como por exemplo, interação e silenciamento de genes e risco de contaminação transgênica. (Fahad, S., Khan, F. A.*et al.*, 2014).

Em relação à inserção do gene nos cloroplastos, organelos presentes em abundância em plantas, é o método mais vantajoso visto que, têm a capacidade de serem herdados pela planta-mãe. Esta hereditariedade permite que a planta-filha produza os genes que codificam a proteína específica e não sofra mecanismos de silenciamento de genes,

evitando potenciais mutações. (Bertalan, I.*et al.*, 2015). É um método que fornece um rendimento superior em comparação à transformação nuclear, isto porque permite a expressão simultânea de um certo número de genes, o que pode resultar na conceção de vacinas de componentes múltiplos. (Hernandez, M.*et al.*, 2014).

As plantas transgênicas envolvidas neste processo requerem um determinado tempo, entre 1 a 2 anos, para produzir um número de proteínas razoável, mas por vezes esse período não é suficiente (Redkiewicz, P., Sirko, A.*et al.*, 2014). Para aumentar essa eficácia, são necessárias combinações adequadas do promotor, sequências entre 5' e 3' bem como o ajuste do codão do gene estranho. (Bertalan, I., Munder, M. C.*et al.*, 2015).

Assim, o sistema estável via transformação em cloroplastos, é o método padrão quando se recorre à expressão estável, sendo caracterizado por um nível de expressão polivalente, processamento multigénico e fraca disseminação de transgenes para o ambiente. (Gorantala, J.*et al.*, 2014).

1.3 Sistema de expressão transitória

A expressão transitória é composta por diversos sistemas de expressão. Neste caso os genes estranhos à planta não necessitam ser integrados no genoma do hospedeiro. O fator comum é a presença da cultura de bactérias *Agrobacterium* que é infiltrada na parte inferior das folhas, recorrendo ao auxílio de uma seringa ou, em alternativa, infiltração por vácuo, sendo este último o método com mais eficácia em produção em escala. (Fahad, S., Khan, F. A.*et al.*, 2014).

Entre as variantes deste sistema podemos destacar quatro: sistema do vetor *Launch*, sistema MagnICON, cassette de expressão do gene Plastocianina e série de vetor pEAQ. (Redkiewicz, P., Sirko, A.*et al.*, 2014).

Este sistema pode ser utilizado não só para a validação rápida de cassetes de expressão de plantas, mas também para a produção de proteínas recombinantes num curto espaço de tempo (Redkiewicz, P., Sirko, A.*et al.*, 2014). A principal vantagem para a produção industrial centra-se na ausência de equipamentos sofisticados, o que traz benefícios já que a expressão pode ser melhorada com técnicas de otimização. (Fahad, S., Khan, F. A.*et al.*, 2014).

i. Sistema do vetor launch (lançamento)

Este sistema combina elementos de vetores virais de RNA da planta com plasmídeos binários da cultura *Agrobacterium*. O vetor *launch* ou de lançamento contém o promotor do vírus mosaico da planta, o que conduz à transcrição inicial do genoma viral. Os genes alvos são clonados sob controlo do promotor. Com a agroinfiltração ocorre multiplicação das sequências virais dentro das células da planta. Assim, e como produto final os genes alvos clonados são amplificados juntamente com as sequências virais, sendo expressos nas plantas. (Redkiewicz, P., Sirko, A.*et al.*, 2014).

ii. Sistema MagnICON

Baseia-se na montagem da planta com vetores virais funcionais derivados de dois módulos. É um sistema que permite a expressão de produtos biofarmacêuticos contra doenças infecciosas. As células da cultura *Agrobacterium* são utilizadas como um agente de movimento sistémico, com a função de entregar replicações virais no interior das células vegetais com recurso a uma enzima recombinase específica. (Fahad, S., Khan, F. A.*et al.*, 2014). É considerado o sistema com maior eficácia tanto a nível de expressão de vetores virais como a nível de velocidade durante o processo. (Redkiewicz, P., Sirko, A.*et al.*, 2014).

iii. Cassete de expressão do gene plastocianina

É das variantes mais básicas do sistema de expressão transitória. Consiste numa cassete de expressão, contendo a montante e a jusante reguladores do gene Plastocianina, mais concretamente o promotor e o terminador. O objetivo final é a produção de VLPs recombinantes. (Redkiewicz, P., Sirko, A.*et al.*, 2014).

iv. Série de vetor pEAQ

É um sistema que se baseia em versões de comprimento total ou parcial de um vírus mosaico, que produzem uma proteína viral sem replicação de forma rápida e eficaz. Os vetores pEAQ podem ser definidos como séries de pequenos vetores binários, que são utilizados para a produção de uma diversa variedade de proteínas em ambos os sistemas (estável ou transitória). Devido às suas vantagens é usado em escala industrial. (Redkiewicz, P., Sirko, A.*et al.*, 2014).

1.4 Vetores virais

A utilização de vetores virais é outra estratégia para a produção de proteínas recombinantes em plantas. Estes vetores não se integram no genoma do hospedeiro e são caracterizados pelo seu elevado potencial de expressão, isto porque são rapidamente transmitidos entre células de plantas. (Fahad, S., Khan, F. A.*et al.*, 2014).

Os vetores virais podem ser divididos em dois grupos, de acordo com a sua função: os vetores independentes e os vetores mínimos. Os vetores virais independentes têm a capacidade de se replicar e inocular em plantas como partículas virais. A multiplicação pode ocorrer no local da injeção, contudo segue-se uma movimentação sistemática de partículas virais codificadas com o objetivo de infetarem os tecidos das plantas. Os vetores virais mínimos conseguem replicar, porém não têm aptidão para se moverem sistematicamente. Para alcançar uma maior expressão da proteína têm que sofrer modificações a nível da estrutura. (Fahad, S., Khan, F. A.*et al.*, 2014).

A principal limitação destes vetores centrava-se na incapacidade de realizar produções de proteínas recombinantes em elevado número, daí ter surgido a tecnologia MagnICON, que já foi descrita como a tecnologia com maior rendimento de produção de proteínas em células vegetais. (Fahad, S., Khan, F. A.*et al.*, 2014).

i. Vantagens

- Facilidade de isolamento biológico dos genes transferidos;
- Expressão de alto nível de proteínas heterólogas;
- Baixo custo de produção;
- Expressão versátil de proteínas específicas de anticorpos ou antigénios.

ii. Desvantagens

- Capacidade limitada de modificar as proteínas pós-tradução;
- A elevada expressão de algumas proteínas pode ter um efeito letal sobre as plantas;
- A glicosilação padrão pode produzir uma proteína não funcional, que afeta a eficácia das vacinas;

- A produção de imunoglobulinas é um processo complexo porque requer a manipulação de vetores virais.

VI. Terapias à base de anticorpos baseados em plantas

O estudo da produção e avaliação de anticorpos monoclonais (mAbs) produzidos em plantas já está em curso à 20 anos. (Hiatt, A.*et al.*, 2014).

O sistema de produção de anticorpos em plantas apresenta vantagens como a possibilidade de montar componentes múltiplos. O anticorpo mais complexo é a imunoglobulina secretora A (sIgA) com quatro cadeias diferentes. Uma vez que as superfícies das mucosas são frequentemente o local de entrada de patógenos, esta tecnologia permite o desenvolvimento de um anticorpo adequado para combater o agente infeccioso nesse local, impedindo a sua entrada, ao invés de terapias pós-exposição. (Hiatt, A., Whaley, K. J.*et al.*, 2014).

Estudos têm demonstrado que estes tipos de produtos podem proporcionar melhorias na farmacocinética, segurança e eficácia. Como exemplo destas terapias estão incluídas as vacinas passivas, descritas anteriormente. (Rybicki, E. P., 2014).

1.1 Tecnologia transgênica para produção de mAbs

A primeira técnica empregue para expressar um anticorpo numa planta envolveu a transferência de vetores recombinantes para pequenos pedaços de folhas, através da utilização de *Agrobacterium* como veículo. Os resultados iniciais da expressão de mAbs em plantas demonstraram que um certo número de isótipos de anticorpos pode ser produzido em plantas e permitiram detetar a localização de anticorpos dentro da folha. A infecção das plantas é realizada pela cultura *Agrobacterium* que entrega o DNA que codifica a imunoglobulina ao núcleo da célula vegetal. (Hiatt, A., Whaley, K. J.*et al.*, 2014).

O processo de criação de plantas transgênicas tem como desvantagem o período necessário para a sua regeneração, aproximadamente um ano, contudo beneficia da produção de cadeias de Igs desejadas. A IgG é o anticorpo mais produzido e apresenta a mesma especificidade quando comparado com o mAb derivado de células de mamíferos. Esta região pode ser substituída por uma região híbrida composta por IgG e

IgA, a fim de aumentar a produção de anticorpos funcionais. (Hiatt, A., Whaley, K. J. *et al.*, 2014).

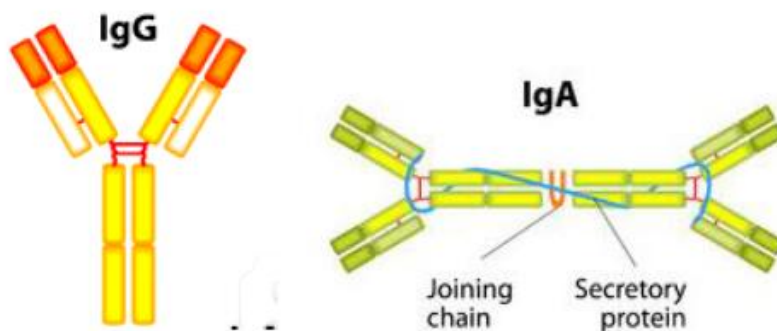


Figura 7 - Estrutura da IgG e IgA.
(adaptado de www.pt.depositphotos.com)

1.2 Tecnologia transitória para produção de mAbs

O desenvolvimento de produtos baseados em anticorpos em plantas tem vindo a evoluir, e as mais recentes técnicas têm como objetivo elevar o nível de expressão e, gerar mAbs num curto intervalo de tempo. (Hiatt, A., Whaley, K. J. *et al.*, 2014).

Neste caso, a técnica utilizada é a MagnICON, que envolve a expressão transitória do mAb, onde a infeção da célula é efetuada após a introdução de vetores em *Agrobacterium*, responsável pela entrega dos genes de mAb às células vegetais. (Hiatt, A., Whaley, K. J. *et al.*, 2014).

Esta tecnologia é mais rápida que as transgênicas, necessitando apenas catorze dias a partir da entrega de genes, para montar o mAb purificado. Visto ser um processo rápido e eficaz, tem sido a escolha para fabricar produtos terapêuticos à base de anticorpos. (Hiatt, A., Whaley, K. J. *et al.*, 2014).

VII. Plant molecular pharming

O conceito *Plant Molecular Pharming* (PMP) traduzido por Agricultura Molecular em Plantas é o método fácil, rápido e seguro aplicado na produção de vacinas baseadas em plantas. (Yusibov, V., 2013).

Vacinas e plantas, relação em larga escala

Esta ciência definida pela utilização de plantas para a produção de proteínas recombinantes em grande escala, surgiu com a produção da hormona quimérica de crescimento humano, em 1986, em plantas transgênicas. Os primeiros antigénios foram expressos em 1992, contra o vírus da Hepatite B, o HBsAg. (Rybicki, E. P., 2014).

A única limitação deste método era a dificuldade de produzir vacinas em elevada escala, mas como solução foram desenvolvidas fábricas de produção de vacinas à base de plantas automatizadas. (Yusibov, V., 2013).

1.1 Fábricas automatizadas de plantas terapêuticas

As fábricas utilizadas na produção de vacinas baseadas em plantas são constituídas por equipamentos flexíveis com tecnologias descartáveis, facilitando a rapidez e o custo dos programas de desenvolvimento dos produtos.

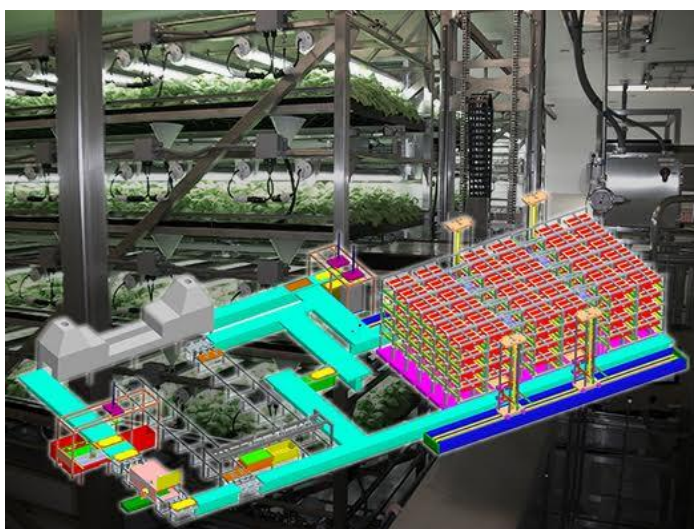


Figura 8 - Exemplificação da planta de Fábricas Automatizadas.
(adaptado de www.brittinghamagribusiness.com)

As terapias escolhidas para desenvolver as vacinas são movidas por necessidades médicas não atendidas, por exemplo a produção de um elevado volume de vacinas ou produtos terapêuticos para o tratamento de tumores. (Biotherapeutics, C., 2014).

Vacinas e plantas, relação em larga escala

Estas fábricas permitem um crescimento consistente e controlado das plantas, bem como a produção de proteínas com qualidade adequada. (Yusibov, V., 2013). É aplicado o método *vertical farming*, isto porque as plantas estão sobrepostas verticalmente sob estantes.



Figura 9 - Disposição vertical de alta intensidade de plantas em estantes.

.(adaptado de www.newscientist.com)

1.2 Modo de funcionamento

A fase zero consiste no crescimento da planta, para isso é necessário assegurar as condições ideais para obter plantas viáveis. As plantas crescem em tabuleiros ou estantes com culturas hidropônicas de lã mineral em módulos desenhados especificamente para o crescimento. O método de hidroponia consiste no cultivo da planta sob condições constantes. Assim, luz, água e nutrientes são doseados e distribuídos com precisão. Existem robôs especialmente desenvolvidos que transportam as plantas de estação para estação – desde a inserção de sementes e infiltração por vácuo até à colheita e extração. (Yusibov, V., 2013).

Após as plantas atingirem a maturidade para produzirem proteínas, estas são transferidas para outra estação. (Yusibov, V., 2013).

Como ilustra a figura 10, a fase número um consiste na síntese de um gene a partir de um vírus. Um robô seleciona uma estante com plantas, que estão invertidas, e submerge-as em água. Esta água contém o vetor viral, igualmente designado por

Vacinas e plantas, relação em larga escala

transportador genético, que possui a informação genética necessária para as plantas produzirem as proteínas específicas. (Yusibov, V., 2013).

A fase seguinte consiste na aplicação do vácuo, retirando o ar e a água das plantas. Quando este é desligado, as plantas voltam a sugar a água juntamente com o vetor. O facto de as plantas estarem invertidas permite que esta etapa demore segundos. (Technology, P.). As plantas contendo o material genético são novamente colocadas no módulo de crescimento, a incubar, para acelerar o processo. No período de quatro a seis dias, já se verifica produção de proteínas. (Yusibov, V., 2013). De seguida é feita a colheita das plantas e efetua-se a extração das proteínas, que são submetidas ao processo de purificação.

A última etapa consiste na recolha das proteínas, no corte das folhas em fragmentos pequenos e a homogeneização automática. O resultado é um líquido, que após ser centrifugado está pronto para ser embalado e comercializado. (Yusibov, V., 2013).



Figura 10 - Produção de vacinas industriais baseadas em plantas.

(adaptado de www.genengnews.com)

VIII. Exemplos de vacinas baseadas em plantas

1.1 Vacina contra vírus Influenza

O vírus Influenza é um dos agentes infecciosos virais mais comuns. É responsável pelas gripes sazonais e pandémicas. O facto de ser um vírus com elevada capacidade de se alterar, torna difícil desenvolver uma vacina que forneça imunidade para toda a vida. As vacinas contra o vírus Influenza são designadas por vacinas imperfeitas, visto que apresenta dois géneros distintos: três vírus da linhagem A e dois vírus da linhagem B. (Ebrahimi, S. M. e Tebianian, M., 2009).

Estas vacinas continuam a ser produzidas a partir de ovos de galinha, devido à sua eficácia e segurança. Contudo o recurso aos ovos requer um tempo de adaptação e um patogénico específico, daí a necessidade de desenvolver sistemas de produção rápidos e fiáveis. Uma vacina baseada em organismos fotossintéticos posiciona-se nestas necessidades. (Redkiewicz, P., Sirko, A. *et al.*, 2014).

O vírus Influenza possui duas proteínas de superfície, a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA) que são os principais antígenos responsáveis pela resposta imunitária após infeção. A HA é considerada um antígeno mais forte que a NA, daí ter mais interesse na investigação de vacinas contra a gripe. (Redkiewicz, P., Sirko, A. *et al.*, 2014).

A procura de novas estratégias para a produção da vacina contra o Influenza tem como objetivo aumentar a potência da mesma, aumentando a produção da proteína HA. O fator mais importante da expressão de HA em plantas resume-se ao facto da expressão desta proteína ser suficiente para uma produção significativa de VLPs com elevado poder imunogénico. (Ebrahimi, S. M. e Tebianian, M., 2009). Esta vacina é considerada um êxito e, ao que tudo indica, será a primeira a atingir a comercialização.

1.2 Vacina contra Aterosclerose

A Aterosclerose é uma doença inflamatória e a principal causa de acidente vascular cerebral e morte por doenças cardiovasculares. As estratégias de imunização têm como finalidade induzir resposta humoral ou reguladora das células T a fim de diminuir o processo inflamatório associado à patologia. (Salazar-Gonzalez, J. A. *et al.*, 2014).

Vacinas e plantas, relação em larga escala

A produção de vacinas à base de plantas foi a estratégia ideal para o elevado custo das vacinas convencionais. (Yusibov, V., 2013). É uma subunidade B da toxina da cólera (CTB) baseada numa proteína quimérica responsável pela expressão de dois epítopes, ApoB100 e CETP, associado aos efeitos imunoterápicos na aterosclerose. A CTB vai funcionar como uma proteína transportadora até aos epítopes. (Salazar-Gonzalez, J. A., Rosales-Mendoza, S.*et al.*, 2014).

A planta utilizada é a planta do tabaco, e a sua transformação foi efetuada pelo método de Horsch, que consiste na germinação de sementes em meio Murashile e Skoog (MS) até que as folhas atinjam um centímetro de diâmetro. Estas são posteriormente injetadas com uma cultura de bactérias onde estão presentes os dois epítopes. Na fase seguinte as folhas são secas e esterilizadas para serem cultivadas num meio rico em sais e vitaminas. Este meio é renovado de duas em duas semanas para evitar possíveis contaminações. Quando as folhas evoluírem para o estágio seguinte, isto é, atingirem a fase adulta são recolhidas e feita a extração dos epítopes, resultando um líquido límpido com as características necessárias para ser injetado à população. (Salazar-Gonzalez, J. A., Rosales-Mendoza, S.*et al.*, 2014).

1.3 Vacina contra a Hepatite B

O vírus da Hepatite B (HBV,) um vírus de DNA foi identificado por microscopia em 1970. É constituído por um invólucro lipoproteico que contém o HBsAg. As infeções por HBV são consideradas uma das mais fatais, isto porque evoluem quase sempre para quadros clínicos crónicos, tais como cirrose hepática ou carcinoma hepatocelular. (Saúde, M. D., 2004).

As vacinas contra o HBV são um exemplo de sucesso, isto porque foi necessário menos de 20 anos após a identificação do vírus para introduzir uma vacina no mercado. No entanto, eram produzidas a partir de soro humano de portadores de HBV, o que constituía um risco para a saúde do indivíduo porque podia haver possibilidade de outros vírus não identificados serem transportados. A alternativa foi desenvolver uma vacina baseada em VLPs, derivada da expressão do HBsAg em leveduras, contudo continua a ser dispendiosa para a população e por vezes não apresenta 100% de eficácia.

A estratégia mais recente centrou-se no uso de plantas assim, o HBsAg foi expresso em plantas de tabaco com a ajuda de vetores virais por técnica MagnICON. A etapa mais

importante e que torna este método mais vantajoso é a agroinfiltração por vácuo, do qual se obtém um produto mais específico e eficaz. (Rybicki, E. P., 2014).

Assim é seguro afirmar que o potencial para a produção de vacinas de HBV em plantas tem vindo a evoluir, sendo as vacinas adequadas e altamente imunogénicas. (Rybicki, E. P., 2014).

1.4 Vacina contra o Antraz

O antraz é uma doença causada por *Bacillus anthracis*, que por natureza, afeta os animais e humanos que consumam produtos de origem animal. (Gorantala, J., Grover, S.*et al.*, 2014).

A vacina aplicada em veterinária é essencialmente baseada numa mistura de *B. anthracis* atenuados e não capsulados, enquanto a vacina humana contém o antigénio protetor (PA), componente imunogénico da toxina do antraz. Contudo, estas vacinas acarretam efeitos secundários potenciais, devido à presença de resíduos virulentos. (Gorantala, J., Grover, S.*et al.*, 2014).

As plantas surgiram como alternativa, devido à segurança, à sua natural bio encapsulação e a eficácia da resposta imune com libertação gradual do antigénio. Assim e a fim de desenvolver uma vacina abrangente para ambas as necessidades veterinárias e humanas, o PA é expresso numa cultura da planta *Sinapis alba*, conhecida por planta da mostarda, por transformação mediada por *Agrobacterium*.



Figura 11 – Planta da mostarda, *Sinapis alba*.
(adaptado de www.bakingdresses.wordpress.com)

Vacinas e plantas, relação em larga escala

Para colheita da mostarda, é utilizada a folha, que serve de alimento para o gado.

Regeneração eficiente, estabilidade prolongada e armazenamento seguro de antigénios em sementes, são algumas características que fazem das culturas de mostarda o hospedeiro ideal para a expressão de antigénio de antraz. (Gorantala, J., Grover, S.*et al.*, 2014).

A expressão do gene PA é efetuada nos cloroplastos, isto porque a nível nuclear a expressão não é significativa. Assim, o gene é amplificado e clonado, formando-se um vetor contendo o gene PA. Este vetor é colocado num meio junto a sementes da cultura de mostarda e após a agroinfiltração surgem os explantes, que posteriormente são transferidos para um meio de enraizamento. As folhas obtidas já contêm o antigénio do antraz, que é o responsável pela resposta imunitária. (Gorantala, J., Grover, S.*et al.*, 2014).

1.5 Vacina contra o Ébola

O vírus Ébola foi descoberto em 1976 e é responsável por elevadas taxas de mortalidade no continente africano, onde é prevalente. É caracterizado por provocar doença hemorrágica grave acompanhada por altas febres, sendo na maioria dos casos fatal. Tem a particularidade de sofrer diversas mutações no seu genoma, dificultando assim o desenvolvimento de produtos terapêuticos eficazes. (Haque, A.*et al.*, 2015).

A produção de anticorpos anti-Ébola tem sido explorada em plantas com a finalidade de controlar surtos provocados pelo vírus. A utilização do sistema de expressão transitória de alto rendimento com base na planta *Nicotiana benthamiana*, tem vindo a ganhar importância, visto ser a planta ideal para a produção de mAbs. Estes anticorpos são produzidos na planta inteira, via agroinfiltração de vetores derivados do MagnICON. O desenvolvimento deste tipo de vetores virais permite a acumulação rápida e de elevado nível de mAbs anti-Ébola nas plantas. (Chen, Q. e Davis, K. R., 2016).

Vacinas e plantas, relação em larga escala

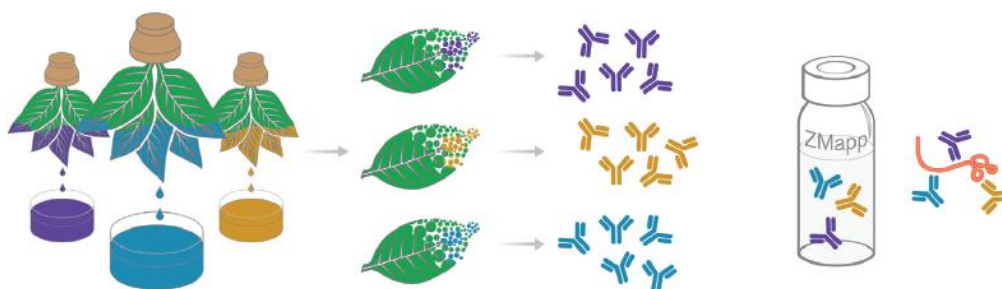


Figura 12 - Produção do ZMapp.

(adaptado de (Chen, Q. eDavis, K. R., 2016)

A promessa crescente de produtos terapêuticos baseados em anticorpos é realçada pelo sucesso da história de ZMapp™, um medicamento salva-vidas que pode ser aplicado durante um surto de Ébola. O ZMapp™ é um cocktail de três mAbs produzidos em plantas, tendo como alvo partes distintas da glicoproteína (GP) do vírus Ébola. (Haque, A., Hober, D.*et al.*, 2015). O único obstáculo da administração do ZMapp é que só apresenta eficácia no início da doença, isto porque diversas pessoas foram submetidas a este tratamento numa fase tardia da doença e acabaram por não resistir. (Yao, J., Weng, Y.*et al.*, 2015).

Estudos têm revelado o papel fundamental da glicosilação de anticorpos no desenvolvimento de um imuno-protetor contra o Ébola, assim esta GP é produzida em plantas *Nicotiana*, resultando em mAbs com homogeneidade de GP, formando o Complexo Imune de Ébola (EIC). A única dúvida que prevalece é se esta tecnologia é suficiente para ampliar a produção do ZMapp™ a fim de combater os surtos. (Haque, A., Hober, D.*et al.*, 2015).

IX. Conclusão

A vacinação surgiu no século XVIII como uma medida revolucionária na medicina, que se tornou essencial hoje em dia. A ideia de infetar um animal com partículas infecciosas de um vírus e este ganhar imunidade contra esse vírus era impensável até a data. Foi Jenner que conseguiu pôr em prática esta ideia, desenvolvendo a vacina contra o vírus da varíola. Destas investigações resultaram uma cascata de vacinas, que eram diferenciadas pelo método de obtenção. Desde o recurso a animais, culturas de tecidos, ovos, sangue, células humanas fetais até à informação genética foram desenvolvidas vacinas contra a raiva, poliomielite, febre-amarela, hepatite B, sarampo e influenza.

Com o desenvolvimento de conhecimentos as vacinas foram divididas em dois grupos, as vacinas ativas definidas pela administração de antigénios e as vacinas passivas caracterizadas pela aplicação de anticorpos preformados.

Como a maior parte dos vírus afetam países em desenvolvimento, existem questões económicas que não permitiam o desenvolvimento de vacinas. Assim, foi necessário ir à procura de novos recursos. Dessa pesquisa surgiram as plantas. Embora os métodos mais antigos, como por exemplo a inativação do vírus por inteiro ou expressão de proteínas por transcrição e tradução de DNA continuem a ser utilizados.

A utilização de plantas apresenta-se como uma tecnologia promissora para a produção de vacinas. Permitem a produção em larga escala, num curto espaço de tempo com um controlo elevado sob a contaminação do ser humano. Apresentam a vantagem de crescer de forma controlada e em tempo útil. O único obstáculo centrava-se na baixa produtividade de proteínas, contudo foram desenvolvidas dois sistemas de expressão, que permitem a expressão de antigénios ou anticorpos: o sistema estável e o transitório. O sistema estável implica a transformação genética da planta, por bombardeamento de genes estranhos, é um processo mais demorado (cerca de um ano) visto que a planta transgénica tem que regenerar. O sistema transitório é um método mais rápido porque envolve um processo de infiltração por vácuo, não havendo alteração do genoma original da planta, necessitando apenas semanas para expressar os genes. No processo industrial o sistema aplicado é a expressão transitória. (Redkiewicz, P., Sirko, A.*et al.*, 2014).

Vacinas e plantas, relação em larga escala

A espécie utilizada no fabrico de vacinas é a *Nicotiana benthamiana*, mais conhecida por planta do tabaco, sendo considerada a ideal para o processo devido à sua acessibilidade de obtenção, custo e manutenção. É uma planta que se adapta facilmente a todos os meios, produz rapidamente resultados e acarreta a vantagem de não ser uma planta alimentar. A parte utilizada é a folha, evitando a fase de floração e por conseguinte a fuga de genes através do pólen. (Yusibov, V., 2013).

As perspetivas para o aumento do uso de plantas no desenvolvimento de produtos terapêuticos estão em alta, existindo fábricas especializadas em produzir vacinas baseadas em plantas pelo mundo inteiro. Aplicam o conceito de agricultura molecular, onde as plantas em condições ambientais constantes, temperatura, água, nutrientes e luz, são manipuladas por um elevado grau de automação desde o crescimento da planta, à inserção do agente infeccioso por agroinfiltração por vácuo, até à regeneração e crescimento das plantas. O processo designa-se por *vertical pharming*, devido à elevada concentração de plantas produzidas em ambientes estanques.

Produtos como a vacina contra o Influenza e contra o Ébola são dois exemplos que estão bem encaminhados para obter sucesso e comprovar que esta tecnologia é segura e eficaz. Seja a expressar antigénios como no caso do influenza, ou anticorpos monoclonais como os mAbs anti-Ébola as plantas irão proporcionar grandes êxitos no campo da vacinação.

X. Bibliografia

- Arrazola Martinez, M. P., J. R. De Juanes PardoeA. Garcia De Codes Ilario (2014).[Vaccination--General concepts. Systematic vaccination schedules for the child and adult in Spain. Impact of vaccination programs]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 33(1), pp. 58-65.
- Baxter, D. (2014).Active and passive immunization for cancer. *Hum Vaccin Immunother* 10(7), pp. 2123-9.
- Bertalan, I., M. C. Munder, C. Weiss, *et al.* (2015).A rapid, modular and marker-free chloroplast expression system for the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biotechnol* 195, pp. 60-6.
- Biotherapeutics, C. (2014). Plant Molecular Pharming. [**Em linha**]-Disponível em: <http://www.caliberbio.com/> [**Consultado em**: Retrieved 15/02/2016.
- Chen, Q.eK. R. Davis (2016).The potential of plants as a system for the development and production of human biologics. *F1000Res* 5, pp.
- Conley, A. J., H. Zhu, L. C. Le, *et al.* (2010).Recombinant protein production in a variety of *Nicotiana* hosts: a comparative analysis. *Plant Biotechnol J* 9(4), pp. 434-44.
- Ebrahimi, S. M.eM. Tebianian (2009).Heterologous expression, purification and characterization of the influenza A virus M2e gene fused to *Mycobacterium tuberculosis* HSP70(359-610) in prokaryotic system as a fusion protein. *Mol Biol Rep* 37(6), pp. 2877-83.
- Fahad, S., F. A. Khan, N. S. Pandupuspitasari, *et al.* (2014).Recent developments in therapeutic protein expression technologies in plants. *Biotechnol Lett* 37(2), pp. 265-79.
- Gorantala, J., S. Grover, A. Rahi, *et al.* (2014).Generation of protective immune response against anthrax by oral immunization with protective antigen plant-based vaccine. *J Biotechnol* 176, pp. 1-10.
- Gregory, J. A.eS. P. Mayfield (2014).Developing inexpensive malaria vaccines from plants and algae. *Appl Microbiol Biotechnol* 98(5), pp. 1983-90.

Vacinas e plantas, relação em larga escala

Haque, A., D. Hobere, J. Blondiaux (2015). Addressing Therapeutic Options for Ebola Virus Infection in Current and Future Outbreaks. *Antimicrob Agents Chemother* 59(10), pp. 5892-902.

Hassan, S. W., M. T. Waheed, M. Muller, *et al.* (2014). Expression of HPV-16 L1 capsomeres with glutathione-S-transferase as a fusion protein in tobacco plastids: an approach for a capsomere-based HPV vaccine. *Hum Vaccin Immunother* 10(10), pp. 2975-82.

Hernandez, M., G. Rosas, J. Cervantes, *et al.* (2014). Transgenic plants: a 5-year update on oral antipathogen vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 13(12), pp. 1523-36.

Hiatt, A., K. J. Whaley, L. Zeitlin (2014). Plant-Derived Monoclonal Antibodies for Prevention and Treatment of Infectious Disease. *Microbiol Spectr* 2(1), pp. AID-0004-2012.

Lernout, T., H. Theeten, E. Leuridan, *et al.* (2014). Do Vaccines Save Lives? Yes They Do! *Acta Medica Portuguesa* 27(2), pp. 160-162.

Offit, P. (2007). *Vaccinated: One Man's Quest to Defeat the World's Deadliest Diseases*. City.

Plotkin, S. (2014). History of vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(34), pp. 12283-7.

Redkiewicz, P., A. Sirko, K. A. Kamel, *et al.* (2014). Plant expression systems for production of hemagglutinin as a vaccine against influenza virus. *Acta Biochim Pol* 61(3), pp. 551-60.

Ribeiro-Muller, L. e M. Muller (2014). Prophylactic papillomavirus vaccines. *Clin Dermatol* 32(2), pp. 235-47.

Rybicki, E. P. (2014). Plant-based vaccines against viruses. *Virology* 11, pp. 205.

Salazar-Gonzalez, J. A., S. Rosales-Mendoza, A. Romero-Maldonado, *et al.* (2014). Production of a plant-derived immunogenic protein targeting ApoB100 and CETP: toward a plant-based atherosclerosis vaccine. *Mol Biotechnol* 56(12), pp. 1133-42.

Vacinas e plantas, relação em larga escala

Saúde, M. D. (2004). *Avaliação do Programa Nacional de Vacinação e melhoria do seu custo-efectividade- 2º inquérito serológico nacional Portugal continental 2001-2002*. City.

Tecnology, P. "The GreenVax Project, United States of America."

Ungaro, F., C. Conte, F. Quaglia, *et al.* (2013). VLPs and particle strategies for cancer vaccines. *Expert Rev Vaccines* 12(10), pp. 1173-93.

Whitehead, M., P. Ohlschlager, F. N. Almajhdi, *et al.* (2014). Human papillomavirus (HPV) type 16 E7 protein bodies cause tumour regression in mice. *BMC Cancer* 14, pp. 367.

Yao, J., Y. Weng, A. Dickey, *et al.* (2015). Plants as Factories for Human Pharmaceuticals: Applications and Challenges. *Int J Mol Sci* 16(12), pp. 28549-65.

Yusibov, V. (2013). Automated plant factory for the production of vaccines. **[Em linha]-Disponível em:** <http://www.fraunhofer.de/en/press/research-news/2013/june/automated-plant-factory-for-the-production-of-vaccines.html>

[Consultado em: Retrieved 17/01/2016.

Yusibov, V., N. Kushnir, S. J. Streatfield (2014). Advances and challenges in the development and production of effective plant-based influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines* 14(4), pp. 519-35.