

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

PLANTAS TRANSGÊNICAS DE TERCEIRA GERAÇÃO: PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS DE ORÍGEM VEGETAL PARA A INDÚSTRIA FARMACÊUTICA, VETERINÁRIA E SAÚDE HUMANA

IGOR CARRAZONI FREIRE

BRASÍLIA DF

SETEMBRO/2024

IGOR CARRAZONI FREIRE

PLANTAS TRANSGÊNICAS DE TERCEIRA GERAÇÃO: PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS DE ORÍGEM VEGETAL PARA A INDÚSTRIA FARMACÊUTICA, A VETERINÁRIA E A SAÚDE HUMANA

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Agronomia da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Agronomia.

Orientador: Prof Dr Nicolau Brito da Cunha

IGOR CARRAZONI FREIRE

PLANTAS TRANSGÊNICAS DE TERCEIRA GERAÇÃO

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de XX da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em XX.

Aprovada em: ***__23__/_09___/__2024__***

BANCA EXAMINADORA

_____FAV UNB_____

Orientador

Prof.Dr. Nicolau Brito da Cunha

Universidade de Brasília

_____Membro interno FAV UNB_____

Membro da banca

Prof.Dr.Marcelo Fagioli

Universidade de Brasília

_____Membro externo UPIS_____

Membro da banca

Prof. Dra Thais de Moura Cipriano

Universidade de Brasília

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a deus que sempre me ajudou nas minhas conquistas , aos meus pais João Evangelista Freire Neto e Maria de Fátima Carrazoni**,** ao professor dr Nicolau Brito da Cunha e amigos.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, que me concedeu força, saúde e sabedoria para enfrentar os desafios ao longo dessa jornada acadêmica. Sem Sua graça e presença, este trabalho não teria sido possível.

Aos meus pais, João Evangelista Freire Neto e Maria de Fátima Carrazoni, expresso minha mais profunda gratidão. Vocês foram a base do meu desenvolvimento, sempre oferecendo apoio incondicional, amor e paciência. Nos momentos mais difíceis, quando a motivação parecia se esgotar, foi a confiança e o incentivo de vocês que me deram forças para continuar. Este trabalho é fruto do esforço conjunto, e sou eternamente grato por tudo que fizeram por mim.

Também gostaria de agradecer ao professor Nicolau Brito da Cunha, meu orientador, cuja paciência, orientação e dedicação foram essenciais para que eu pudesse trilhar este caminho acadêmico com sucesso. Sua sabedoria e disponibilidade constantes contribuíram diretamente para o desenvolvimento deste trabalho, e me ajudaram a crescer tanto no aspecto profissional quanto no pessoal.

Finalmente, não posso deixar de mencionar os meus colegas de curso, com quem compartilhei tantas experiências e aprendizados. O companheirismo e a troca de conhecimento ao longo dos anos foram fundamentais para o meu crescimento, não só como estudante, mas também como ser humano. Este trabalho é dedicado aos meus pais, João Evangelista Freire Neto e Maria de Fátima Carrazoni, que nunca mediram esforços para me proporcionar as melhores oportunidades e sempre acreditaram no meu potencial. E ao meu orientador, professor Nicolau Brito da Cunha, cuja paciência, apoio e vasto conhecimento foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

1 Capítulo 1: BIOTECNOLOGIA VEGETAL E ENGENHARIA GENÉTICA DE PLANTAS 10

1.1 A Biotecnologia Clássica e a Biotecnologia Moderna 10

1.2 A Engenharia Genética de plantas 12

1.3 Plantas transgênicas de Primeira Geração 13

1.4 Plantas transgênicas de Segunda Geração 17

1.5 Plantas transgênicas de Terceira Geração 18

2 Capítulo 2: PLANT MOLECULAR FARMING - panorama global das plantas de TERCEIRA geração 20

2.1 Plant Molecular Farming 20

2.2 Sistemas vegetais de expressão gênica 22

2.2.1 Células em suspensão.....24

2.2.2 Plantas de tabaco sob expressão transiente.....25

2.2.3 Plantas transgênicas.....27

2.3 Principais biofármacos comerciais produzidos em plantas transgênicas de Terceira Geração 27

2.4 Desafios de produção de biofármacos em sistemas vegetais 29

3 CONSIDEREÇÕES FINAIS 32

4 REFERÊNCIAS 33

RESUMO

Atualmente, as plantas transgénicas possuem papel de destaque na agricultura mundial. O seu uso extensivo está associado à redução de custos de produção, maiores opções de manejo, redução do uso de insumos agrícolas e aumento de produtividade. Existem três gerações de plantas transgênicas: as plantas de primeira geração apresentam melhorias das características organolépticas de grãos, frutos, raízes e tubérculos; as de segunda geração apresentam novas características agronômicas associadas ao manejo e à produtividade, como resistência/tolerância a diferentes formas de estresses bióticos e abióticos; e as de terceira geração são aquelas capazes de produzir moléculas de importância industrial e terapêutica para o ser humano e para animais. Os primeiros produtos das plantas transgênicas de terceira

geração chegaram ao mercado a partir da metade dos anos 2000, com grande impacto na oferta abundante e barata de moléculas de alto valor agregado, como anticorpos, vacinas, enzimas e reagentes de laboratório. Apesar de aspectos promissores, os sistemas vegetais de produção de fármacos apresentam limitações importantes, o que ajuda a explicar o pequeno número de produtos que chegaram ao mercado.

Palavras-chave: Engenharia genética de plantas; plantas transgênicas de terceira geração; biofármacos vegetais

ABSTRACT

Currently, transgenic plants play a prominent role in global agriculture. Its extensive use is associated with reduced production costs, greater management options, reduced use of agricultural inputs and increased productivity. There are three generations of transgenic plants: first generation plants show improvements in the organoleptic characteristics of grains, fruits, roots and tubers; second generation ones present new agronomic characteristics associated with management and productivity, such as resistance/tolerance to different forms of biotic and abiotic stresses; and third generation are those capable of producing molecules of industrial and therapeutic importance for humans and confined animals. The first products from third-generation transgenic plants reached the market in the second half of the 2000s, with a major impact on the abundant and cheap supply of high-value-added molecules, such as antibodies, vaccines, enzymes and laboratory reagents. Despite promising aspects, plant drug production systems have important limitations, which helps explain the small number of products that have reached the market. The objective of this work is to present a general overview of the development and impact of third-generation transgenic plants in the world, as well as their products.

Keywords: Plant genetic engineering; third generation transgenic plants; plant biopharmaceuticals.

INTRODUÇÃO

As plantas transgênicas de terceira geração foram uma grande conquista para a humanidade. No entanto, para que este feito fosse possível ,a ciência e humanidade tiveram que percorrer algumas etapas e desafios para concretizar tais realizações. Nesse sentido, houve a chegada

das plantas de primeiras de geração com a soja RR e milho Bt que trouxeram o aumento significativo na adesão de novas culturas nos Estados unidos e no mundo. Em seguida as plantas de segunda geração com o tomate flavr savr, a canola transgênicas da monsanto e o arroz dourado que melhoravam as características nutricionais e organolépticas,. Dessa forma, a chegada da terceira geração trouxe a possibilidade de tornar plantas biorreatores ou biofábricas de produtos humanos e veterinários o que permitiu a criação da insulina, fatores de crescimento, enzimas, coagulantes e vacinas. Assim, Este trabalho possui como objetivo apresentar o panorama do desenvolvimento e impacto das plantas transgênicas de terceira geração no mundo,expor a resolução normativa 16 que facilita o trâmite de produtos geneticamente modificados no Brasil, perspectivas futuras. Por fim, a metodologia usada para descrever o cenário de plantas transgênicas e avaliar seu impacto e histórico no mundo é de de revisão bibliográfica.

1 Capítulo 1: BIOTECNOLOGIA VEGETAL E ENGENHARIA GENÉTICA DE PLANTAS

1.1 A Biotecnologia clássica e a biotecnologia moderna

A Biotecnologia é a ciência multidisciplinar que utiliza seres vivos e vírus, além de seus componentes moleculares, para a obtenção de produtos e serviços (reações químicas) úteis para o homem. A Biotecnologia apresenta uma vertente bastante prática de aplicação do conhecimento racional/técnico/científico com finalidade objetiva de melhorar materialmente a vida humana (CUNHA et al., 2019).

Diversas ciências apresentam interfaces com a Biotecnologia, como a Química, a Física, a Engenharia de Alimentos, a Microbiologia, a Biologia Molecular, a Genética, a Agronomia e a Engenharia Genética. A “protobiotecnologia” data das primeiras civilizações mesopotâmicas (cerca de 8 mil anos a.C.). Sumérios, assírios e babilônios produziam bebidas alcoólicas resultantes da fermentação de açúcares derivados de cereais, como cevada, centeio e trigo, além de pães, dentre outros produtos (OBEMBE et al., 2011).

A Biotecnologia se desenvolveu e se consolidou como ciência propriamente dita apenas no século XIX, com Louis Pasteur, após a acumulação crescente de conhecimento produzido por microbiologistas do século XVII. Pasteur utilizou bactérias e vírus

enfraquecidos como imunizantes de cabras e ovelhas e provou que componentes moleculares poderiam ativar o sistema imune de mamíferos, tornando-os resistentes temporariamente a patógenos (DA CUNHA et al., 2014).

Outra grande contribuição da Biotecnologia para a humanidade foi a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1928 (Prêmio Nobel de Medicina de 1945). Este antibiótico do grupo dos betalactâmicos foi descoberto acidentalmente, a partir do crescimento do fungo *Penicillium* em placas, cujos halos de inibição indicavam a morte de bactérias no meio de cultura. A descoberta da penicilina abriu um campo imenso de pesquisa e trabalho científico que se mostra importante para a descoberta de novos biocidas até hoje.Nesse sentido, a biotecnologia é campo da ciência que envolve a manipulação de organismos vivos ou de sistemas biológicos para o desenvolvimento de produtos que beneficiam a sociedade (CUNHA et al., 2020).

No Agricultura, a Biotecnologia Clássica (que não envolve manipulação genética *in vitro*) diz respeito principalmente ao melhoramento genético de plantas, que levou a incrementos robustos e constantes dos níveis de produtividade de grãos, raízes, tubérculos, frutos, fibras e bioenergia ao longo de todo o século XX e início do XXI. O melhoramento genético vegetal e animal se baseia no entendimento e na aplicação do Evolucionismo Darwinista, nas 3 Leis da Hereditariedade de Mendel e na chamada Genética não-mendeliana (quantitativa e de populações, além das extensões à análise não-mendeliana) (KUSNADI; NIKOLOV; HOWARD, 1997).

Com o advento da Genética Molecular e Estrutural, iniciada com a publicação do artigo de James Watson e Francis Crick, em 1953, que elucidou a estrutura tridimensional da molécula de DNA, abre-se um novo cenário do conhecimento genético cujo lema é: conhecer a estrutura significa conhecer as funções moleculares. A biologia do gene, as etapas bioquímicas da expressão gênica, a elucidação do Código Genético, as modificações estruturais das proteínas, o Dogma Central da Biologia Molecular: todos estes eventos foram decisivos para o acúmulo de conhecimento que permitiria a manipulação *in vitro* dos ácidos nucléicos (OBEMBE et al., 2011).

A Engenharia Genética, também conhecida como Tecnologia do DNA Recombinante, surge no início da década de 1970, e com ela inicia-se a Biotecnologia Moderna, que possibilita a realização da manipulação *in vitro* da estrutura do DNA, dos RNAs e das proteínas. Além destes notáveis avanços científicos, outras aplicações da Biotecnologia Moderna igualmente importantes podem ser mencionadas como a clonagem e expressão de genes de interesse em organismo geneticamente modificado (OGM); a transformação genética

de microrganismos, plantas e animais; a clonagem e multiplicação de OGMs vegetais por cultura de tecidos; a clonagem de animais por técnicas de cultivo celular e transferência genômica nuclear e, mais recentemente, a edição de genomas por técnicas enzimáticas (Figura 1) (CUNHA et al., 2013, 2019, 2020).

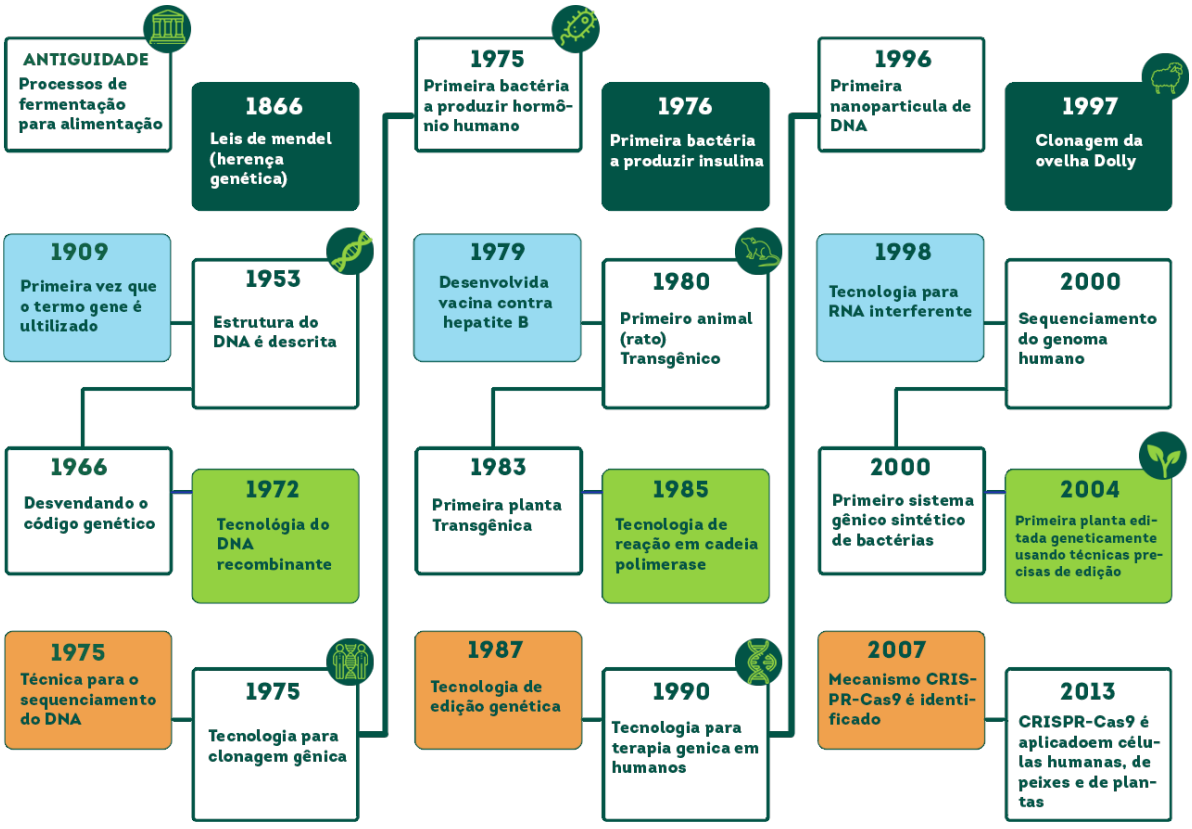


Figura 1: Principais marcos da Biotecnologia a partir da "protobiotecnologia" da Antiguidade Clássica até o desenvolvimento dos sistemas modernos de edição de genomas (CROPLIFE BRASIL, 2024).

1.2 A engenharia genética de plantas

A Engenharia Genética começa no início dos anos 1970, na Califórnia (EUA), a partir da aplicação sistemática das enzimas modificadoras de DNA (principalmente as endonucleases de restrição ("tesouras moleculares", descobertas em 1968 por W. Arber e S.

Linn) e da DNA ligase (“cola molecular”, descoberta um ano antes por M. Gellert, R. Lehman e C. Richardson) (TAMURA; TODA, 2020).

A partir da racionalização do primeiro sistema enzimático de modificação de DNA, - Paul Berg (Nobel de Química de 1980), da universidade Stanford, publica o primeiro artigo relatando a modificação *in vitro* de DNA. Berg et al. (1972) conseguiram obter uma molécula híbrida contendo o genoma do vírus SV40 (“*simian* vírus 40”) portador de um operon da bactéria *Escherichia coli*. Os vírus recombinantes obtidos foram o primeiro OGM da história (WOLFF; LEDERBERG, 1994). Um ano depois, Herbert Boyer e Stanley Cohen, respectivamente da Universidade da Califórnia São Francisco e de Stanford conseguiram realizar a biossíntese *in vitro* de plasmídeos bacterianos recombinantes contendo genes marcadores de seleção que conferiam resistência aos antibióticos estreptomicina e sulfonamida, além da transferência desses material genético para uma bactéria *E. coli*, originalmente susceptível a qualquer antibiótico, a qual se tornou resistente a ambos os antibióticos no meio de cultura (TAMURA; TODA, 2020).

A primeira planta transgênica foi desenvolvida por Luís Herrera-Estrella e Patricia Zambryski, na universidade de Gent (Bélgica), em 1983. A planta de tabaco (*Nicotiana tabacum*) recebeu um gene de *E. coli* que conferia resistência ao antibiótico Canamicina. As plantas transgênicas de tabaco apresentavam tolerância ao antibiótico em meio de cultura (OBEMBE et al., 2011). Dessa data em diante, foram desenvolvidos protocolos de transformação genética de diversas plantas de importância agronômica, como milho, soja e algodão, dentre outras (RECH et al., 2014).

Por volta dos anos 2000, houve um aperfeiçoamento de técnicas de Engenharia Genética, que levaram ao desenvolvimento de diferentes tecnologias de edição de genomas, capazes de realizar modificações precisas, acuradas, discretas e pontuais na estrutura do DNA de organismos cujos genomas já tenham sido completamente sequenciados e anotados *in sílico*. A principal destas ferramentas é o sistema CRISPR/Cas9, abreviatura de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas e da enzima 9 associada a CRISPR, do inglês: “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and CRISPR associated enzime 9) (CONG et al., 2013).

O sistema CRISPR/Cas9 permitiu um aumento significativo na precisão de obtenção de plantas geneticamente modificadas (plantas GM) *in vitro*, reduzindo consideravelmente o tempo e os custos para a obtenção de um evento elite (a planta com o melhor fenótipo desejado). O tempo gasto para a obtenção de uma planta GM elite e editada frequentemente é

de 4 a 6 anos, contra 12 a 15 anos de uma planta GM elite obtida por técnicas clássicas de Engenharia Genética (DEVILLARS et al., 2024).

Os fatores que melhor explicam as dificuldades de obtenção de plantas GM elite são a aleatoriedade dos antigos métodos de recombinação de genes em plantas, o grande tamanho dos genomas vegetais - frequentemente variando entre centenas de milhões a centenas de bilhões de bases e a complexidade genômica estrutural típica das espécies vegetais, as quais apresentam cerca de 1 a 2% de genes dispersos nos seus genomas. Como o sistema CRISPR/Cas9 permite, dentre outras aplicações, a recombinação sítio dirigida com alta precisão num lócus genômico específico, a maioria das limitações apresentadas anteriormente podem ser minimizadas com o uso deste e de outros sistemas de edição genômica (LI et al., 2024).

O uso de Engenharia Genética pode resultar em dois tipos de plantas GM:

a) as plantas transgênicas, cuja modificação genética consiste na introdução *in vitro* no genoma vegetal de um ou mais genes de interesse (denominados transgenes) cuja espécie doadora não apresente compatibilidade sexual com a planta transformada;
b) As plantas cisgênicas, cujos genes de interesse (os cisgenes) são doados por uma planta sexualmente compatível (da mesma família ou gênero) com a planta receptora.

A ampla maioria das plantas GM utilizadas na agricultura são transgênicas. Isso se deve principalmente a uma maior diversidade de fontes biológicas doadoras de genes de interesse, com maiores níveis de variabilidade genética explorável pertencer a outros organismos que não sejam as próprias plantas receptoras e a uma maior caracterização funcional de genes de microrganismos e de plantas modelo não intensivamente utilizadas na agricultura, como *Arabidopsis thaliana* (FISCHER; BUYEL, 2020).

1.3 Plantas transgênicas de primeira geração

As plantas transgênicas se subdividem em três grupos, de acordo com o seu fenótipo amplo adquirido após a transformação genética: as plantas de Primeira, Segunda e Terceira Gerações(ISAAA, 2019).

As plantas transgênicas de Primeira Geração são aquelas cujos fenótipos apresentam tolerância ou resistência a diferentes formas de estresses bióticos e abióticos. As principais formas de estresses bióticos são aquelas causadas por insetos pragas, nematóides, bactérias, fungos, ácaros, pulgões e plantas daninhas. Já os estresses abióticos são principalmente: seca,

geada, alta salinidade do solo, alta acidez do solo, baixa fertilidade do solo e sombreamento excessivo (JAMES, 2010).

As plantas pertencentes à Primeira Geração são as mais cultivadas globalmente e abarcam espécies de plantas graníferas, oleaginosas, fibrosas, fruteiras, tubérculos, hortaliças, pastagens e arbóreas. Dentre as características deste grupo de plantas, duas são as mais destacadas: a tolerância à herbicidas (TH) e a resistência à insetos (RI) (JAMES, 2010).

O caso mais emblemático de planta transgênica da Primeira Geração foi a soja Roundup Ready™ (RR) da Monsanto. A soja RR foi a primeira planta TH a chegar ao mercado, liberada comercialmente nos EUA em 1996. Esta soja é portadora de um gene mutado da cepa CP4 de *Agrobacterium tumefaciens*, capaz de codificar uma versão modificada da enzima 5-enolpiruvilshikimate-3-phosphate sintase (EPSPS), capaz de catalisar uma reação chave da via de biossíntese de três aminoácidos com cadeias laterais aromáticas e essenciais para o metabolismo de proteínas na célula vegetal: fenilalanina, tirosina e triptofano (VULCHI et al; 2022). A versão mutada da enzima EPSPS não é reconhecida nem inibida pelo princípio ativo do herbicida glifosato, tornando a planta RR tolerante à doses comerciais do glifosato (JAMES, 2010).

O sucesso de adoção global da soja RR, a qual apresenta a possibilidade de manejo facilitado de daninhas, menor custo de produção e maior produtividade frente às cultivares não transgênicas, expandiu a tecnologia para outras culturas, como milho, canola, algodão, beterraba, trigo e alfafa, além de versões mais modernas de plantas RR (como a soja RR2 Xtend™ tolerante aos herbicidas Glifosato e Dicamba) em que as células vegetais recebem mais de um gene de interesse para apresentar traços empilhados ("*stacked traits*"), como tolerância a múltiplos herbicidas e resistência a diversas espécies de insetos (SINHA, 2007).

Segundo dados da International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA), o maior repositório de dados estatísticos globais acerca das plantas GM, a área global cultivada com OGMs sofreu um aumento de 112 vezes entre 1996 e 2019 (passou de 1,7 milhão de hectares para 190,4 milhões de hectares), tornando as plantas transgênicas, especialmente as de Primeira Geração, a tecnologia agrícola mais rapidamente difundida na história (ISAAA, 2019).

As causas da adoção contínua e intensiva do uso de plantas GM em escala global são principalmente a redução dos custos de manejo, a redução no uso marginal de insumos, a ampliação do leque de estratégias de manejo integrado de pragas, de plantas daninhas e patógenos, além de aumento de produtividade (principalmente de plantas RI) (ISAAA, 2019).

A Quadro 1 mostra o ranking dos principais países produtores de plantas GM com ênfase para as áreas de cultivo e as culturas adotadas.

Quadro 1 Ranking global de países produtores de plantas GM.

Posição	País	Área (em milhões de ha)	Culturas Transgênicas
1	EUA	71,5	Soja, milho, algodão, canola, alfafa, beterraba-sacarina, mamão, abóbora, batata, maçã
2	Brasil	52,8	Soja, milho, algodão, cana-de-açúcar
3	Argentina	24	Soja, milho, algodão, alfafa
4	Canadá	12,5	Soja, milho, canola, beterraba-sacarina, alfafa, batata
5	Índia	11,9	Algodão
6	Paraguai	4,1	Soja, milho, algodão
7	China	3,2	Algodão, mamão
8	África do Sul	2,7	Milho, soja, algodão
9	Paquistão	2,5	Algodão
10	Bolívia	1,4	Soja
11	Uruguai	1,2	Soja e milho
12	Filipinas	0,9	Milho
13	Austrália	0,6	Algodão, canola, açafrão
14	Mianmar	0,3	Algodão
15	Sudão	0,2	Algodão
16	México	0,2	Algodão
17	Espanha	0,1	Milho
18	Colômbia	0,1	Algodão, milho
19	Vietnã	0,1	Milho
20	Honduras	<0,1	Milho
21	Chile	<0,1	Milho, canola
22	Malaui	<0,1	Algodão
23	Portugal	<0,1	Milho
24	Indonésia	<0,1	Cana-de-açúcar
25	Bangladesh	<0,1	Beringela
26	Nigéria	<0,1	Algodão
27	Essuatíni	<0,1	Algodão
28	Etiópia	<0,1	Algodão
29	Costa Rica	<0,1	Algodão, abacaxi
	Total	190,4	

Fonte: adaptado de ISAAA (2019).

Segundo o ranking, em 2019, os 190,4 milhões de hectares de plantas transgênicas foram distribuídos em 29 países dos quais 24 são países em desenvolvimento (56% da área) e 5 países industrializados (44% da área) (ISAAA, 2019). Ficam evidentes a adoção maciça da tecnologia pelas nações com maior vocação agrícola e o baixo grau de cultivo de plantas GM nos países da União Europeia (UE). Além dos países ranqueados, 42 outras nações importavam transgênicos para alimentação humana, alimentação animal e/ou processamento (ISAAA, 2019).

O líder do ranking, os EUA, é o país com maior volume de dados coletados acerca do uso de plantas GM. Somando-se os traços fenotípicos TH e RI, as principais culturas GM norte-americanas representam aproximadamente 95% de todos os cultivos nos EUA (Figura 2).

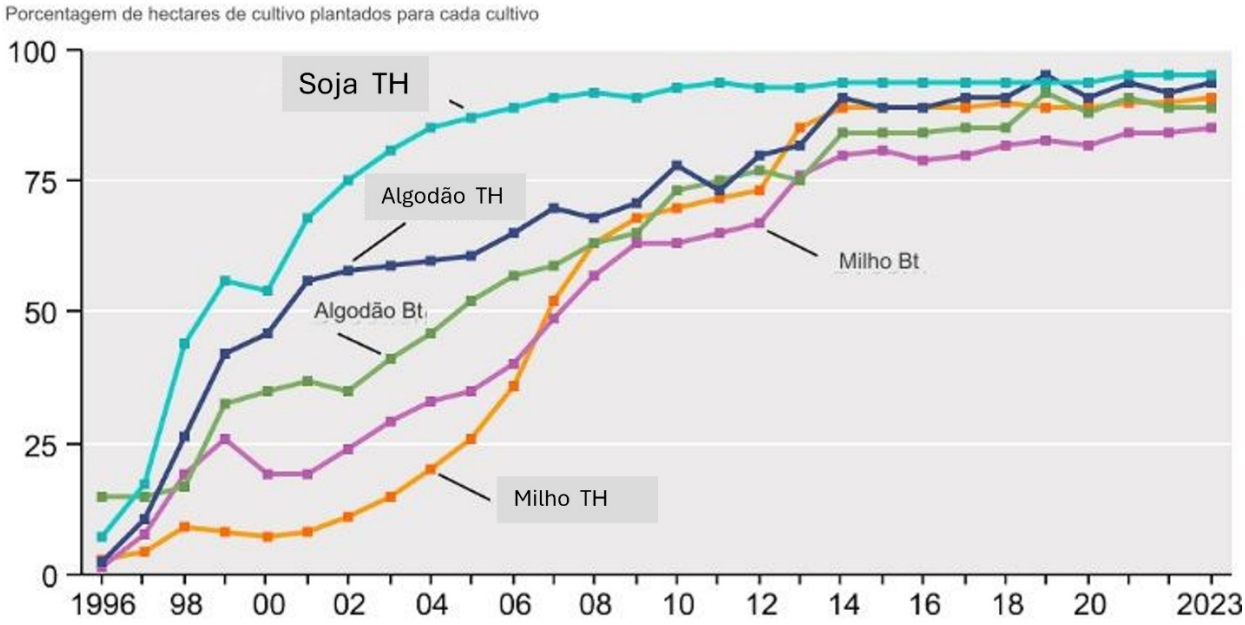


Figura 2: Adoção anual de culturas GM nos EUA a partir da liberação comercial da soja RR. O sucesso competitivo da soja RR impulsionou um crescimento exponencial da adoção de outras culturas GM 2ntre 2001 e 2011. TH: tolerante a herbicida. Bt: *Bacillus thuringiensis* (culturas que receberam genes codificadores de proteínas das famílias Cry e Cyt, capazes de lisar células gastroepiteliais de insetos mordedores/sugadores. O termo "plantas Bt" é comumente usado de maneira sinônima a plantas RI. Adaptado de ISAAA (2023).

Os demais países bem ranqueados acompanharam de perto o ritmo de crescimento norte americano e apresentam percentuais totais de adoção de culturas GM elevados: de 94% no Brasil, 90% no Canadá, 94% na Índia e quase 100% na Argentina (ISAAA, 2019).

A redução do uso de insumos, principalmente defensivos agrícolas, e o aumento de produtividade das culturas GM trouxeram benefícios econômicos inequívocos para os produtores dos países mencionados anteriormente. Separadas por traços fenotípicos, os rendimentos obtidos com o cultivo e a comercialização de plantas GM em 2018 foram os seguintes: a) culturas TH: US$ 89,02 bilhões; b) culturas RI: US$ 97,4 bilhões e c) plantas de da Primeira Geração com outras características, como tolerância à seca: US$ 0,4 bilhão; totalizando US$ 186,1 bilhões (BROOKES; BARFOOT, 2020),

Dentre as principais culturas GM, a soja, o milho, o algodão e a canola, juntas, correspondem a aproximadamente 90% das plantas transgênicas cultivadas no mundo (ISAAA, 2019). A distribuição por culturas, dentro do percentual global de plantas transgênicas pode ser observado na Figura 3.

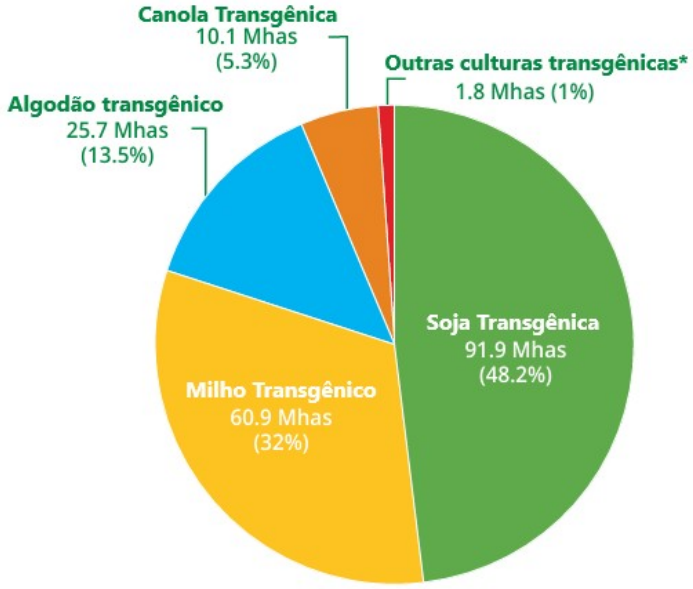


Figura 3: Percentual de adoção de culturas GM no mundo, descriminado por espécie. Mhas: milhões de hectares. Adaptado de ISAAA (2019).

Em percentuais globais, em 2019, 74% da soja, 79% do algodão, 31% do milho e 27% da canola cultivados no mundo eram transgênicos As demais culturas associadas à área de 1,8 milhão de hectares no gráfico são alfafa, beterraba-sacarina, batata, maçã, mamão, abóbora e beringela. (ISAAA, 2019).

1.4 Plantas transgênicas de segunda geração

As plantas transgênicas de segunda geração são aquelas cuja modificação genética provocou mudanças nas propriedades organolépticas de órgãos e tecidos, como a cor, o sabor, aumento de nutrientes e diminuição de componentes alergênicos e fatores antinutricionais (CUNHA et al., 2019; OBEMBE et al., 2011).

A primeira planta pertencente a esse grupo a chegar ao mercado foi o tomate Flavr Savr™, cujo projeto começou a ser desenvolvido pela companhia Calgene em 1986 e foi aprovado para comercialização nos EUA em 1994. As plantas transgênicas de tomate apresentavam um transgene codificador de um mRNA antissenso capaz de parear com o mRNA do gene endógeno da enzima poligalacturonase (poligal). O mRNA híbrido fita dupla

resultante do pareamento (dsmRNA) não era era traduzido em proteína, diminuindo os níveis da enzima poligal nas células do fruto (FENG et al., 2013). Como essa enzima está envolvida no apodrecimento do fruto mediado por etileno, baixos níveis da biossíntese da enzima levavam os frutos a tolerarem o apodrecimento por algumas semanas, sem controle de temperatura e umidade do ar. O projeto foi descontinuado por má percepção do público quanto à tecnologia, embora a estratégia genético/bioquímica do projeto tenha sido um sucesso (FENG et al., 2013).

Outras plantas importantes da segunda seração de transgênicos são:

a) A canola transgênica da Monsanto, liberada comercialmente nos EUA em 1995, capaz de expressar um transgene codificador de uma enzima dessaturase lipídica, cuja ação catalítica leva ao acúmulo de lípidios de cadeia mais curta e com mais insaturações nas caudas hidrocarbonadas, os quais são menos propensos a se aglutinarem em placas lipídicas que bloqueiam o fluxo sanguineo do sistema circulatório humano (STREATFIELD, 2007).
b) O arroz dourado (*Oryza sativa*) – Golden Rice™ produzido por Ingo Potrykus e Peter Beyer da Universidade de Berna, o qual recebeu um gene codificador da enzima fitoeno desaturase, oriundo da bactéria *Erwinia uredovora* e dois genes da planta ornamental narciso (*Narcissus pseudonarcissus*), codificadores das enzimas fitoeno sintase (psy) e licopeno beta-ciclase (beta-lcy). As três enzimas novas conseguiram catalisar reações envolvidas na via metabólica de biossíntese de beta caroteno (próvitamina A), molécula essencial para a proteção e fisiologia das células da retina. O acúmulo de beta caroteno no endosperma do arroz torna os gãos amarelados/acobreados, característica que batiza o projeto (SINHA, 2007).

Atualmente, há diversos exemplos de plantas da Segunda Geração que chegaram ao mercado, num esforço contínuo de produção de variedades transgênicas com melhorias nutricionais para as sociedades, principalmente voltadas a países em desenvolvimento.

1.5 Plantas transgênicas de terceira geração

Plantas transgênicas de Terceira Geração são aquelas usadas como biofábricas ou biorreatores de moléculas terapêuticas ou industriais. Diferente das gerações anteriores, as plantas deste grupo são capazes de biossintetizar moléculas de uso terapêutico humano e veterinário, além de moléculas aplicadas na indústria química, e também reagentes de laboratório. Dentre os principais produtos derivados de plantas da terceira geração, têm-se

vacinas, enzimas, anticorpos, hormônios e fatores de coagulação sanguínea (STOGER et al., 2005).

As plantas de terceira geração começaram a ser desenvolvidas como provas de conceito experimentais na segunda metade da década de 1980. Plantas de milho transgênico acumulando o hormônio do crescimento humano (hGH), obtidas nos EUA, foram o primeiro exemplo científico do uso de um organismo vegetal para a produção de um fármaco humano (MA et al; 2003a; SINHA, 2007).

Desde então, empresas de biotecnologia que desenvolvem e exploram plataformas vegetais como biofábricas de moléculas terapêuticas/industriais foram desenvolvidas e os primeiros produtos comerciais chegaram ao mercado.

2 Capítulo 2: PlaNT Molecular Farming - panorama global das plantas de TERCEIRA geração

1.6 Plant molecular farming

Plant Molecular Farming, Plant Farming ou Pharming, são termos que designam a produção comercial de moléculas terapêuticas em espécies vegetais. Neste contexto, as plantas transgênicas de Terceira Geração, são utilizadas como biofábricas ou biorreatores de moléculas terapêuticas ou industriais (DA CUNHA et al., 2014).

Essas plantas recebem um ou mais transgenes codificadores de RNAs ou proteínas de interesse para a indústria, os expressam completamente e podem ter os produtos moleculares resultantes extraídos mecânica e quimicamente de órgãos e tecidos vegetais e purificados ou, em algumas plataformas, secretados para meios de cultura, além da possibilidade de consumo *in natura* quando trata-se de uma fruta ou hortaliça (OBEMBE et al., 2011).

No contexto da produção de moléculas terapêuticas/industriais a nível comercial, há diversos sistemas recombinantes (GM) disponíveis, cada um com características particulares. Via de regra, não há um sistema intrinsicamente superior aos demais em termos de vantagens biotecnológicas e econômicas. A relação RNA/proteína de interesse *versus* sistema de biossíntese deve ser planejada, testada e avaliada caso a caso. O Quadro 2 mostra as principais características dos diversos sistemas de expressão de genes e biossíntese de fármacos recombinantes (MA et al; 2003a; MORAVEC et al., 2007).

Quadro 2. Características da produção de proteínas recombinantes biossintetizadas em diferentes sistemas GM.

Sistema de expressão	Capacidade de escalonamento	Custo de armazenagem	Custo total	Qualidade	Realizam glicosilação	Risco de contaminação	Tempo de produção
Bactéria	Alta	Moderado	Baixo	Baixa	Não	Por endotoxinas	Curto
Levedura	Alta	Moderado	Médio	Média	Incorreta	Baixo	Médio
Células de mamíferos (cultura)	Muito baixa	Alto custo	Alto	Muito alta	Correta	Por vírus, príons e DNA oncogênico	Longo
Animais (OGM)	Baixa	Alto custo	Alto	Muito alta	Correta	Por vírus, príons e DNA oncogênico	Muito longo
Células vegetais (cultura)	Média	Moderado	Médio	Alta	Diferenças mínimas	Baixo	Médio
Plantas (estável)	Muito alta	Baixo custo	Muito baixo	Alta	Diferenças mínimas	Baixo	Longo
Plantas (transiente)	Muito alta	Baixo custo	Muito baixo	Alta	Diferenças mínimas	Baixo	Curto

Plantas (estável): plantas transgênicas estavelmente transformadas. Plantas (transiente): plantas que apresentam expressão transiente ou transitória de genes de interesse. Adaptado de MA et al. CHRISTOU, (2003a).

Apesar de diversas vantagens relativas observadas na produção de proteínas recombinantes em sistemas vegetais, os sistemas microbianos (principalmente *E. coli* e leveduras) ainda são os sistemas mais utilizados no mundo para esse fim, porque agregam características extremamente interessantes para o *pipeline* de desenvolvimento de fármacos (MORAVEC et al., 2007).

No entanto, nos últimos 15 anos, os sistemas vegetais começaram a ser gradualmente mais explorados e hoje ocupam posição de destaque na Biotecnologia de terapêuticos. As principais vantagens dos sistemas vegetais são: alta capacidade de escalonamento de produção, principalmente sob cultivo protegido e quando se utilizam espécies sensíveis à manipulação de fotoperíodo; baixo custo de produção médio (requerem, água, solo fértil e luz abundante e, em poucos casos, reatores estéreis); capacidade de realização de modificações estruturais pós-traducionais em proteínas complexas; capacidade de sintetizar proteínas de cadeias longas e com alta massa molecular; baixos riscos para a saúde humana por não serem veículos carreadores de príons, vírus de mamíferos e oncogenes; algumas plantas são acumuladoras naturais de proteínas em órgãos e tecidos de reserva, como sementes, e alta estabilidade de biossíntese e armazenamento de proteínas em sementes, tubérculos e

cloroplastos (BOOTHE et al., 2010; DA CUNHA et al., 2014; FISCHER; BUYEL, 2020; MA et al; 2003a).

As principais ventagens dos sistemas vegetais de produção de terapêuticos podem ser observados na Figura 4.

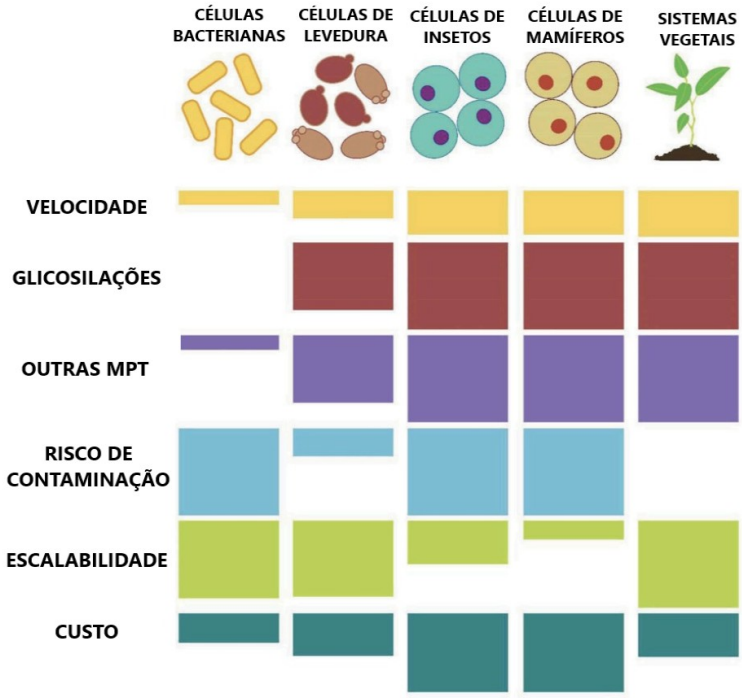


Figura 4: Comparação dos diferentes aspectos de biossíntese de moléculas terapêuticas entre os principais sistemas de expressão utilizados pela indústria. MPT: modificações pós-traducionais. Fonte: Adaptado de OLIVEIRA *et al.* (2020).

1.7 Sistemas vegetais de expressão gênica

Sistemas vegetais de expressão gênica são plataformas biológicas de produção de moléculas terapêuticas nas quais as diversas etapas de biossíntese são realizadas sequencialmente. Cada sistema vegetal apresenta peculiaridades, vantagens e desvantagens intrínsecas à estrutura do lócus genômico no qual o gene de interesse foi inserido; o número e a posição de integração de cópias do gene no genoma, o promotor gênico, a presença de sequências de trânsito/exportação/secreção de proteínas; o tipo de células transformadas e a espécie vegetal utilizada. Basicamente há duas estratégias de expressão de genes de interesse em sistemas vegetais: a expressão estável e a expressão transiente (MA et al., 2003a; O'KEEFE et al., 2015).

A) A expressão estável é aquela em que uma ou poucas células, livres ou organizadas em fragmentos de tecidos celulares (explantes), recebem os genes de interesse integrados ao seu genoma, sofrem processos de multiplicação e diferenciação

celulares *in vitro* (técnicas de cultura de tecidos vegetais) e regeneram uma planta completa em que todas as células vegetais, somáticas e produtoras de gametas são geneticamente modificadas. Neste tipo de estratégia, há a possibilidade de expressão dos genes de interesse em todas as partes da planta e de transmissão da característica para a próxima geração, via pólen ou óvulo (OBEMBE et al., 2011);

B) A expressão transiente é aquela em que suspensões de vírus ou bactérias GM são injetadas nas folhas e caules de plantas jovens ou adultas e induzem a transformação genética apenas de células somáticas. Após a parte aérea ser inoculada, a expressão dura por períodos variáveis - pode chegar até a 20 dias - mas decai com a morte e a substituição das células transgênicas por células não transgênicas (CANTORAL et al., 1995).

Ambas as estratégias podem ser observadas na Figura 5.

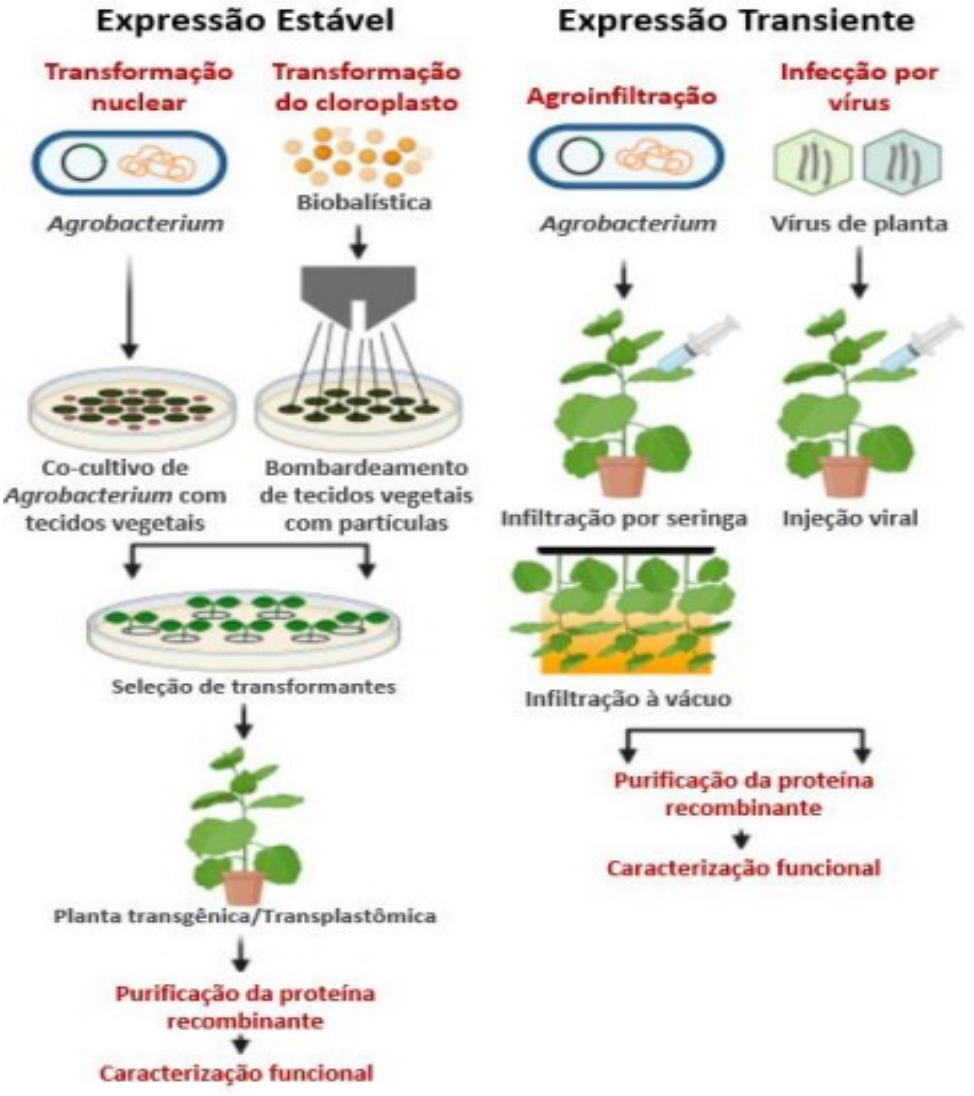


Figura 5: Estratégias de expressão de transgenes em diferentes sistemas vegetais. Na expressão estável, genes de interesse são introduzidos no genoma de explantes vegetais por método biológico (*A. tumefaciens*) ou método físico (biobalística). Após a seleção dos explantes transgênicos em meio de cultura com agentes seletivos (antibióticos ou herbicidas), as plantas completas regeneradas podem expressar os genes de maneira conveniente tanto em células somáticas quanto em células produtoras de gametas, a depender dos promotores gênicos utilizados, além de transferir a característica nova para a próxima geração. Já na expressão transiente, plantas jovens ou adultas são inoculadas com suspensão de bactérias e vírus previamente engenheirados, capazes de transformar apenas células somáticas da parte aérea das plantas, as quais expressam os transgenes temporariamente, sem transmitir a característica para a próxima geração. Adaptado de SHANMUGARAJ (2021).

1.7.1 Células em suspensão

O uso de cultura de células de plantas como alternativa para a produção de proteínas recombinantes, combina as vantagens de sistemas de expressão vegetais com os sistemas microbianos. Esse sistema é constituído de células clones GM capazes de se multiplicar por mitose, realizar a expressão de transgenes, modificar a estrutura de proteínas e secretá-las para o meio de cultura, a partir do qual as proteínas serão purificadas (KUSNADI; et al., 1997).

A transformação genética de células de plantas envolve introdução de genes exógenos pelo método de biobalística (brito da Cunha; Leopoldo Rech Filho, 2008). São utilizados, normalmente, peptídeos-sinais para o transporte das proteínas recombinantes pela via secretória (reticulo rugoso/retículo liso/complexo de Golgi/vesículas lipídicas e membrana plasmática) e liberação das mesmas para o ambiente extracelular (MORAVEC et al., 2007).

Neste contexto, proteínas de tamanho reduzido e massa entre 20 KDa e 30 KDa possuem maior possibilidade de atravessar a membrana plasmática e a parede celular, o que não ocorre, na mesma proporção, com proteínas de maiores dimensões, as quais, podem ficar retidas na via secretória e dificultar sua recuperação e purificação (TWYMAN et al., 2003).

As vantagens desse sistema são o rigoroso controle de produção, a alta qualidade do produto final e a possibilidade de purificação rápida do meio após a secreção. O controle está atrelado às condições de crescimento de células vegetais em ambientes estéreis, e ao uso de protocolos rigorosos de purificação de proteínas, resultando em produtos de boa qualidade. No entanto, o uso de meios de cultura sofisticados e biorreatores complexos encarecem o custo de produção (TWYMAN et al., 2003).

Atualmente, as suspensões de células de folhas de tabaco são comumente utilizadas produção de proteínas heterólogas em nível de validação de prova de conceito. Células de outras culturas, como raízes de tabaco, tomate, arroz e soja já foram utilizadas para produzir vacinas, eritropoietina, interleucinas e antígenos vacinais a nível de testes laboratoriais (STOGER et al., 2005).

O sistema de suspensão de células transgênicas de cenoura (*Daucus carota*) foi utilizado pela empresa israelense Protálix, para a biossíntese em escala comercial da enzima (taliglucerase alfa)/glucocerebrosidase. O produto, denominado Elelyso™ é uma enzima utilizada para o tratamento da doença de Gaucher e foi, em 2012, a primeira molécula terapêutica humana a ser liberada comercialmente no mundo (para uso nos EUA e em Israel) (CULLUFI et al., 2024).

1.7.2 Plantas de tabaco sob expressão transiente

A expressão transiente ou transitória é realizada principalmente em tabaco, utilizando-se as espécies *Nicotiana benthamiana* e *Nicotiana tabacum*. As duas espécies de tabaco são plantas modelo para a transformação genética por apresentarem uma séria de características desejáveis: há diversos protocolos e métodos de transformação genética bem caracterizados para ambas as espécies de tabaco, os seus genomas já forma completamente sequenciados e anotados *in sílico*, elas apresentam ciclo relativamente curto (entre 90 e 120 dias – mas que geralmente é interrompido aos 30 dias), produzem grande quantidade de sementes e de biomassa vegetal na parte aérea, apresentam sistemas de cultivo bem definidos, além de compatibilidade com vetores virais de expressão gênica (TORTI et al., 2021).

No contexto da expressão transiente, plantas jovens de tabaco (aproximadamente com 15 dias de cultivo) são infiltradas com suspensão de células GM de *A. tumefaciens* (as mais utilizadas) ou de vírus como o *Tobacco Mosaic Virus* (TMV), portadores de fragmentos de DNA conhecidos como vetores virais (GLEBA et al., 2014).

Há três gerações de vetores virais, sendo a terceira a que permite maiores níveis de expressão gênica. Os vetores virais de terceira geração apresentam potentes promotores virais "fortes" (como o promotor Arab2 - de arabinose), que induzem altos níveis de expressão de poucos genes dispersos ao longo do *cassete* de expressão. Geralmente estão sob controle do promotor um gene codificador de uma RNA polimerase dependente de RNA (RpRd) e o gene de interesse, além de íntrons dispersos dentro do cassete. A RpRd multiplica os mRNAs produtos da transcrição do gene de interesse e os íntrons permitem o processamento e a

exportação do mRNA maduro do núcleo para o citosol ou para o retículo liso (GLEBA et al, 2014).

Outro fator de aumento da transcrição do gene de interesse é o acúmulo nas plantas infiltradas da proteína p19 do *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), um polipeptídio codificado por um gene de interesse extra que inibe o silenciamento gênico, resultando em um aumento de até cinquenta vezes nas taxas de transcrição do principal gene de interesse nas folhas (TORTI et al., 2021).

A suspensão de células de bactérias portadoras dos vetores virais contendo os genes de interesse são inoculadas na face abaxial das folhas de tabaco ou entram pelos estômatos via vácuo (agroinfiltração). As bactérias *A. tumefaciens* realizam a transformação genética na folha, célula a célula, espalhando as cópias do vetor viral contendo o *cassete* de expressão por uma área foliar frequentemente equivalente a 80% da folha. O promotor forte ativa a expressão gênica e altas taxas de transcrição do gene da RpRd e do gene de interesse ocorrem, permitindo o acúmulo maciço de RNAs e proteínas recombinantes (GILS et al., 2008).

Os níveis de acúmulo de proteínas solúveis totais nas folhas (PSTs) frequentemente chega a 80% e o rendimento de biossíntese pode chegar a 1 a 10g de proteínas recombinantes/Kg de folhas transformadas (GLEBA et al, 2014).

Como nem todas as células da parte aérea são transformadas, e pelo fato de a expressão dos transgenes requerer quantidades grandes de ATP nas células transformadas, a divisão por mitose das células não transgênicas tende a ocorrer mais rapidamente que a das transgênicas, resultando em uma cinética de expressão crescente até aproximadamente 7º ao 9º dias após a infiltração, seguida de uma queda gradual até desaparecer por volta do 15º ao 20º dias (GLEBA et al., 2014).

O sistema apresenta alta capacidade de escalonamento e é o mais utilizado dentre os sistemas vegetais no contexto de *Plant Molecular Farming*, tanto a nível de validação experimental quanto para a produção comercial de produtos biotecnológicos (Figura 6). Cientistas da empresa Medicago Inc, por exemplo, conseguiram obter 100 microgramas de proteínas recombinantes semanalmente, a partir da agroinfiltração de 7.500 folhas de tabaco por semana (WERNER et al., 2011).

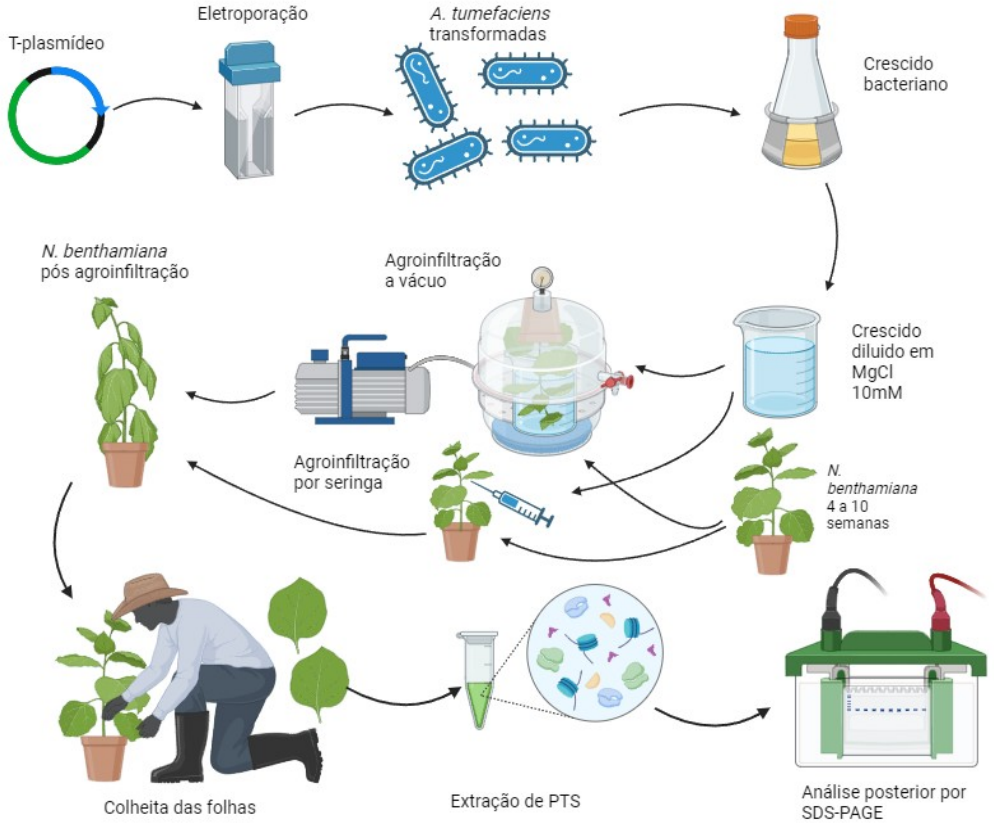


Figura 6: Visão geral de uma plataforma de expressão transiente de genes em tabaco. Adaptado de Gomes (2024).

1.7.3 Plantas transgênicas

No contexto do *Plant Molecular Farming*, as plantas transgênicas são biorreatores vegetais que apresentam como estratégia de produção de moléculas terapêuticas/industriais primariamente a transformação estável (TWYMAN et al., 2003).

A obtenção de plantas transgênicas depende do estabelecimento de protocolos de transformação genética, bem como de seleção de explantes e cultura de tecidos. A integração de transgenes pode ser realizada no genoma nuclear, no genoma mitocondrial ou no genoma dos cloroplastos (plantas transplastômicas) (SINGH et al., 2023).

As plantas transgênicas produtoras de proteínas recombinantes geralmente são cultivadas em casa de vegetação para evitar o fluxo gênico, uma vez que podem transferir gametas portadores dos transgenes para plantas sexualmente compatíveis. Dessa forma, é possível monitorar o fenótipo da progênie, avaliar ao longo de várias gerações a eficiência de biossíntese de proteínas recombinantes e planejar cruzamentos com variedades

agronomicamente relevantes. Dessa forma, é possível obter plantas-elite altamente produtivas, homozigotas para o gene de interesse e capazes de acumular quantidades significativas de proteínas recombinantes (MA; DRAKE; CHRISTOU, 2003a).

As principais vantagens das plantas transgênicas em relação aos demais sistemas vegetais são a possibilidade de aumentar os níveis de estabilidade pós-traducional restringindo a expressão gênica para sementes, tubérculos ou raízes, além de endereçar as proteínas para organelas típicas de acúmulo protéico estável, como vacúolos (TWYMAN et al., 2003).

1.8 Principais biofármacos comerciais produzidos em plantas transgênicas de Terceira Geração

A partir do início dos anos 2000, as primeiras proteínas recombinantes chegaram ao mercado. Essas moléculas apresentam as mais diferentes estruturas, funções e propriedades físico-químicas (Quadro 3).

Produto	Planta e estratégia de expressão	Aplicação	Empresa
Avidina e β-glucuronidase	Milho (estável)	Reagentes de pesquisa	Merck/subsidiária MilliporeSigma
Lectinas, fatores de crescimento, citocinas	*N. benthamiana* (transiente)	Reagentes de pesquisa	iBio, Inc.
Antígenos, anticorpos, citocinas, enzimas, proteínas virais e similares	*N. benthamiana* (transiente)	Reagentes de pesquisa	Leaf Expression Systems
Partículas virais inspiradas no SARS-CoV-2	*N. benthamiana* (transiente)	Vacina humana	Medicago, Inc.
ZMapp	*N. benthamiana* (transiente)	Anticorpo	Mapp Biopharmaceutical, Inc.
Pegunigalsidase alfa	Cenoura (estável)	Reposição enzimática	Protalix Biotherapeutics
Glucocerebrosidase	Suspensão de células cenoura (estável)	Reposição enzimática	Protalix Biotherapeutics
Fatores de crescimento	Cevada (estável)	Cosméticos	ORF Genetics
Partículas semelhantes ao vírus da gripe	*N. benthamiana* (transiente)	Vacina humana	Medicago, Inc.

Adaptado de EIDENBERGER; KOGELMANN; STEINKELLNER, (2023).

Embora as plantas sejam capazes de biossintetizar produtos estruturalmente complexos (como anticorpos completos) com alta qualidade, poucos biofármacos à base de plantas atingiram etapas avançadas no processo de desenvolvimento comercial, foram submetidos a testes clínicos ou mesmo chegaram ao mercado. As principais razões para esse fenômeno estão associadas a baixos rendimentos de biossíntese, altos custos de purificação e barreiras/restrições regulatórias (EIDENBERGER; et al., 2023).

Dentre os produtos liberados comercialmente, um dos exemplos mais interessantes é a enzima Elelyso™, mencionada anteriormente ela é responsável por tratar a Doença de Gaucher, uma doença genética rara (afeta 1 a cada 100 mil pessoas) que se manifesta pela produção de uma versão mutada da enzima glucocerebrosidase, a qual não consegue degradar esfingolipídeos nos lisossomos (CULLUFI et al., 2024). O acúmulo de esfingolipídeos em excesso nas células, leva a falência fisiológica da célula, seguida de morte celular. A Elelyso™ produzida em suspensão de células de cenoura, é uma versão ativa da glucocerebrosidase que não apresenta ácido siálico na sua estrutura, um glicano que pode eventualmente diminuir a eficácia terapêutica da droga (CULLUFI et al., 2024).

Outra classe de produtos comerciais são os chamados “plantibodies”, as imunoglobulinas (anticorpos produzidos em plantas transgênicas). Eles representam um dos maiores desafios tecnológicos de biossíntese em plantas, devido à sua complexidade estrutural, a qual exige um ambiente oxidativo adequado para formar pontes de dissulfeto, essenciais, para o estabelecimento de ligações das cadeias protéicas leve e pesada típicas de anticorpos (OBEMBE et al., 2011).

Os anticorpos recombinantes possuem alta relevância médica tanto como moléculas terapêuticas quanto como elementos de diagnóstico molecular. Diversos tipos de anticorpos, como fragmentos Fab, scFvs, "diabodies", "minibodies" e até anticorpos secretórios já foram produzidos em diferentes espécies vegetais, muitos em nível de validação experimental, mas poucos a nível comercial (EIDENBERGER;et al., 2023; MA;et al ., 2003a).

O Zmapp™ é um anticorpo utilizado para neutralizar antígenos do vírus ebola, produzido pela empresa norte americana Kentucky BioProcessing. Esta droga apresenta três anticorpos monoclonais e foi produzida transientemente em *N. benthamiana* e utilizado para conter o surto da doença de Ebola vírus (*Ebola vírus disease* - EVD) que eclodiu na África ocidental entre 2014 e 2016 e no Congo, no biênio 2018/ 2019. Após passar por testes clínicos conduzidos pelo *National Institutes of Health* (NIH) nos EUA e na Libéria, em 2015, a droga foi liberada comercialmente, em outubro de 2020, pelo Food and Drug Administration (FDA) para tratamento de EVD causada pelo *Zaire ebolavirus* (SCHAEFER et al., 2024).

Além de enzimas e anticorpos, vacinas também são importantes moléculas produzidas por plantas transgênicas da Terceira Geração. A mais significativa delas é a baseada na formação espontânea da estrutura protéica similar à capsídica do vírus nSARS-CoV-2 - causador da síndrome respiratória aguda (SARS) - mas sem o genoma viral, numa versão similar ao vírus, imunogênica, mas não patogênica. As partículas imunogênicas baseadas no nSARS-CoV-2 (as *nSARS-CoV-2 virus-like particles*) são formadas quando proteínas estruturais do vírus se aglutinam e interagem, resultando num arranjo molecular complexo tridimensional. Além de imunogenicidade própria, elas podem ser utilizadas como carreadores de DNA e RNA de interesse, peptídeos, proteínas pequenas e outras drogas (ZAHMANOVA et al., 2023).

A vacina contra nSARS-CoV-2 foi desenvolvida pela empresa canadense Medicago em, 2021, utilizando o sistema de *N. benthamiana*. Milhares de doses do medicamento foram produzidas em escala industrial, em apenas 20 dias de produção em casa de vegetação. Em fevereiro de 2022, a agência canadense Health Canada aprovou o uso comercial da vacina no país, com o nome fantasia COVIFENZ™ (ZAHMANOVA et al., 2023).

1.9 Desafios de produção de biofármacos em sistemas vegetais

Apesar de promissoras, as tecnologias de produção de biofármacos em sistema vegetal conseguiram produzir um pequeno conjunto de nove grupos de moléculas que chegaram ao mercado. A expectativa inicial era de que num período aproximado de vinte anos, um número significativamente maior de tecnologias derivadas de plantas transgênicas da Terceira Geração chegasse ao mercado (ZAHMANOVA et al., 2023).Dessa forma, a Resolução Normativa número 16 veio com a premissa de melhorar o cenário dos biofármacos, pois traz técnicas inovadoras do aprimoramento de precisão, como a mutagênese sítio dirigida e a agroinfiltração que permitiram modificações genéticas sem a necessidade de introduzir DNA recombinante no organismo. Assim, estes organismos não são considerados (OGM) o que reduz as exigências regulatórias de produtos que são resultantes dessas tecnicas.

Os gargalos e barreiras que minimizaram a oferta de drogas recombinantes de origem vegetal se dividem em três grandes grupos de causas: a) fatores técnicos, b) fatores regulatórios e c) fatores econômicos. Nos últimos anos, diversas estratégias foram desenvolvidas para contornar ou minimizar os diferentes entraves para a produção industrial de fármacos vegetais recombinantes, com resultados cada vez mais promissores (FISCHER; BUYEL, 2020). O Quadro geral de restrições e soluções pode ser observado na Quadro 3.

Quadro 3: Limitações para a produção de moléculas recombinantes em sistemas vegetais e possíveis soluções aplicadas

Limitações	Soluções
Fatores técnicos	
- Baixos níveis gerais de expressão gênica nas plantas transformadas	- Expressão transiente em tabaco com vetores virais potentes - Edição de genoma - Escalonamento de produção - Uso de plantas transplastômicas
- Baixa estabilidade estrutural das moléculas recombinantes em sistemas vegetais	- Endereçamento subcelular de proteínas - Retenção de proteínas na via secretória - Expressão gênica nas sementes
- Dificuldades de purificação	- Uso de caudas de purificação removíveis enzimaticamente - Uso de sistema de suspensão celular com secreção para o meio de cultura
- Dificuldades de transformação genética	- Desenvolvimento de protocolos alternativos de transformação genética
- Modificações pós-traducionais incorretas	- Utilização de plantas previamente engenheiradas para realizar modificações pós-traducionais corretas
- Glicosilações O e N incorretas	- Utilização de plantas previamente engenheiradas para realizar glicosilações humanizadas
- Alergenicidade e imunogenicidade	- Utilização de plantas previamente engenheiradas para realizar glicosilações humanizadas
- Desempenho insuficiente	- Design racional *in sílico* com modificações estruturais pontuais
- Fluxo gênico	- Cultivo protegido
Fatores regulatórios	
- Incertezas no cenário regulatório para sistemas vegetais de expressão gênica	- Criação de diretrizes e marcos e regulatórios claros
Fatores econômicos	
- Altos custos médios de produção	- Aumento da biossíntese - Aumento do escalonamento de produção - Uso de expressão transiente - Otimização do processamento pós-traducional - Planejamento de produção com análises técnico-econômicas (“*techno-economic analyses* – TEAs”)

Adaptado de EIDENBERGER; KOGELMANN; STEINKELLNER, (2023).

As dificuldades do setor podem ser observadas inclusive nos países pioneiros no desenvolvimento desse tipo de tecnologia (EUA, Reino Unido, Alemanha e Canadá) e

daqueles detentores de regulação mais antiga e flexível, como EUA, Canadá e Austrália (FISCHER; BUYEL, 2020). As flutuações econômicas e as incertezas e riscos inerentes aos mercados de produtos biotecnológicos têm levado à instabilidade na abertura e consolidação de empresas do setor, conforme mostra a figura 7.

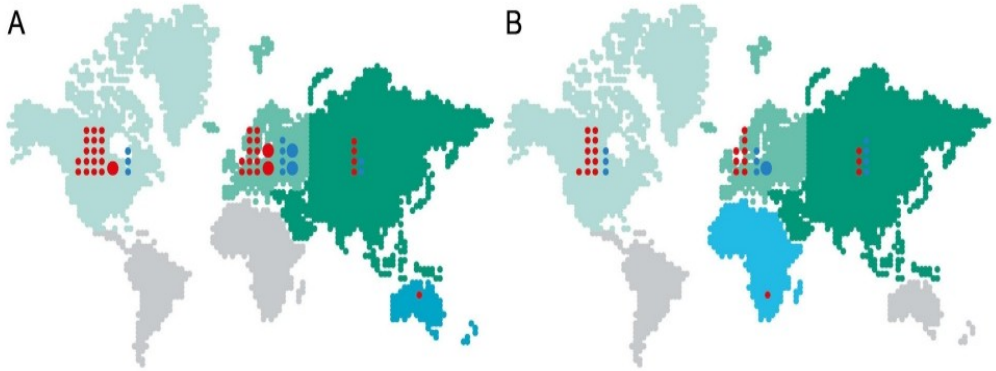


Figura 7: Cenário global das empresas vinculadas ao *Plant Molecular Farming*. A) número e localização das principais empresas em 2005. B) Cenário em 2020. Círculos maiores e menores indicam, respectivamente empresas de grande e de pequeno porte. Círculos vermelhos mostram empresas produtoras estritamente de biofármacos, já círculos azuis, empresas produtoras de reagentes de laboratório e moléculas industriais. Adaptado de FISCHER; BUYEL, (2020).

As principais empresas que se arriscaram na produção de moléculas recombinantes no período estão mostradas na tabela 4.

Quadro 4: Principais companhias desenvolvedoras de fármacos vegetais a partir de 2005 e os seus status até 2020.

Empresa	**País**	**Produtos**	**Plataformas vegetais**	**2005**	**2020**
Synthon	Holanda	Biofármacos	Lentilha-d'água (estável)	Não	Não
Bayer	EUA	Avicidin (anticorpo)	Milho (estável)	Não	Não
Syngenta International	China	Biofármacos e amilase para produção de etanol	Cártamo (estável)	Sim	Não
Syngenta International	China	Biofármacos e amilase para produção de etanol	Milho (estável)	Não	Sim
BASF Plant Science	Alemanha	Cosméticos	Milho e arroz (estável)	Sim	Não
Dow	EUA	Vacinas para	Suspensão de	Sim	Não

AgroSciences		animais	células de tabaco (estável)		
Henkel	Alemanha	Cosméticos	Milho e arroz (estável)	Sim	Não
Hokusan	Japão	α-interferon canino	Morango (estável)	não	não
Bayer CropScience	Alemanha	Anticorpos	Tabaco (transiente)	sim	não

Adaptado de FISCHER; BUYEL, (2020).

2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As plantas transgênicas de Terceira Geração representam um dos mais importantes segmentos da Biotecnologia Vegetal. Há uma grande diversidade de sistemas vegetais de expressão disponíveis para a biossíntese de moléculas recombinantes. Apesar da sofisticação tecnológica associada ao *Plant Molecular Farming*, poucos produtos chegaram ao mercado. O aperfeiçoamento das plataformas de produção, das estratégias de expressão gênica e do estabelecimento de um arcabouço regulatório racional potencializaram sobremaneira o desenvolvimento de produtos do setor.

Os biofármacos vegetais apresentam grande importância médico-terapêutica, compreendendo moléculas de alto valor agregado, como vacinas, anticorpos e enzimas. Apesar da complexidade estrutural inerente a estas moléculas, plantas transgênicas, suspenção de células vegetais e sistemas de expressão transiente apresentam propriedades técnicas capazes de minimizar a maioria das restrições à produção em escala de drogas.

Com a combinação do sequenciamento completo de diversos genomas de espécies relevantes de plantas da agricultura e das tecnologias de edição de genoma mais recentes, como o sistema CRISPR/Cas9 e a recém-descoberta “Ponte de edição baseada em RNA”, projeta-se um futuro promissor para as empresas que investem em *Plant Molecular Farming*. A tendência é que esse o novo cenário seja acompanhado da minimização dos principais gargalos técnicos, e econômicos e que novas tecnologias seja desenvolvida de maneira eficiente e segura.

Além disso, a publicação da Resolução Normativa número 16 (RN16) pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), em 2018, representa um marco no ganho de dinamismo na avaliação técnica de produtos engenheirados geneticamente (de quaisquer origens biológicas) que, modificados por algumas das abordagens de uso das tecnologias de edição de genomas, são considerados não-OGMs e apresentam um trâmite regulatório mais simples, barato e curto.

Os efeitos dessa mudança regulatória já começaram a ser detectados na liberação comercial das diversas tecnologias inovadoras de melhoramento de precisão (TIMPs) produzidas para a agropecuária, via edição de genoma, a partir de 2019, como o milho ceroso da Monsanto e a cana-de-açúcar FLEX1 e 2 (com maior teor de sacarose e digestibilidade) da Embrapa. Espera-se que o mesmo efeito seja experimentado na dinâmica de avaliação e liberação comercial de TIMPS farmacêuticas de origem vegetal no Brasil.

3 REFERÊNCIAS

BOOTHE, J. et al. Seed-based expression systems for plant molecular farming. **Plant biotechnology journal**, v. 8, n. 5, p. 588–606, jun. 2010.

BROOKES, G.; BARFOOT, P. GM crop technology use 1996-2018: farm income and production impacts. **GM crops & food**, v. 11, n. 4, p. 242–261, out. 2020.

CANTORAL, R. et al. [Comparative study of the composition and nutritional value of the seeds and protein concentrations in legumes]. **Archivos latinoamericanos de nutricion**, v. 45, n. 3, p. 242–248, set. 1995.

CONG, L. et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 819 LP – 823, 15 fev. 2013.

CROPLIFE BRASIL. 25 anos de transgênicos no campo: benefícios ambientais, econômicos e sociais no Brasil. 2023. Disponível em: https://croplifebrasil.org/publicacoes/25-anos-de-transgenicos-no-campo/. Acesso em: 06 set. 2024.

CULLUFI, P. et al. Taliglucerase alfa in the longterm treatment of children and adolescents with type 1 Gaucher disease: the Albanian experience. **Frontiers in pediatrics**, v. 12, p. 1352179, 2024.

CUNHA, N. et al. Expression and Characterisation of Recombinant Molecules in Transgenic Soybean. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 31, p. 5553–5563, 2013.

CUNHA, N. B. et al. Plant genetic engineering : basic concepts and strategies for boosting the accumulation of recombinant proteins in crops. **International Journal of Latest Transactions in Engineering And Science (IJLTES) Plant**, v. 8, n. 1, p. 7–13, 2019.

CUNHA, N. B. et al. Basic aspects for choosing crops for recombinant production of therapeutic and industrial molecules. **The International Journal of Engineering and Science (IJES)**, v. 7, n. 8, p. 51–56, 2020.

DA CUNHA, N. B. et al. Molecular farming of human cytokines and blood products from plants: Challenges in biosynthesis and detection of plant-produced recombinant proteins.

Biotechnology Journal, v. 9, n. 1, p. 39–50, 2014.

DEVILLARS, A. et al. Not Only Editing: A Cas-Cade of CRISPR/Cas-Based Tools for Functional Genomics in Plants and Animals. **International journal of molecular sciences**, v. 25, n. 6, mar. 2024.

EIDENBERGER, L.; KOGELMANN, B.; STEINKELLNER, H. Plant-based biopharmaceutical engineering. **Nature reviews bioengineering**, v. 1, n. 6, p. 426–439, 2023.

FENG, J. et al. Detection of genetically modified tomato using PCR coupled with muParaflo microfluidics microarrays. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 13, n. 12, p. 8266–8274, dez. 2013.

FISCHER, R.; BUYEL, J. F. Molecular farming - The slope of enlightenment. **Biotechnology advances**, v. 40, p. 107519, 2020.

GILS, M. et al. A novel hybrid seed system for plants. **Plant biotechnology journal**, v. 6, n. 3, p. 226–235, abr. 2008.

GLEBA, Y. Y.; TUSÉ, D.; GIRITCH, A. Plant viral vectors for delivery by Agrobacterium. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 375, p. 155–192, 2014.

GOMES, J. E. M, EXPRESSÃO TRANSIENTE DO FATOR IX DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA HUMANA EM FOLHAS DE *Nicotiana benthamiana.* Dissertação de mestrado. Universidade Católica de Brasilia, UCB. 70p.

ISAAA. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2019: Biotech Crops Drive SocioEconomic Development and Sustainable Environment in the New Frontier. Ithaca, NY: ISAAA, 2019. (ISAAA Brief No. 55). Disponível em: https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/55/executivesummary/default.asp. Acesso em: 02 set. 2024.

ISAAA, 2023. ERS Releases Latest Trends in GM Crop Adoption in the US- Crop Biotech Update (October 11, 2023) | Crop Biotech Update - ISAAA.org

JAMES, C. A global overview of biotech (GM) crops: adoption, impact and future prospects. **GM crops**, v. 1, n. 1, p. 8–12, 2010.

KUSNADI, A. R.; NIKOLOV, Z. L.; HOWARD, J. A. Production of recombinant proteins in transgenic plants: Practical considerations. **Biotechnology and bioengineering**, v. 56, n. 5, p. 473–484, dez. 1997.

LI, B. et al. Targeted genome-modification tools and their advanced applications in crop breeding. **Nature reviews. Genetics**, abr. 2024.

MA, J. K.-C.; DRAKE, P. M. W.; CHRISTOU, P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. **Nature reviews. Genetics**, v. 4, n. 10, p. 794–805, out.

2003a.

MA, J. K. C.; DRAKE, P. M. W.; CHRISTOU, P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 10, p. 794–805, 2003b.

MORAVEC, T. et al. Production of Escherichia coli heat labile toxin (LT) B subunit in soybean seed and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine. **Vaccine**, v. 25, n. 9, p. 1647–1657, 2007.

O'KEEFE, B. R. et al. Engineering soya bean seeds as a scalable platform to produce cyanovirin-N, a non-ARV microbicide against HIV. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, n. 7, p. 884–892, 2015.

OBEMBE, O. O. et al. Advances in plant molecular farming. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 2, p. 210–222, 2011.

RECH, E. et al. Recombinant proteins in plants. **BMC Proceedings**, v. 8, n. S4, p. O1, 2014.

SAMPAIO DE OLIVEIRA, Kamila Botelho e colab. Strategies for recombinant production of antimicrobial peptides with pharmacological potential. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 13, n. 4, p. 367–390, 2 Abr 2020.

SCHAEFER, A. et al. ZMapp reduces diffusion of Ebola viral particles in fresh human cervicovaginal mucus. **Emerging microbes & infections**, v. 13, n. 1, p. 2352520, dez. 2024.

SINGH, R. et al. Oral booster vaccine antigen-Expression of full-length native SARS-CoV-2 spike protein in lettuce chloroplasts. **Plant biotechnology journal**, v. 21, n. 5, p. 887–889, maio 2023.

SINHA, G. **AGBIOTECH. GM technology develops in the developing world.Science (New York, N.Y.)**United States, jan. 2007.

SHANMUGARAJ, B. et al. Biotechnological insights on the expression and production of antimicrobial peptides in plants. **Molecules**, v. 26, n. 13, p. 1–23, 2021.

STOGER, E. et al. Sowing the seeds of success: Pharmaceutical proteins from plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 167–173, 2005.

STREATFIELD, S. J. Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. **Plant Biotechnology Journal**, v. 5, n. 1, p. 2–15, 2007.

TAMURA, R.; TODA, M. Historic Overview of Genetic Engineering Technologies for Human Gene Therapy. **Neurologia medico-chirurgica**, v. 60, n. 10, p. 483–491, out. 2020.

TORTI, S. et al. Transient reprogramming of crop plants for agronomic performance. **Nature plants**, v. 7, n. 2, p. 159–171, fev. 2021.

TWYMAN, R. M. et al. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. **Trends in biotechnology**, v. 21, n. 12, p. 570–578, dez. 2003.

VULCHI, R.; BAGAVATHIANNAN, M.; NOLTE, S. A. History of Herbicide-Resistant Traits in Cotton in the U.S. and the Importance of Integrated Weed Management for Technology Stewardship. **Plants (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 9, abr. 2022.

WERNER, S. et al. High-level recombinant protein expression in transgenic plants by using a double-inducible viral vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 34, p. 14061–14066, ago. 2011.

WOLFF, J. A.; LEDERBERG, J. An early history of gene transfer and therapy. **Human gene therapy**, v. 5, n. 4, p. 469–480, abr. 1994.

ZAHMANOVA, G. et al. Green Biologics: Harnessing the Power of Plants to Produce Pharmaceuticals. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 24, dez. 2023.