



Diocléa Almeida Seabra Silva
(Organizadora)

Agronomia: Elo da Cadeia Produtiva 6



Diocléa Almeida Seabra Silva
(Organizadora)

Agronomia: Elo da Cadeia Produtiva 6

Atena
Editora

Ano 2019

2019 by Atena Editora
Copyright © Atena Editora
Copyright do Texto © 2019 Os Autores
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora
Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira
Diagramação: Natália Sandrini
Edição de Arte: Lorena Prestes
Revisão: Os Autores



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons. Atribuição 4.0 Internacional (CC BY 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá
Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima
Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Universidade Federal do Maranhão
Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobom – Universidade Estadual do Centro-Oeste
Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia
Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Prof. Dr. Alexandre Leite dos Santos Silva – Universidade Federal do Piauí
Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)	
A281	<p>Agronomia [recurso eletrônico] : elo da cadeia produtiva 6 / Organizadora Diocléa Almeida Seabra Silva. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019. – (Agronomia: Elo da Cadeia Produtiva; v. 6)</p> <p>Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-825-0 DOI 10.22533/at.ed.250190312</p> <p>1. Agricultura – Economia – Brasil. 2. Agronomia – Pesquisa – Brasil. I. Silva, Diocléa Almeida Seabra. II. Série.</p> <p style="text-align: right;">CDD 630.981</p>
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

A cadeia produtiva é um termo amplo que define com clareza onde cada segmento tem seu grau de importância seja na produtividade de frutos, venda de semente de capineira, na pesca, na aquicultura, na formação de resíduos para a indústria, no controle determinado de vírus, bactérias, nematóides para a agricultura e até mesmo na comercialização de espécies florestais com potencial madeireiro. Na verdade, o termo cadeia produtiva é um conjunto de ações ou processos que fazem presente em estudos científicos que irá dar imagem para o avanço de um produto final.

A imagem de um produto final se torna possível quando trabalhamos todos os elos da cadeia, como por exemplo: para um produtor chegar a comercializar o feijão, ele precisará antes preparar seu solo, ter maquinários pra isso, além de correr o solo com corretivo, definindo a saturação de base ideal, plantar a semente de boa qualidade, adubar, acompanhar a produção fazendo os tratamentos culturais adequados, controlando pragas, doenças e ervas daninhas, além de encontrar mercados para que o mesmo possa vender sua produção. Esses elos são essenciais em todas as áreas, ao passo que na produção de madeira será necessário técnicas sofisticadas de manejo que começa na germinação de sementes, quebra de dormência para a formação de mudas, e além disso padronizar espaçamento, tratamentos silviculturais para a formação de madeira em tora para exportação.

Na pesca a cadeia produtiva segue a vertente do ganho de peso e da qualidade da carne do pescado, que está vinculada a temperatura, pH da água, oxigenação, alimentação e o ambiente para que haja produção. Também a cadeia se verticaliza na agregação de preço ao subproduto do pescado como o filetagem para as indústrias, mercado de peixe vivo e etc.

Na cadeia cujo foco são os resíduos da indústria açucareira, há mercados para a queima de combustível no maquinário da indústria, através da qualidade deste resíduo, além de mercados promissores para a fabricação de combustíveis, rações e até mesmo resíduo vegetal para incorporação nos solos, com a finalidade de manter ou melhorar as características químicas, físicas e biológicas, além de controlar erosão e elevar os níveis de produtividade nas áreas agrícolas, através da adição de nutrientes.

Contudo, sabemos que todos os elos que compõem a cadeia produtiva são responsáveis por agregar valor e gerar de maneira direta e indireta renda aos produtores e pescadores, possibilitando-os na melhoria da qualidade de vida, além da obtenção de produtos de alta qualidade. No entanto, aqui se faz presente a importância das pesquisas mostradas neste E-Book, v. 6 – Agronomia: Elo da Cadeia Produtiva para que o leitor possa perceber novidades que são contextualizadas, através dos trabalhos aqui publicados.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
CONTROLE DE <i>Meloidogyne javanica</i> EM JILOEIRO (<i>Solanum gilo</i>) COM RESÍDUO DO FRUTO DE PEQUI (<i>Caryocar brasiliense</i>)	
Rodrigo Vieira da Silva João Pedro Elias Gondim Fabrício Rodrigues Peixoto Luam Santos Emmerson Rodrigues de Moraes José Humberto Ávila Júnior Luiz Leonardo Ferreira Silvio Luis de Carvalho	
DOI 10.22533/at.ed.2501903121	
CAPÍTULO 2	12
FUNGOS COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FITONEMATOIDES	
Valéria Ortaça Portela Juliane Schmitt Leticia Moro	
DOI 10.22533/at.ed.2501903122	
CAPÍTULO 3	22
NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS (NEPs)	
Raiana Rocha Pereira Josiane Pacheco de Alfaia Artur Vinícius Ferreira dos Santos Débora Oliveira Gomes Raphael Coelho Pinho Lyssa Martins de Souza Shirlene Cristina Brito da Silva Telma Fátima Vieira Batista	
DOI 10.22533/at.ed.2501903123	
CAPÍTULO 4	33
ICTIOFAUNA DA PRAIA DE BERLINQUE, ILHA DE ITAPARICA, MUNICÍPIO DE VERA CRUZ - BA	
Edilmar Ribeiro Sousa Hortência Ramos Gomes Santos Fabrício Menezes Ramos	
DOI 10.22533/at.ed.2501903124	
CAPÍTULO 5	44
PESCADORES E SUAS PERCEPÇÕES SOBRE A PESCA EM PEQUENA ESCALA: ESTUDO DE CASO NA VILA DOS PESCADORES, COMUNIDADE COSTEIRA NA AMAZÔNIA (BRAGANÇA-PARÁ)	
Maria Eduarda Garcia de Sousa Pereira Thaila Cristina Neves do Rosário Hanna Tereza Garcia de Sousa Moura Elizete Neres Monteiro Francisco José da Silva Santos	
DOI 10.22533/at.ed.2501903125	

CAPÍTULO 6	57
INFLUÊNCIA DE CULTIVAR E DO PERÍODO DE COLHEITA NA PRODUTIVIDADE E NO PADRÃO DE FRUTOS DE MAMOEIROS, INTRODUZIDOS DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, EM CONDIÇÕES EDAFOCLIMÁTICAS DO AMAZONAS	
Lucio Pereira Santos Enilson de Barros Silva Scheilla Marina Bragança	
DOI 10.22533/at.ed.2501903126	
CAPÍTULO 7	71
MÉTODOS QUÍMICOS NA SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA DE <i>Brachiaria brizantha</i> (Hochst ex A. Rich.) Stapf	
Tiago de Oliveira Sousa Mahany Graça Martins Marcela Carlota Nery Marcela Azevedo Magalhães Thaís Silva Sales Letícia Lopes de Oliveira Letícia Aparecida Luiz de Azevedo Bruno de Oliveira Fernandes	
DOI 10.22533/at.ed.2501903127	
CAPÍTULO 8	79
MICROBIOMA BACTERIANO: EXTRAÇÃO E PREPARAÇÃO DE BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS	
Juliano Oliveira Santana Karina Peres Gramacho Katiúcia Tícila de Souza de Nascimento Rachel Passos Rezende Carlos Priminho Pirovani	
DOI 10.22533/at.ed.2501903128	
CAPÍTULO 9	106
MODELO PARA A MELHORIA DO PROCESSO DE REGULARIZAÇÃO DA AQUICULTURA PRATICADA EM RESERVATÓRIOS DA UNIÃO BRASILEIRA	
Sara Monaliza Sousa Nogueira Marco Aurélio dos Santos Sandro Alberto Vianna Lordelo José Rodrigues de Farias Filho	
DOI 10.22533/at.ed.2501903129	
CAPÍTULO 10	123
NOVA VARIEDADE SEMINAL DE <i>STEVIA REBAUDIANA</i> : OBTENÇÃO DE FRAÇÕES COM ALTO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE FOLHAS	
Paula Gimenez Milani Maysa Formigoni Antonio Sergio Dacome Livia Benossi Maria Rosa Trentin Zorzenon Simone Rocha Ciotta Cecília Edna Mareze da Costa Silvio Claudio da Costa	
DOI 10.22533/at.ed.25019031210	

CAPÍTULO 11 136

OS CENTROS DE TRATAMENTO DE RESÍDUOS E O PRISIONAL: REFLEXIBILIDADE AMBIENTAL E NA SAÚDE

Paulo Barrozo Cassol
Edenilson Perufo frigo
Alberto Manuel Quintana

DOI 10.22533/at.ed.25019031211

CAPÍTULO 12 148

PARÂMETROS DE RESISTÊNCIA PARA CARACTERIZAÇÃO DA FERRUGEM-ASIÁTICA DA SOJA TRATADA COM COMBINAÇÕES QUÍMICAS DE FUNGICIDAS SISTÊMICOS E DE CONTATO

Milton Luiz da Paz Lima
Gleina Costa Silva Alves
Matheus do Carmo Leite
Andressa de Souza Almeida
Rafaela Souza Alves Fonseca
Cleberly Evangelista dos Santos
Marciel José Peixoto
Flavia de Oliveira Biazotto
Lettícia Alvarenga
Justino José Dias Neto
Wesler Luiz Marcelino

DOI 10.22533/at.ed.25019031212

CAPÍTULO 13 166

PRODUÇÃO DA SOJA EM FUNÇÃO DE DIFERENTES ÉPOCAS DE APLICAÇÃO DE BIOESTIMULANTE

Cristiano de Freyn
Alexandre Luis Müller
Dyogo Bortot Brustolin
André Prechtlak Barbosa
Martios Ecco
Vitor Hugo Rosseto Belotto
Luiz Henrique da Costa Figueiredo
Vinícius Fernando Carrasco Gomes
Matheus Henrique de Lima Raposo
Anderson José Pick Benke
Arlon Felipe Pereira
Alan Benincá

DOI 10.22533/at.ed.25019031213

CAPÍTULO 14 174

BIOGAS PRODUCTION FROM SECOND GENERATION ETHANOL VINASSE

Manuella Souza Silverio
Rubens Perez Calegari
Gabriela Maria Ferreira Lima Leite
Bianca Chaves Martins
Eric Alberto da Silva
José Piotrovski Neto
Mario Wilson Cusatis
André Gomig
Antonio Sampaio Baptista

DOI 10.22533/at.ed.25019031214

CAPÍTULO 15 185

PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM SISTEMAS VEGETAIS: VÍRUS DE PLANTAS COMO REATORES DE FÁRMACOS

Nicolau Brito da Cunha
Michel Lopes Leite
Kamila Botelho Sampaio
Simoni Campos Dias

DOI 10.22533/at.ed.25019031215

CAPÍTULO 16 219

PROGNOSE DO VOLUME DE MADEIRA EM FLORESTAS EQUIÂNEAS POR MEIO DE MODELOS AGROMETEOROLÓGICOS DE REDES NEURAIS ARTIFICIAIS

Mariana Rodrigues Magalhães Romeiro
Aristides Ribeiro
Leonardo Bonato Felix
Aylen Ramos Freitas
Mayra Luiza Marques da Silva
Aline Edwiges Mazon de Alcântara

DOI 10.22533/at.ed.25019031216

CAPÍTULO 17 232

QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE FEIJÃO AMENDOIM, TRATADAS COM FERTILIZANTE ORGANOMINERAL E SUBMETIDAS AO ESTRESSE SALINO

Thiago Figueiredo Paulucio
Paula Aparecida Muniz de Lima
Rodrigo Sobreira Alexandre
José Carlos Lopes

DOI 10.22533/at.ed.25019031217

CAPÍTULO 18 245

QUALIDADE MORFOLÓGICA E FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE FEIJÃO

Manoel Victor Borges Pedrosa
Arêssa de Oliveira Correia
Patrícia Alvarez Cabanez
Allan de Rocha Freitas
Rodrigo Sobreira Alexandre
José Carlos Lopes

DOI 10.22533/at.ed.25019031218

CAPÍTULO 19 256

RELAÇÕES ENTRE A UMIDADE E ALGUMAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE *PINUS* SP., ANGELIM-PEDRA (*HYMENOLOBIMUM PETRAEUM*) E CAIXETA (*TABEBUIA CASSINOIDES*)

Vitor Augusto Cordeiro Milagres
Jessyka Cristina Reis Vieira
Luiz Carlos Couto
Magno Alves Mota

DOI 10.22533/at.ed.25019031219

CAPÍTULO 20 262

TEOR DE NITROGÊNIO ORGÂNICO NAS FOLHAS E DE PROTEÍNA BRUTA NOS GRÃOS DE SOJA FERTILIZADA COM NITROGÊNIO E MOLIBDÊNIO

Lucio Pereira Santos
Clibas Vieira

DOI 10.22533/at.ed.25019031220

CAPÍTULO 21	280
TEORES DE MANGANÊS EM <i>Pereskia Grandfolia</i> Haw.	
Nelma Ferreira de Paula Vicente	
Erica Alves Marques	
Michelle Carlota Gonçalves	
Abraão José Silva Viana	
Adjaci Uchôa Fernandes	
Roberta Hilsdorf Piccoli	
DOI 10.22533/at.ed.25019031221	
CAPÍTULO 22	285
THE HEIGHT OF CROP RESIDUES INFLUENCES INTAKE RATE OF SHEEP IN INTEGRATED CROP-LIVESTOCK SYSTEMS	
Delma Fabíola Ferreira da Silva	
Carolina Bremm	
Vanessa Sehaber	
Natália Marcondes dos Santos Gonzales	
Breno Menezes de Campos	
Anibal de Moraes	
Anderson M. S. Bolzan	
Alda Lucia Gomes Monteiro	
Paulo César de Faccio Carvalho	
DOI 10.22533/at.ed.25019031222	
CAPÍTULO 23	298
USO DE RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DE AÇÚCAR E ÁLCOOL: BENEFÍCIOS E PERDAS	
Camila Almeida dos Santos	
Leonardo Fernandes Sarkis	
Eduardo Carvalho da Silva Neto	
Luis Otávio Nunes da Silva	
Leonardo Duarte Batista da Silva	
DOI 10.22533/at.ed.25019031223	
SOBRE A ORGANIZADORA	310
ÍNDICE REMISSIVO	311

PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM SISTEMAS VEGETAIS: VÍRUS DE PLANTAS COMO REATORES DE FÁRMACOS

Nicolau Brito da Cunha

Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Universidade Católica de Brasília UCB
Brasília, DF
nicolau.cunha@ucb.br; nicolaubrito@yahoo.com.br

Michel Lopes Leite

Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Universidade Católica de Brasília UCB
Brasília, DF

Kamila Botelho Sampaio

Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Universidade Católica de Brasília UCB
Brasília, DF

Simoni Campos Dias

Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Universidade Católica de Brasília UCB
Brasília, DF

contexto, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) adquiriram grande importância científica nos últimos anos devido à sua capacidade de possuir atividades antimicrobiana e imunomoduladora. Nas duas últimas décadas, as plantas atraíram o interesse da comunidade científica e da indústria quanto ao seu potencial como biofábricas de proteínas heterólogas. Uma das abordagens mais promissoras é o uso de vetores virais para maximizar a expressão transiente de drogas nas folhas da planta *Nicotiana benthamiana*. Recentemente, o sistema de expressão Magniffection™ foi lançado. Essa sofisticada plataforma comercial permite a montagem da partícula viral em células foliares e a disseminação sistêmica da biossíntese de proteínas heterólogas em tecidos verdes causada pelo “método de entrega gênica” de *Agrobacterium tumefaciens*, além de níveis aumentados de expressão gênica mediada por potentes máquinas de expressão viral. Estas características permitem a recuperação em massa de proteínas heterólogas nas folhas de *N. benthamiana* em 8 a 10 dias, sendo altamente eficiente para a síntese de diferentes classes de proteínas farmacológicas e com enorme potencial para a rápida e abundante biossíntese de PAMs.

PALAVRAS-CHAVE: Peptídeos antimicrobianos, Magniffection, *Nicotiana benthamiana*, expressão transiente de genes

RESUMO: A demanda constante por novos antibióticos tem impulsionado esforços da comunidade científica para prospectar peptídeos com amplo espectro de ação. Nesse

ABSTRACT: The constant demand for new antibiotics has driven the scientific community's efforts to prospect for broad spectrum peptides. In this context, antimicrobial peptides (AMPs) have acquired great scientific importance in recent years due to their ability to possess antimicrobial and immunomodulatory activities. Over the past two decades, plants have attracted interest from the scientific community and industry as to their potential as heterologous protein biofactories. One of the most promising approaches is the use of viral vectors to maximize drug transient expression in the leaves of the *Nicotiana benthamiana* plant. Recently, the Magniffection™ expression system was launched. This sophisticated commercial platform allows the assembly of the viral particle in leaf cells and the systemic dissemination of heterologous protein biosynthesis in green tissues caused by *Agrobacterium tumefaciens* "gene delivery method", in addition to increased levels of gene expression mediated by powerful expression machines. viral. These characteristics allow the mass recovery of heterologous proteins in *N. benthamiana* leaves in 8 to 10 days, being highly efficient for the synthesis of different classes of pharmacological proteins and with enormous potential for rapid and abundant AMP biosynthesis.

KEYWORDS: Antimicrobial Peptides, Magniffection, *Nicotiana benthamiana*, transient expression of genes

1 | INTRODUÇÃO

Historicamente, microrganismos patogênicos representam o maior risco para a saúde de indivíduos cujo sistema imunológico está comprometido por doenças mais brandas ou por terapias invasivas (Watkins e Bonomo, 2016). A necessidade de atenuar ou mesmo impedir a proliferação desses microrganismos no ambiente hospitalar tem sido uma preocupação constante dos principais grupos de pesquisa científica em todo o mundo (Uhlir et al. 2014). Muitos dos patógenos comumente encontrados em hospitais são resistentes a drogas antimicrobianas comumente usadas no tratamento de condições comuns ou de alto risco. O uso indiscriminado de antibióticos e antifúngicos sem prescrição médica levou, desde meados da década de 1960, a um aumento consistente no isolamento de cepas resistentes em hospitais, especialmente na América Latina (Andersson et al. 2016).

A alta taxa com a qual os patógenos resistentes são selecionados durante todo o tratamento dos pacientes ainda é o principal problema em relação ao uso de antimicrobianos convencionais. Neste cenário, muitas das drogas de controle de patógenos mais comuns, baratas e outrora eficazes tornam-se ineficazes na infecção sistêmica (Perry et al., 2016). Devido ao crescimento exponencial de casos de microrganismos resistentes a antibióticos, o desenvolvimento de novas alternativas de controle e moléculas com amplo espectro de ação e baixa toxicidade adquiriu um caráter estratégico para a indústria farmacêutica (Kosikowska e Lesner 2016, Nagel et al. 2016, Andersson et al., 2016).

Neste contexto, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) apresentam-se como uma

alternativa valiosa na complementação ou substituição de compostos terapêuticos tradicionais. Os PAMS são antibióticos naturais encontrados em microrganismos, plantas e animais, que funcionam como importantes componentes do sistema imune inato, a primeira linha de defesa desses organismos contra patógenos exógenos. Nos estágios iniciais da infecção, estímulos moleculares emitidos por sistemas de sinalização intrínsecos desencadeiam a biossíntese de PAMS para lidar com o agente invasor (Mojsoska e Jenssen 2015).

Do ponto de vista estrutural, os PAMs são caracterizados como pequenas moléculas protéicas com menos de 100 resíduos de aminoácidos, muitas vezes ricos em resíduos de cisteína, glicina ou histidina e que podem ser classificados de acordo com a presença de α -hélices, folhas β , extensões nas cadeias laterais de aminoácidos centrais ou pela formação de alças desordenadas (Cunha et al. 2016). Esses pequenos peptídeos também podem ser agrupados de acordo com suas propriedades físico-químicas em aniônicos, catiônicos (geralmente com cargas positivas entre 2 e 9) e PAMs anfipáticos, com suas porções hidrofóbicas e hidrofílicas lado a lado (Nguyen et al. 2011, Malanovic e Lohner 2016).

A primeira função dos PAMs é matar ou inibir o crescimento de microrganismos no nível molecular. Em geral, o modo de ação clássico dos PAMs catiônicos se deve à desorganização estrutural e formação de poros na membrana, com a consequente ruptura da bicamada lipídica que delimita células fúngicas e bactérias Gram positivas e negativas (Perry et al. 2016). Por essa razão, os PAMs podem atuar contra diferentes alvos celulares e, em alguns casos, ser considerados moléculas “promíscuas”, capazes de realizar mais de uma função, independentemente de sua estrutura. Artigos recentes mostraram que alguns PAMs podem desestabilizar a maquinaria translacional (ribossomos) e inibir a síntese de DNA e o ciclo celular de certos fungos e bactérias (Nguyen et al. 2011, Malanovic e Lohner 2016). Algumas dessas moléculas ainda podem atuar como antivirais (Malanovic e Lohner 2016), como inseticidas e como agentes hemolíticos e antitumorais (Nguyen et al. 2011, 2012).

As características bioquímicas e físico-químicas inerentes à estrutura dos PAMs são cruciais para os tipos de funções biológicas dessas moléculas. O comprimento e a distribuição de grupos carregados ao longo da cadeia peptídica, o grau de hidrofobicidade, a amidação N-terminal e o tipo e o número de estruturas secundárias determinam a eficiência do peptídeo bioativo e sua capacidade citotóxica para diferentes tipos de células e microrganismos (Nguyen et al 2011).

Entre os vários PAM já caracterizados, uma classe em particular tem um valor especial para a medicina: os peptídeos de defesa inatos (peptídeos de defesa do hospedeiro (*Host Defense Peptides*) (HDPs). Estes pequenos péptidos de 12 a 50 aminoácidos são geralmente não tóxicos para as células de mamíferos e podem ser isolados a partir de organismos como moluscos, plantas, anfíbios, aves, peixes e mamíferos (incluindo humanos). Os HDPs conjugam a ação antimicrobiana direta

com a modulação da imunidade inata do organismo hospedeiro através da indução do processo inflamatório. Assim, quando sintetizados em resposta à ação microbiana, as HDPs ativam a síntese de citocinas, a ocorrência de apoptose e quimiotaxia, o recrutamento e proliferação de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos T, bem como a diferenciação de células dendríticas (Silva et al. 2011).

As diversas funções que as HDPs podem apresentar simultaneamente e seu grau de seletividade refletem o enorme potencial de uso dessas moléculas para a proteção dos pacientes. Este fenômeno de “promiscuidade e dinamismo funcional” caracteriza-se como o princípio para a concepção de novos fármacos e para a preparação de estudos biotecnológicos com candidatos a PAM para atuar como novos antibióticos (Pelegrini et al. 2007).

2 | A EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PAMS: A LUTA CONTRA INFECÇÕES FÚNGICAS E BACTERIANAS.

O estudo e a avaliação farmacêutica de proteínas (entre eles os PAMs), em caráter pré-comercial, requerem a obtenção dessas moléculas em grandes quantidades. Para a avaliação de aspectos como os diferentes mecanismos de ação e a relação estrutura/função, são necessárias massas de peptídeos que variam de poucos microgramas a muitos miligramas. Neste contexto, a produção em grande escala de PAMs é o maior desafio na prospecção e caracterização de estudos desses peptídeos (Parachin et al. 2012).

O método de obtenção de PAMs considerado mais vantajoso em termos de custo e rendimento é aquele que explora sistemas recombinantes ou biofábricas para a síntese de proteínas heterólogas. Nas últimas décadas, vários sistemas de expressão heteróloga têm sido desenvolvidos com peculiaridades que permitem altos níveis de síntese, modificação e secreção de proteínas heterólogas (Parachin et al. 2012, Parachin e Franco 2014). Esta abordagem também permite a modificação estrutural de peptídeos para a realização de estudos detalhados sobre a função dessas moléculas.

Mais de 95% dos PAMs heterólogos são sintetizados em sistemas de expressão utilizando células bacterianas ou de levedura (Parachin et al. 2012). Nestes sistemas, a espécie bacteriana mais comumente utilizada é a *Escherichia coli*, um hospedeiro popular devido ao seu rápido crescimento, compatibilidade com uma ampla variedade de vetores de expressão, baixo custo e alto controle da expressão gênica devido ao amplo conhecimento acerca de seu genoma e de seus mecanismos genéticos básicos (Parachin e Franco 2014).

O isolamento e a prospecção de vários PAMs têm sido realizados de maneira destacada, nos últimos 15 anos, pelo grupo de pesquisadores do Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas da Universidade Católica de Brasília (CAPB UCB). Além

da caracterização estrutural e funcional de PAMs, o grupo do CAPB se especializou na expressão heteróloga de PAMs em sistemas microbianos e vegetais. Os pesquisadores do CAPB têm sido bem-sucedidos em isolar os peptídeos de suas fontes naturais ou por seu redesenho *in silico*, que permite a adição, remoção ou substituição de aminoácidos com o objetivo de aumentar a atividade antimicrobiana ou adicionar características como a capacidade imunomoduladora.

3 | PAMS TERAPÊUTICOS CONTRA PATÓGENOS RESISTENTES A MÚLTIPLAS DROGAS

O peptídeo antimicrobiano Cn-AMP1 foi isolado pela primeira vez a partir de água de coco (*Cocos nucifera*) em 2009, por Mandal e colaboradores (Mandal et al. 2009). Este pequeno peptídeo faz parte de uma família molecular com dois outros PAMs, denominados Cn-AMP 2 e Cn-AMP 3. Todos apresentam nove resíduos de aminoácidos com massas moleculares entre 0,8 e 1,3 kDa. Quando comparado com os outros dois PAMs, o Cn-AMP1 é o mais ativo *in vitro* contra as bactérias *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (MIC: 9 µM) e os fungos *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum*, um fungo dermatófito antropofílico muito comum em doenças de pele como pé de atleta e *Trichophyton mentagrophytes* (MIC: 18 µM) (Mandal et al. 2009, Santana et al. 2015). Outros ensaios de atividade biológica *in vitro* mostraram que o Cn-AMP1 exerce várias funções alternativas simultaneamente ao controle microbiano. O peptídeo foi capaz de reduzir a viabilidade de diferentes tipos de células tumorais, além de promover atividade imunomodulatória através da estimulação da secreção de citocinas por monócitos cultivados em laboratório, sem causar citotoxicidade aos eritrócitos humanos e macrófagos murinos (Silva et al. 2012).

Outro potente PAM é o Cm-p5, isolado do molusco *Centrichis muricatus*. Sua prospecção foi realizada após a fragmentação tríptica de uma fração cromatográfica contendo peptídeos isolados de *C. muricatus* analisados por MS/MS, o que gerou uma nova sequência candidata (López-Abarrategui et al. 2015). A partir de análises de bioinformática, uma série de peptídeos variantes foi teoricamente proposta com base na sequência, e estes foram previamente avaliados contra o fungo *C. albicans*. Destes, o Cm-p5 demonstrou notável atividade antifúngica contra cepas de *C. albicans* com alta importância médica. Para fins de ilustração, os resultados preliminares da atividade demonstraram MICs de 1 e 0,5 µg.mL⁻¹, suficientes para obter efeitos terapêuticos. Além disso, este peptídeo também se mostrou ativo contra *Cryptococcus neoformans* e *T. rubrum*. Os valores de inibição microbiana apresentados por ambos os PAMs superam a atividade de seu precursor Cm-p1, relatada em 2011. Estes resultados foram os primeiros a abrir caminho para testes de toxicidade em células animais e para o estudo de seu mecanismo de ação (López-

Abarrategui et al. 2015).

A Clavanina A, um PAM altamente eficiente no controle de bactérias como *P. aeruginosa*, foi recentemente caracterizada pelo nosso grupo e demonstrou uma atividade alta no controle de bactérias Gram positivas e negativas *in vitro* e *in vivo*, a partir de ensaios com camundongos (dados a serem publicados). Além disso, a Clavanina A também foi eficiente como agente estimulante molecular para reações de defesa dos organismos atacados por ambos os patógenos (Silva et al. 2015). Portanto, o potencial terapêutico da Clavanina A é promissor, tanto na ação antimicrobiana direta quanto na atividade imunomoduladora, sem agravar a resposta inflamatória.

Entre os PAMs isolados de plantas, os ciclotídeos são algumas das biomoléculas mais promissoras com potencial terapêutico contra diferentes classes de fitopatógenos. Estes peptídeos foram descritos pela primeira vez na década de 1970, isolados de diferentes tecidos como folhas, caules, flores, raízes e cascas de várias famílias de plantas, como Violaceae, Rubiaceae, Fabaceae, Asteraceae e Cucurbitaceae (Chen et al. 2005, Craik et al. 2006). Os ciclotídeos são ricos em cisteína e possuem entre 28 e 37 resíduos de aminoácidos. Eles também apresentam uma característica única: uma estrutura cíclica, na qual a região N-terminal está ligada à região C-terminal em uma cadeia circular, estabilizada pela presença de um padrão único e altamente conservado de três pontes dissulfeto (CisI -CisIV, CisII-CisV, CisIII-CisVI).

Esse arranjo forma um motivo conhecido como Nó de Cisteína Cíclica (Cyclic Cistein Knot -CCK), que compreende um anel peptídico formado por duas pontes dissulfeto paralelas (CisI-CisIV e CisII-CisV) e uma ponte dissulfeto transversal (CisIII-CisVI), que estabilizam o motivo. Desta forma, a partir da combinação da ciclização e do motivo CCK, a família de ciclotídeos agrupa PAMs vegetais cíclicos que compartilham uma estrutura tridimensional, a qual confere às moléculas alta estabilidade e proteção contra enzimas proteolíticas, bem como contra condições ácidas e de degradação física (Craik et al. 2006, Pelegrini et al. 2007, Pinto et al. 2016, Cunha et al. 2016).

Relatos na literatura indicam a presença de um grande número de ciclotídeos na família Rubiaceae e em uma planta particular dessa família, *Palicourea condensata* (Pinto et al. 2016). Os ciclotídeos de uma espécie do planalto central do Brasil, *Palicourea rigida*, foram extensivamente estudados por nosso grupo (Pinto et al. 2016). Curiosamente, esta planta foi até então pouco estudada apesar de seu uso difundido na medicina popular na região. A análise do conteúdo protéico de *P. rigida* evidenciou a presença de ciclotídeos na inflorescência, no pedúnculo e nas folhas, alguns dos quais apareceram apenas em tecidos específicos, enquanto outros apareceram em todas as partes exploradas. Um desses peptídeos foi sequenciado e analisado: a Parigidina-br1, que contém 32 resíduos de aminoácidos. A Parigidina-br1 foi classificado na subfamília “*Bracelets*”, devido à ausência de uma cis-prolina

na alça 5, e sua função foi avaliada *in vivo* contra neonatos de Lepidoptera (*Diatraea saccharalis*) e *in vitro* contra células SF-9 de insetos, apresentando funções inseticidas e inseticidas e atividade citotóxica. (Pinto et al. 2016). A escassez de estudos bioquímicos sobre *P. rigida*, somada ao seu amplo uso medicinal, intensifica o interesse pela sua avaliação como fonte da Parigidina-br1, uma molécula com potencial de uso claro para a proteção de plantas cultivadas.

4 | BIOSÍNTESE DE DROGAS RECOMBINANTES EM PLANTAS - “MOLECULAR FARMING”.

Desde o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante no início dos anos 70, a produção heteróloga de proteínas de interesse farmacológico e industrial tem sido baseada em sistemas de fermentação microbiana (procariótica e eucariótica) e cultura de células de mamíferos transgênicos. Embora esses sistemas apresentem, frequentemente, alta produtividade de proteínas heterólogas, eles apresentam algumas desvantagens em termos de autenticidade, causados por perdas frequentes de identidade de sequência de aminoácidos e ausência de modificações pós-traducionais (bactérias); hiperglicosilação (leveduras), necessidade de contenção em ambientes controlados para a minimização de questões de biossegurança (ambos) e custos de produção relativamente altos (mamíferos transgênicos). Vale ressaltar que atualmente já existem diversas estratégias para minimizar consideravelmente a maior parte dessas limitações, que serão discutidas mais adiante neste capítulo (Parachin et al., 2012, da Cunha et al., 2014).

Uma das alternativas mais promissoras para a substituição das plataformas recombinantes já estabelecidas é a utilização de sistemas vegetais como veículos para a produção de proteínas utilizadas como reagentes diagnósticos, vacinas e medicamentos, também chamados de fármacos vegetais (Plant-made Pharmaceuticals - PMPs) ou “drogas produzidas em Plantas”. “(Tregoning et al. 2005, Cunha et al. 2017). Esta aplicação representa uma vertente relativamente recente da biotecnologia chamada “Plant Molecular Farming”, cujo escopo é a síntese de polipeptídeos heterólogos de interesse farmacêutico usando a maquinaria molecular de plantas. (Ma et al. 2005).

As plantas podem ser sistemas atrativos para a biossíntese maciça de moléculas terapêuticas. Muitas espécies de plantas apresentam aspectos econômicos e qualitativos desejáveis associados à síntese de “PMPs”, como baixos custos de produção e capacidade de realizar modificações pós-traducionais exigidas por PAMs complexos. Os biorreatores vegetais são potencialmente um dos sistemas mais econômicos para a produção em grande escala desta classe de biomoléculas. O custo médio de produção de PMPs representa cerca de 10% do total apresentado por sistemas baseados em células de levedura, podendo ser até 50 vezes menor

que o de sistemas bacterianos. Quando o custo médio de produção de PMPs é comparado aqueles de plataformas sofisticadas e relativamente caras, como a cultura de células de mamíferos, essa diferença pode ser ainda maior. Estima-se que o custo de produzir um determinado medicamento recombinante expresso de forma equivalente em sementes de tabaco e suspensão de células de mamíferos pode ser até 1000 vezes menor no primeiro do que no último (Obembe et al. 2011).

As plantas representam um dos tipos de biomassa de menor custo de produção na natureza, necessitando apenas de solo, água e luz para a produção de grandes quantidades de biomassa, representadas principalmente por folhas e sementes. Em contraste, a cultura de células de microrganismos e mamíferos requer a adoção de fermentadores caros e sua manipulação sob condições estéreis, algo que encarece consideravelmente o processo de produção (Obembe et al. 2011, Davies 2010).

Desde 1986, quando a primeira droga recombinante relevante foi sintetizada em plantas de tabaco transgênico – o hormônio de crescimento humano (hGH) - mais de cem diferentes proteínas heterólogas, incluindo anticorpos, antígenos, hormônios, transportadores moleculares, peptídeos anticoagulantes e enzimas sintetizadas em diferentes plantas sistemas (Cunha et al. 2011a, b). As plataformas comumente usadas para produzir todas essas classes de moléculas são a suspensão das células do tabaco; sementes de cereais e de leguminosas, tais como milho e soja; oleaginosas, como a canola; tubérculos de batata; as diferentes espécies de culturas folhosas, como alface e espinafre, além de frutas como tomates e bananas (Egelkroust et al. 2012, Ma et al. 2003, Drake et al. 2017).

Além de fatores econômicos, as plantas apresentam aspectos bastante promissores quanto à qualidade das proteínas heterólogas e à biossegurança de seu uso como reatores de PMPs. Os principais aspectos técnicos da produção de proteínas terapêuticas nos diferentes sistemas disponíveis são comparados na Tabela 1.

Tipo	Sistema	Custo médio	Tempo de produção	Escalabilidade	Qualidade (dobramento, montagem da subunidade, glicosilação)	Modificações pós-traducionais em relação às humanas	Riscos de contaminação	Custo de armazenamento
Microorganismos	Bactérias	Baixo	Curto	Alta	Baixa	Nenhuma	Presença potencial de endotoxinas	Moderado
	Levedura	Moderado	Moderado	Alta	Moderada	Semelhantes	Baixo	Moderado
Cultura de células	Cultura de células de mamíferos	Alto	Longo	Muito baixa	Muito alta	Idênticas	Presença potencial de vírus, príões e oncogênicos	Alto
	Cultura de células vegetais	Moderado	Moderado	Moderada	Alta	Semelhantes	Baixo	Moderado

Organismos multicelulares transgênicos	Animais transgênicos	Alto	Muito longo	Baixa	Muito alta	Idênticas	Presença potencial de vírus, príons e oncogenes	Alto
	Plantas transgênicas	Muito baixo	Longos	Muito alta	Alta	Semelhantes	Baixo	Inexpressivo
Plataforma transiente	Plantas infectadas com vetores virais	Muito baixo	Curto	Muito alta	Alta	Semelhantes	Baixo	Inexpressivo

TABELA 1: comparação entre diferentes sistemas de produção de proteínas heterólogas de interesse farmacêutico.

Adaptado de Ma et al. 2003

Cerca de trinta PMPs, incluindo vacinas, anticorpos e proteínas terapêuticas, chegaram agora às etapas finais dos protocolos e testes internacionais de pré-clínicos. Oito produtos derivados de plantas recombinantes - sete reagentes de laboratório e um medicamento - já foram liberados comercialmente. Em 2012, a enzima recombinante glucocerebrosidase - ou taliglucerase alfa, secretada por suspensão de células de cenoura e utilizada para o tratamento da doença neurodegenerativa de Gaucher, tornou-se o primeiro produto sintetizado de biotecnologia vegetal com fins terapêuticos em humanos a ser lançado para comercialização nos Estados Unidos (Tregoning et al. 2005 Shaaltiel et al., 2015, Drake et al., 2017).

Basicamente, há duas maneiras de expressar genes para produzir PMPs: i) a transformação estável dos genomas nucleares ou plastidiais e ii) a expressão transiente de genes liberados por *Agrobacterium* ou vírus transgênicos infecciosos (Obembe et al. 2011).

A transformação estável do genoma da planta é a estratégia mais comumente utilizada para a produção de PMPs recombinantes e é aplicável a uma ampla variedade de espécies de plantas: de cereais a leguminosas, incluindo culturas folhosas, oleaginosas e fruteiras. Este método preconiza a integração estável de transgenes no genoma da planta hospedeira e permite a síntese contínua da proteína recombinante como uma característica fenotípica hereditária, genericamente ou localizada em um órgão específico da planta (Xu et al. 2012).

Já a expressão gênica transiente mediada por um intermediário infeccioso bacteriano ou viral é geralmente utilizada para verificar a eficiência da atividade da construção gênica utilizada em experimentos de transformação genética e para validar rapidamente a estrutura e função da proteína recombinante (Loh et al. 2017).

No entanto, a infiltração de folhas de plantas - notavelmente as espécies de *Nicotiana benthamiana* - por vácuo ou seringas usando suspensões de *Agrobacterium tumefaciens* pode resultar na transformação transiente de várias células foliares e na obtenção de altos níveis de expressão gênica alguns dias após a realização do experimento, possibilitando o escalonamento rotineiro da produção de PMPs em níveis industriais (Gleba et al. 2014). A Tabela 2 apresenta as principais características comparativas entre as duas estratégias de transformação genética de plantas para o

desenvolvimento de PMPs, bem como as plataformas disponíveis em cada cenário de expressão:

Transformação estável		Referências
Tipo	Plantas inteiras Transformação nuclear estável	Obembe et al. 2011 Drake et al. 2017
Principais características	Incorporação estável de genes exógenos no genoma nuclear Herança estável de transgenes em gerações sucessivas Usada para obter a maioria das plantas transgênicas até hoje Utilizada comercialmente desde 2014, no Japão, pela empresa Hokusai para a produção de interberry-Alpha, um interferon-alfa canino recombinante, produzido em morango transgênico, para o tratamento da doença periodontal em cães	
Vantagens	Transmissão de novos caracteres como traços herdáveis para a progênie Alta escalabilidade	
Desvantagens	Possibilidade de cruzamentos indesejáveis em algumas espécies Ciclo longo da produção de algumas espécies de plantas Níveis geralmente pobres de expressão transgênica	
Tipo	Plantas inteiras Transformação nuclear estável	
Principais características	Transformação estável e simultânea de inúmeras cópias do genoma núcleo Herança materna exclusivamente em muitas espécies	Meyers et al. 2010
Vantagens	Biocontenção natural Minimização do fluxo de genes por cruzamento Altos níveis de expressão (até 70% TSP)	
Desvantagens	Limitada a poucas espécies: tomate, alface, soja e berinjela. Transformação rotineira apenas de tabaco Estabilidade variável da proteína	

Tipo	Culturas de células de plantas em suspensão	
Principais características	<p>Formação de agregados indiferenciados de células vegetais dispersos e propagados em meio líquido</p> <p>Sistema utilizado para a produção do primeiro PMP que alcançou o status de produção comercial pelo FDA, em 2012: Eleyso, a enzima de combate à glucocerebrosidase, produzida pela empresa israelense Protalix, além da vacina de frango comercial contra o Newcastle vírus (NDV) da Dow Agrosience</p>	
Vantagens	<p>Rápida, relativamente barata e de alto nível de contenção</p> <p>Geralmente produção de alta pureza e baixo custo de processamento quando o PMP é secretado no meio de cultura</p> <p>Homogeneidade da produção</p> <p>Baixa heterogeneidade da adição de N-glicanos</p>	
Desvantagens	<p>Necessidade de condições de produção estéreis</p> <p>Diminuição dos níveis de biossíntese proteica em fase estacionária, devido à atividade proteolítica</p> <p>Restritas a apenas algumas culturas, como o tabaco, <i>Arabidopsis</i>, arroz e cenoura</p>	
Sistemas de expressão transitória		
Tipo	Método de agroinfiltração	
Principais características	<p>Infiltração de folhas de tabaco por suspensão de células de <i>Agrobacterium tumefaciens</i></p>	
Vantagens	<p>Transferência de T-DNA bacteriano para um elevado número de células foliares</p> <p>Alta expressão gênica frequente</p> <p>Possibilidade de produzir produtos farmacêuticos de grau clínico</p>	
Desvantagens	<p>Deterioração rápida da expressão de gene após o pico de expressão.</p> <p>Incapacidade de transferir o transgenes para progênes</p>	
Tipo	Método de infecção por vírus	
Principais características	<p>Método não integrativo</p> <p>Baseado no uso de vírus vegetais, como o vírus do mosaico do tabaco (TMV) e o vírus X da batata (PVX), como portadores infecciosos de transgenes</p> <p>Usado para infectar o tabaco</p> <p>Usado para a obtenção em grande escala de vacinas contra linfoma não-Hodgkin de células B</p>	
Vantagens	<p>Rápido, escalonável e capaz de obter altos níveis de biossíntese de proteínas recombinantes</p>	
Desvantagens	<p>Restrito ao tabaco</p> <p>Necessidade de processamento imediato devido à instabilidade proteica</p>	
Tipo	Magniflection™	

Franconi et al. 2010
Drake et al. 2017

Regnard et al. 2010
Loh et al. 2017

McCormick et al. 2008
Marsian e Lomonosoff 2016

Principais características	<p>Plataforma que combina as características dos métodos Agroinfiltração e infecção por vírus</p> <p>Desenvolvido pela empresa alemã Icon Genetics</p> <p>Uso de vetores virais desconstruídas para a expressão gênica, sem as sequencias de proteínas da capa proteica viral e sequências de proteínas de motilidade viral</p> <p>A infecção sistêmica de células e a integração de genes é mediada por <i>Agrobacterium</i></p>	Gleba et al. 2014
Vantagens	<p>Melhor infectividade</p> <p>Aumento da expressão gênica e da biossíntese de proteínas recombinantes a níveis superiores a 80% TSP</p> <p>Capaz de produzir tanto moléculas pequenas, tais como antígenos vacinais, quanto IgGs grandes e complexos</p> <p>Capaz de co-expressar dois ou mais polipeptídeos simultaneamente</p> <p>Capaz de montar proteínas hetero-oligoméricas</p> <p>Facilidade de manipulação</p>	
Desvantagens	<p>Restrito ao tabaco</p> <p>Necessidade de processamento imediato devido à instabilidade proteica</p>	

Tabela 2: Plataformas vegetais disponíveis para a biossíntese de PMPs.

A seleção das espécies vegetais destinadas à produção de PMPs representa um dos critérios mais importantes para o sucesso da estratégia molecular de expressão gênica. Características genômicas, bioquímicas, fisiológicas e até mesmo morfológicas inerentes a cada espécie têm uma influência crucial no rendimento de biossíntese de proteínas recombinantes, na capacidade de promoção de modificações pós-traducionais em proteínas complexas, na estabilidade estrutural do polipeptídeo e no custo final de produção (Stoger et al. 2002, Fischer et al. 2004).

A Tabela 3 ilustra as propriedades e peculiaridades das principais espécies de plantas usadas como biorreatores de proteínas recombinantes para os setores farmacêutico e industrial.

Espécie	Vantagens	Desvantagens
Culturas folhosas		
Tabaco	Produção de biomassa elevada Tecnologias de transformação e processamento bem estabelecidas Alta escalabilidade Culturas não alimentares e não alimentícias	Baixa estabilidade pós-colheita da proteína Presença de alcalóides
Alface	Alto rendimento de biomassa Comestíveis Útil para a vacinação humana	Baixa estabilidade pós-colheita da proteína
Alfafa	Produção elevada de biomassa Útil para a vacinação animal Propagação clonal Adição de N-glicanos homogêneos	Baixa estabilidade pós-colheita da proteína Presença de ácido oxálico
Trevo	Produção elevada de biomassa Útil para a vacinação animal propagação clonal Adição de N-glicanos homogêneos	Baixa estabilidade pós-colheita da proteína
Leguminosas		
Soja	Biomassa abundante, possibilidade de expressão transgênica no revestimento de sementes Alta concentração proteica em sementes Alta proporção de biomassa de sementes/custo de produção	Níveis usualmente baixos da expressão do transgene
Ervilha	Alta concentração proteica em sementes	Níveis usualmente baixos da expressão do transgene
Ervilha de pombo	Alta concentração proteica em sementes	Níveis usualmente baixos da expressão do transgene
Cereais		
Trigo	Alta estabilidade proteica durante o armazenamento	Baixos rendimentos Dificuldades no processamento e manuseio
Cevada	Alta estabilidade proteica durante o armazenamento	Baixos rendimentos Dificuldades no processamento e manuseio
Milho	Alta estabilidade proteica durante o armazenamento Produção elevada de biomassa Facilidade de processamento e manuseio	Níveis usualmente baixos da expressão do transgene
Arroz	Alta estabilidade proteica durante o armazenamento Produção de biomassa elevada Facilidade de processamento e manuseio	Níveis usualmente baixos da expressão do transgene
Frutas		
Tomate	Colheita comestível Contenção em estufa	Cultivo caro Baixa estabilidade após a colheita
	Tubérculos	

Cenoura	Comestíveis Alta estabilidade proteica em tecidos de armazenamento Alta escalabilidade Facilidade de purificação e processamento em sistema de suspensão celular	
Batata	Comestíveis Alta estabilidade proteica em tecidos de armazenamento	Níveis usualmente baixos da expressão do transgene Precisa ser cozida antes do consumo
Oleaginosas		
Canola	Plataforma de fusão proteica oleosin Sistema de brotamento desenvolvido	Baixos rendimentos
<i>Camelina Sativa</i>	Plataforma de fusão proteica oleosin Sistema de brotamento desenvolvido	Baixos rendimentos
Moss		
<i>Patens de physcomitrella</i>	Facilidade de cultivo contenção Propagação clonal Permite a secreção em meio de cultura Exibe recombinação homóloga em sítios genômicos de alta expressão gênica	Baixa capacidade de escalonamento
Algas verdes e plantas aquáticas		
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Facilidade de cultivo em contenção Propagação de clonal Permite a secreção em meio de cultura	Baixa capacidade de escalonamento
Lemna	Facilidade de cultivo em contenção Propagação clonal Permite a secreção em meio de cultura	Baixa capacidade de escalonamento
Plantas modelo		
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Alta disponibilidade de mutantes Alta acessibilidade genética Facilidade de transformação	Baixa biomassa

Tabela 3: Espécies vegetais utilizadas como biorreatores de PMPs.

Adaptado de Fischer et al. 2004.

5 | ESTRATÉGIAS PARA MAXIMIZAR O RENDIMENTO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EM PLANTAS.

Um dos fatores mais importantes que determinam a viabilidade da produção de proteínas heterólogas nas plantas é obter quantidades satisfatórias dos polipeptídeos. O rendimento absoluto da produção depende da maximização da eficiência de todos os estágios de expressão gênica e da estabilidade proteica. Desse modo, as várias estratégias destinadas a aumentar a quantidade final de proteína recombinante em reatores de plantas se concentram na transcrição gênica, no processamento pós-transcricional, na tradução e na estabilidade pós-traducional da proteína (Streatfield 2007).

5.1 Estratégias no nível transcricional

5.1.1 Escolha de promotores e terminadores

Para se obter altos níveis de expressão de transgenes, os dois elementos mais importantes são o promotor e o terminador da transcrição (Ma et al. 2003). Promotores eucarióticos fortes apresentam sítios específicos que facilitam o seu reconhecimento por fatores de transcrição e da RNA polimerase II. Eles também podem ser regulados por intensificadores específicos (elementos proteicos “*enhancer*”) que aumentam a expressão heteróloga, fornecendo altos níveis de produção de mRNA (Streatfield 2007, Tschofen et al. 2016).

Os promotores constitutivos mais fortes e mais amplamente utilizados para expressão heteróloga em dicotiledôneas são o CaMV 19S e 35S, derivados dos transcritos 19S e 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV). Em monocotiledôneas, o promotor da ubiquitina 1 (*ubi-1*) do milho também é muito popular e eficiente para a expressão de proteínas recombinantes em cereais (Twyman et al. 2003).

Além disso, promotores induzíveis que permitem a sua própria regulação externa por meio de estímulos químicos e físicos emergem como ferramentas interessantes para maximizar a expressão gênica no nível transcricional (Twyman et al., 2003). Neste contexto, um promotor de batata-doce (*Ipomoea batatas*) ativado por peroxidase foi usado para aumentar 30 vezes a expressão do gene *gus* em plantas de tabaco transgênico submetidas à presença de peróxido de hidrogênio e à luz ultravioleta do que o promotor 35S CaMV (Kim et al. 2003). Outro exemplo interessante foi a rápida indução da biossíntese de proteínas heterólogas no tabaco utilizando o promotor endógeno que controla o gene da enzima hidroximetilglutaril-Coa-redutase (HMGR2), ativada por estresse mecânico induzido por práticas de colheita, um sistema desenvolvido pela empresa americana Crop Tech Corp. (Padidam 2003).

Os terminadores amplamente utilizados incluem o 35S CaMV, o dos genes *nos* e *ssu*, respectivamente de *A. tumefaciens* e ervilha (*Pisum sativum*) (Ma et al. 2003).

5.1.2 Minimização do silenciamento transcricional

Vários mecanismos podem levar à interrupção ou inibição da síntese de mRNA nas plantas, tais como a presença de sequências de DNA procarióticas (típicas do plasmídeo utilizado na transformação genética) e que tenham sido recombinadas com o DNA do hospedeiro eucariótico; a metilação do DNA; o chamado “efeito de posição”, ou seja, o sítio de integração do transgene no genoma da planta; a estrutura do sítio de integração; a presença de várias cópias ou cópias supérfluas do transgene *in tandem*, além das sequências com um potencial para a formação de “hairpins” e RNA de cadeia dupla (Finnegan e McElroy 1994).

Algumas estratégias já provaram ser eficazes na eliminação ou redução de tais problemas, tais como a utilização de vetores livres de sequências procarióticas integrativas, de sequências com ausência de obstáculos para o acoplamento da RNA polimerase II e/ou que não levem à formação de mRNA fita dupla; as técnicas para integrar cópias únicas do transgene no genoma da planta; a adição de sequências flanqueadoras das regiões de recombinação e a integração sítio dirigida por edição de genomas; a escolha do germoplasma em com baixa frequência de sítios de metilação; além da redução do feedback negativo dos promotores pela expressão da enzima alvo em um compartimento celular diferente do qual seu substrato é encontrado (Meyer e Saedler, 1996).

5.2 Estratégias nos níveis pós-transcricionais

5.2.1 Minimização do silenciamento pós-transcricional

O processamento de transcritos primários é crucial para a obtenção de altos níveis de proteína heteróloga. Embora a maioria dos experimentos de transformação genética vegetal utilizem sequências de codificação semelhantes a cDNA provenientes de bibliotecas construídas a partir de mRNAs adequadamente processados, a presença de íntrons modificados no transgene pode aumentar significativamente a estabilidade do mRNA (Tfer et al. 1993). Esta aplicação já foi comprovada para aumentar a expressão de genes endógenos em monocotiledôneas, especialmente em plantas de milho (Töpfer et al. 1993).

Sítios de poliadenilação também exercem grande influência na estabilidade de mRNAs e nos níveis de expressão gênica em células vegetais. A detecção e a eliminação, quando possível, de sítios de reconhecimento específicos que contribuem para o decaimento de mRNAs em alguns terminadores também podem ser usados como uma ferramenta para evitar o silenciamento pós-transcricional (Töpfer et al. 1993).

5.2.2 Otimização de tradução

O funcionamento correto do início da tradução é um fator limitante para o nível de acumulação de proteínas heterólogas. A sobreposição do sítio de iniciação da tradução com a sequência de consenso Kozak é um grande otimizador dos níveis de tradução, embora existam pequenas diferenças estruturais nessas sequências em animais e plantas, algo importante quando o objetivo é expressar genes humanos em plantas transgênicas (Kawaguchi e Bailey-Serres 2005).

A taxa de tradução também pode variar dependendo da disponibilidade de RNAs de transferência de aminoácidos específicos para certos códons na célula vegetal. A otimização da utilização de códons com as mutações silenciosas sítio-dirigidas ou

a produção de sequências sintéticas previamente modificadas da codificação pode ser muito útil para aumentar consideravelmente a tradução de mRNAs eucarióticos (Streatfield 2007).

Demonstrou-se que as sequências líderes de diferentes transcritos de plantas influenciam os níveis aumentados de acúmulo de proteína recombinante em biorreatores vegetais. Eles podem ser adaptados caso a caso para diferentes combinações de genes/plantas hospedeiras para maximizar a eficiência da tradução (Streatfield 2007).

5.2.3 Estabilidade proteica pós-traducional

Os níveis de transcrição e tradução estão relacionados à eficiência da biossíntese de proteínas heterólogas. Outra variável deve ser considerada para a estimativa do rendimento de produção ou acúmulo de biofármacos protéicos: seu nível de degradação após a biossíntese, ou seja, seu grau de estabilidade (Stoger et al. 2005).

Estratégias moleculares que atuam na estabilidade de proteínas, combinadas com a escolha de promotores, correspondem aos avanços mais eficientes em termos de aumentos reais no rendimento de biofármacos recombinantes e incluem duas abordagens distintas não exclusivas: o uso de promotores tecido específicos - principalmente aqueles associado a genes endógenos de sementes - e ao direcionamento subcelular de polipeptídeos (“direcionamento de proteína”) (Abiri et al. 2015).

Os promotores tecido específicos são sequências reguladoras que restringem a expressão gênica espacialmente a apenas uma ou mais partes da planta e também podem indiretamente regular a expressão em um nível temporal quando o órgão destinado ao acúmulo de proteínas heterólogas está associado apenas a um período do ciclo reprodutivo da cultura (por exemplo, flores e sementes) (Capell e Christou 2004).

Diversos promotores tecido específicos já foram extensamente caracterizados, tais como os que controlam a expressão de uma zeína de semente de milho, de uma glutenina de trigo, da glutelina de arroz e de proteínas de semente de ervilha (Ma et al. 2003).

A biossíntese de proteínas heterólogas especificamente em sementes implica muitas vantagens naturalmente proporcionadas por tais órgãos. Ao contrário das folhas, as sementes são locais de armazenamento natural para altas concentrações de proteínas de reserva usadas na nutrição embrionária nos estágios iniciais do desenvolvimento fisiológico da plântula (Stoger et al., 2005). Esses órgãos apresentam não apenas um ambiente bioquímico adequado, desprovido de compostos fenólicos e baixa concentração de hidrolases, mas também tecidos especializados para o acúmulo de proteína altamente estável por longos períodos de tempo, mesmo à

temperatura ambiente, o que reduz a necessidade de condições especiais de armazenamento. (Takaiwa et al. 2007).

Como os custos de processamento e purificação são inversamente proporcionais à concentração do produto em relação à biomassa da planta, o acúmulo de altos níveis de proteínas heterólogas em um volume reduzido leva a uma diminuição significativa nos custos de produção de biofármacos recombinantes (Stoger et al. 2002).

5.2.4 Endereçamento subcelular de proteína

O endereçamento subcelular desempenha um papel fundamental nos níveis de acúmulo de proteína heteróloga, já que o compartimento celular em que são acumuladas influencia diretamente nos processos de dobramento, montagem e nas suas modificações pós-traducionais, além de prevenir a imediata degradação dos polipeptídeos (Fahad et al. 2015).

Os peptídeos sinais N ou C-terminais, responsáveis diretos pelo endereçamento subcelular proteico, podem ser fundidos com proteína heteróloga. Essas sequências podem direcionar proteínas de maneira assistida por um conjunto diversificado de proteínas de reconhecimento de sinal, para as mitocôndrias, vacúolos, cloroplastos ou retê-las no retículo endoplasmático, e são geralmente clivadas após a chegada do polipeptídeo de interesse à organela alvo (Xu et al., 2012).

Comumente, quatro alvos subcelulares são os principais destinos de compartimentalização para produzir produtos biofarmacêuticos: o apoplasto, o retículo endoplasmático, os cloroplastos e os corpos protéicos da semente (Daniell et al., 2001). Dependendo da massa molecular, o polipeptídeo pode ser segregado ou retido no apoplasto, o que conduz a importantes aplicações para sistemas de cultura de células em suspensão. Schillberg et al. (1999) compararam a estabilidade de anticorpos inteiros idênticos cuja acumulação foi direcionada ao citosol e ao apoplasto de folhas de tabaco transgênicas e verificaram que a via secretória constitui um conjunto de ambientes mais adequados para o dobramento e montagem desse tipo de proteína complexa, já que os níveis de acumulação no apoplasto eram muito mais altos que os do citosol.

A principal desvantagem de se abordar o apoplasto é o fato de que proteínas heterólogas precisam ser processadas antes no complexo de Golgi, onde ocorre a adição de glicanos típicos, o que pode levar à perda de autenticidade estrutural e funcional dos polipeptídeos (Daniell et al. 2001).

A passagem de proteínas através do retículo é o destino inicial dos polipeptídeos encaminhados para a via secretória, e a retenção dessas moléculas no lúmen dessa organela tem se mostrado mais aconselhável para o acúmulo de maiores quantidades de proteínas recombinantes nas plantas do que no apoplasto e no citosol (Zimmermann et al. 1998). Conrad e Fiedler (1998) determinaram que a quantidade

de anticorpos recombinantes fundidos na porção C-terminal ao tetrapeptídeo K/H DEL - um dos sinais peptídicos mais populares atualmente empregados para a retenção de proteínas heterólogas no lúmen do endoplasmático retículo: ela foi 2 a 10 vezes maior do que aqueles expressos em diferentes espécies de plantas na ausência do peptídeo sinal.

O uso de K/H DEL também foi responsável por um aumento acentuado no acúmulo de proteína DIP B nas células das folhas de *Arabidopsis thaliana*, resultando em 8,5% do total de proteínas solúveis totais (PSTs) nesses órgãos (Yang et al. 2005).

Sob a mesma estratégia molecular de expressão, polipeptídeos expressos em sementes de cereais permaneceram estáveis até três anos após o armazenamento à temperatura ambiente, sem perda significativa de atividade, devido à baixa atividade proteolítica nestes compartimentos (Larrick e Thomas 2001).

Outra vantagem do chamado direcionamento de proteínas para o retículo endoplasmático de sementes é o fato de que as proteínas retidas nessa organela não sofrem processamento no complexo de Golgi, aspecto fundamental para a produção de proteínas heterólogas que necessitam de uma glicosilação humanizada, isto é, sem a adição de glicanos típicos de plantas e com a adição dos carboidratos humanos corretos, algo particularmente desejável no que diz respeito aos anticorpos recombinantes (Stoger et al. 2002).

O direcionamento de proteínas para cloroplastos é também uma estratégia interessante para aumentar os níveis de acumulação de proteínas recombinantes. No lúmen do cloroplasto existem chaperonas capazes de auxiliar no dobramento e na montagem de proteínas heterodiméricas e oligoméricas, além de baixas concentrações de hidrolases e peptidases, o que torna esse ambiente relativamente estável para o acúmulo de proteínas de interesse (Daniell et al. 2001). No entanto, como a maquinaria de expressão gênica nos cloroplastos se assemelha à dos procariontes, a maioria das modificações pós-traducionais, como a glicosilação, não pode ser realizada nessa organela, exceto pela formação de ligações dissulfeto (Tschofen et al. 2016).

Os corpos protéicos, por sua vez, são extensões derivadas do retículo endoplasmático especializado no acúmulo de proteínas de reserva em sementes de diversas espécies de plantas produtoras de grãos. Eles funcionam como cisternas que ocupam um grande volume citoplasmático e evolutivamente sofreram adaptações, resultando na alta capacidade de compartimentar grandes volumes de proteínas e de maximizar a integridade desses polipeptídeos (Zheng et al., 1992). Essas inclusões globulares são encontradas em células cotiledonares de sementes de tabaco, leguminosas como soja e feijão, bem como gramíneas como trigo e cevada, e se originam agora quando a biossíntese de proteínas de reserva começa nos tecidos responsáveis pela nutrição do embrião (Yoo e Chrispeels 1980). Dessa forma, há um aumento significativo no número e na disponibilidade de corpos protéicos ao longo

do processo de maturação fisiológica dos grãos dessas espécies.

Uma vez que esses vacúolos altamente especializados não sofrem qualquer tipo de fusão com os lisossomos, seu lúmen apresenta pH quase neutro e praticamente ausência de aminopeptidases, fatores que os caracterizam como um ambiente subcelular onde a degradação de proteínas é mínima e um excelente alvo para a biossíntese recombinante de polipeptídeos quando o objetivo principal da transformação genética é manter a estabilidade dessas moléculas (Takaiwa et al. 2007).

6 | MAGNIFECTION™: UM MÉTODO PARA A EXPRESSÃO EM MASSA DE PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS HETERÓLOGOS EM *NICOTIANA BENTHAMIANA*.

Os PAMs são elementos responsivos dos sistemas de defesa inatos de micróbios, plantas e animais, naturalmente sintetizados em níveis baixos (Watkins e Bonomo 2016, Uhlig et al. 2014). Para maximizar a biossíntese de PAMs, as bactérias geneticamente modificadas e as células de levedura são frequentemente exploradas como veículos para a produção recombinante dessas moléculas (Perry et al. 2016, Nagel et al. 2016). Até hoje, muitos PAMs diferentes foram sintetizados em *E. coli* e *Pichia pastoris* (Perry et al. 2016). Além do alto potencial terapêutico apresentado pelos PAMs recombinantes, o investimento limitado de empresas e as desvantagens em termos de baixo rendimento, baixa qualidade e atividade *in vivo* insatisfatória restringiram o desenvolvimento comercial a poucos PAMs promissores. Além das limitações de produção, relativamente poucos PAMs chegaram às fases mais avançadas de testes clínicos antes da comercialização.

Entre os fatores mais importantes que limitam a produção recombinante de PAMs em sistemas microbianos estão a toxicidade interna do peptídeo para as células hospedeiras. Para muitos PAMs, mesmo baixas concentrações podem ser fatais para o micróbio, Além disso, também pode-se notar a baixa qualidade do produto em termos de modificações pós-traducionais incompletas. Sob tais circunstâncias, as plantas aparecem como sistemas alternativos interessantes para a produção de PAMs recombinantes (Kosikowska e Lesner 2016, Nagel et al. 2016).

Embora as plantas realizem um vasto arsenal de modificações pós-traducionais, baixos níveis de biossíntese recombinante de peptídeos são comuns, resultando em baixas quantidades de produtos purificados. Apesar de tais limitações, os sistemas vegetais empregados para a biossíntese de proteínas heterólogas têm sofrido significativa melhoria técnica nos últimos anos. A descoberta de promotores potentes associados ao aumento da expressão gênica, a aplicação de estratégias e elementos que estabilizam transcritos primários, a otimização de códons e os diversos métodos que maximizam a estabilidade pós-traducional têm contribuído para aumentos dramáticos nas quantidades finais de proteínas acumuladas em

plantas transgênicas e em suspensão de células vegetais (Obembe et al. 2011). Apesar de melhorias palpáveis, limitações como os níveis geralmente baixos de expressão e o longo tempo para obter quantidades proteicas suficientes para os primeiros ensaios biológicos ainda restringem a produção recombinante nestes sistemas (Xu et al. 2012).

A alternativa mais interessante e recente para contornar ambas as limitações é o uso de vetores virais de plantas portadores de sequências regulatórias de expressão gênica que permitam altos níveis de expressão transitória (transitória) em poucos dias após a inoculação. O sistema Magniffection™ integra métodos para expressar transgenes de interesse usando vetores virais especialmente construídos para fornecer altas taxas de transcrição, alta velocidade na obtenção dos primeiros miligramas de proteína heteróloga e alta capacidade de escalonamento de produção (Gleba et al. 2005).

Em essência, a estratégia Magniffection™ preconiza a infiltração total de plantas adultas de *N. benthamiana* com uma suspensão diluída de *Agrobacterium tumefaciens* contendo replicons de RNA clonados em seus T-DNAs, geralmente baseados no vírus do mosaico do tabaco (TMV). Neste processo, a bactéria assume as funções virais iniciais da infecção primária e do movimento sistêmico, enquanto o vetor viral promove o espalhamento curto (célula a célula), a amplificação do sinal e a expressão do transgene de interesse em níveis elevados. Desse modo, poucas plantas adultas de tabaco permitem a otimização preliminar das diluições das suspensões e a obtenção de miligramas ou gramas da proteína heteróloga (Gleba et al. 2014) (Figura 1).

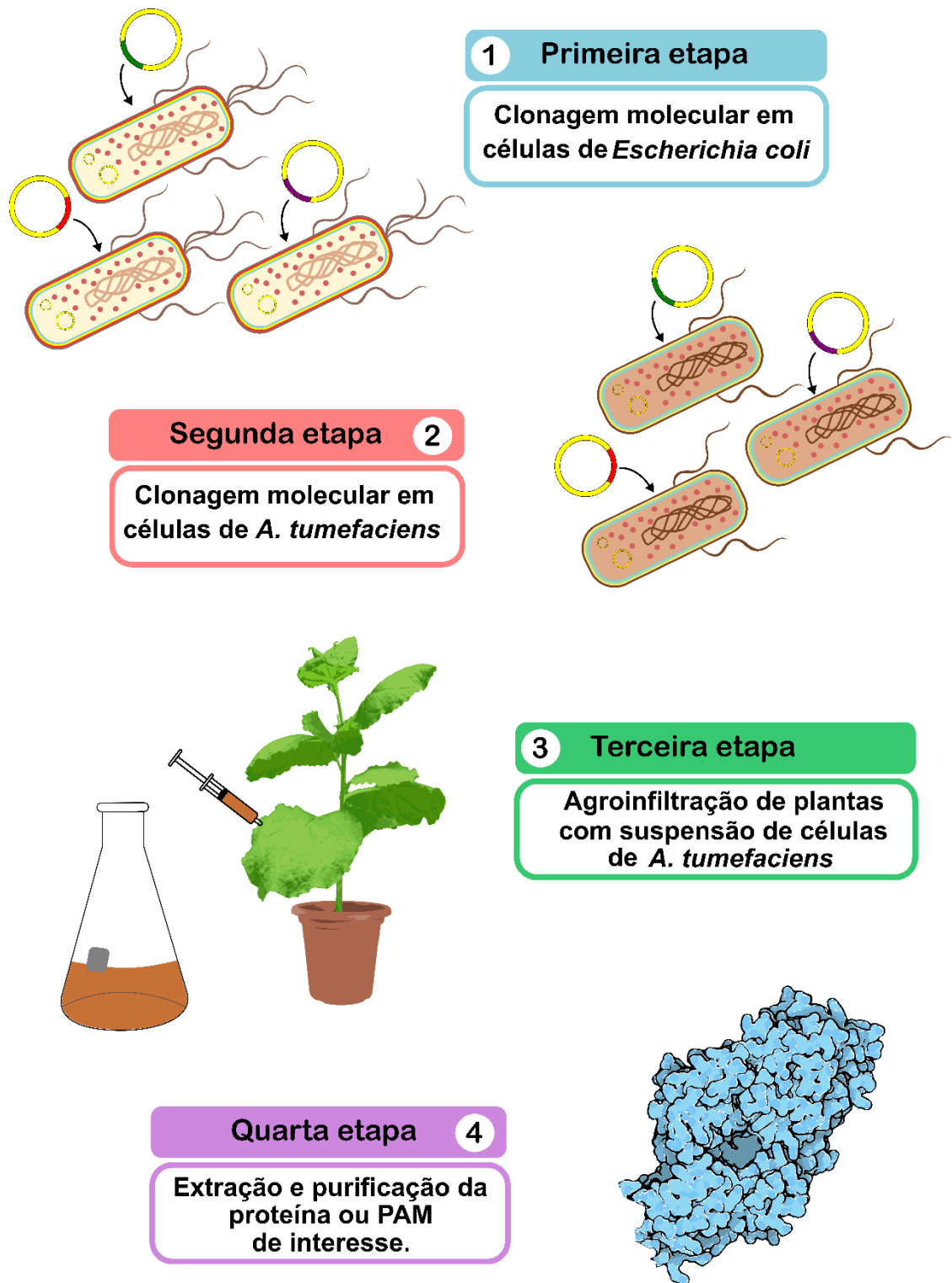


Figura 1 - Método de agroinfiltração para a biossíntese em larga escala de PAMs recombinantes. Após a clonagem do gene usando células de *E. coli*, pró-vetores carregando a extremidade 3 da cassete de expressão (vetor verde), a extremidade 5 da cassete de expressão (vetor azul) e o gene que codifica a integrase para a recombinação de extremidades (vetor amarelo) são inseridos em células de *A. tumefaciens*, seguido de cultivo em meio LB. A cultura bacteriana é então injetada no lado negativo das folhas de *N. benthamiana*. Após 5 a 8 dias, os rendimentos de PAMs recombinantes podem ser obtidos a partir de folhas colhidas após extração e purificação.

A tecnologia Magnifection™ combina as vantagens dos sistemas de expressão padrão (viral, bacteriana e vegetal) e apresenta três grandes vantagens quando

comparada às outras plataformas disponíveis. A primeira é o uso de vetores virais eficientes e com um design que permite o incremento da biossíntese dos mRNAs correspondentes. Isto permite altas taxas de expressão de transgenes pelo aumento da transcrição gênica, estimulada pela presença de fortes promotores virais. A presença de íntrons no cassete de expressão também permite a migração correta dos mRNAs produzidos para o citosol da célula vegetal (Gleba et al. 2014, 2004).

Em segundo lugar, a *Agrobacteria* promove a transformação genética de células somáticas de folhas de *N. benthamiana* de forma sistêmica. Com o turnover bacteriano célula-a-célula, não há necessidade de aumentar a extensão do cassete de expressão viral com genes supérfluos, como genes de codificação de proteínas de motilidade viral, por exemplo. Isso aumenta a disseminação de transgenes integrados ao cromossomo da planta e não permite mudanças metabólicas na biossíntese de proteínas adicionais sem utilidade, concentrando todo o esforço de produção nas maquinarias de transcrição e tradução (Gleba et al. 2004, 2007).

Finalmente, o sistema Magniffection™ alia velocidade e eficiência de acúmulo de transcritos sem precedentes, com rendimentos de produção consistentemente altos e baixos custos médios de produção (Gleba et al. 2005). A alta capacidade de escalonamento de produção permitida pela agroinfecção de plantas com *A. tumefaciens* é devida ao alto rendimento de inoculação - 1 litro de meio de cultura bacteriano é suficiente para a infecção de mais de 10 kg de folhas - e ao rápido pico de expressão gênica, que normalmente ocorre entre o sétimo e oitavo dias após a agroinfiltração (Figura 2).

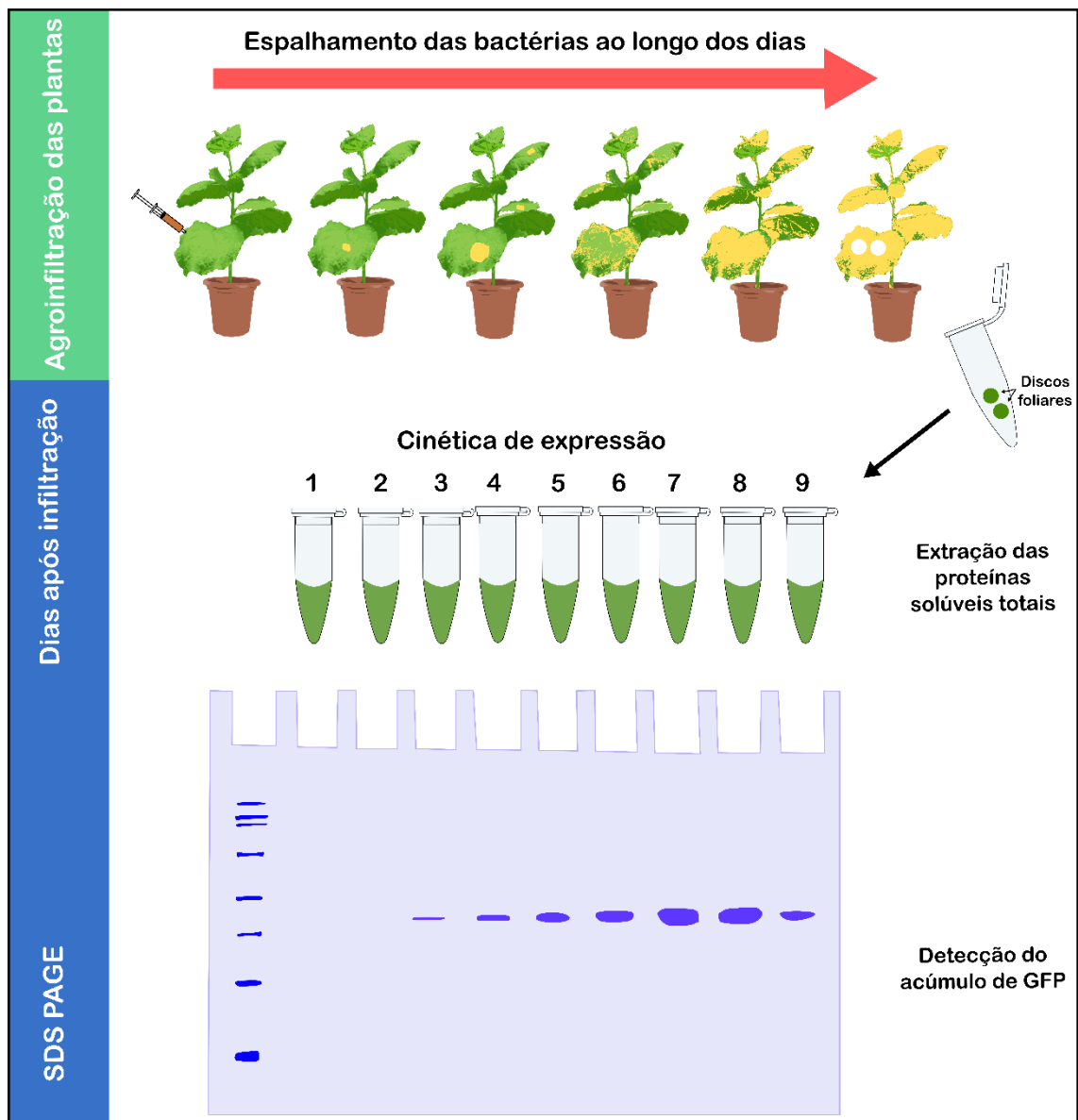


Figura 2 - Cinética de expressão de genes estranhos em folhas de *N. benthamiana*. A estratégia de entrega de genes mediada por *A. tumefaciens* permite a disseminação eficiente de genes codificadores de PAMs e a integração às células hospedeiras. Promotores virais potentes induzem altas taxas de expressão da proteína verde fluorescente (GFP) do gene *Aequorea victoria*, um gene repórter freqüente usado para validação experimental. O pico de expressão é cerca do sétimo ou oitavo dia após a inoculação.

De maneira sintética, o sistema Magniffection™ permite a produção em escala industrial de proteínas e peptídeos sem a transformação genética das células germinativas, o que leva a uma síntese protéica rápida e segura. Como a expressão transiente de transgenes depende da transformação apenas de células somáticas por genes transportados sistemicamente por *Agrobacteria* e na amplificação do acúmulo de proteínas com base na potência dos vetores virais, ações que dispendiam energia e maquinaria molecular, tais como a montagem de vírions maduros, a sua disseminação em tecidos verdes, a reprogramação do metabolismo da planta e a inibição da silenciamento são ações exclusivamente delegadas à *A. tumefaciens* (Marillonnet et al. 2004, 2005).

A escala industrial pode ser facilmente obtida por meio de um aparelho simples

para a agroinfiltração a vácuo de plantas inteiras, em que o tempo de incubação para amplificação viral e expressão de pico não excede 10 dias. Frequentemente, 5 gramas de proteínas heterólogas são obtidas por quilograma de matéria seca infiltrada, e níveis de expressão iguais a 80% PST são comuns em casa de vegetação (Gleba et al. 2004).

Desde 2010, o sistema Magniffection™ tem sido utilizado pela empresa canadense Medicago para a produção industrial de uma vacina contra a gripe causada pelo vírus H1N1 nos Estados Unidos. Um acordo de financiamento de US \$ 21 milhões foi assinado entre a Medicago e a Agência Americana de Agências de Defesa Avançada (DARPA) para produzir 10 milhões de doses/mês no caso de uma pandemia. A vacina está passando por ensaios clínicos de fase II (em um total de IV) e tende a se juntar a outra vacina contra a variante viral H5N1, produzida pelo mesmo sistema (Holtz et al. 2015).

Hoje, muitos antígenos já foram sintetizados usando o sistema Magniffection™, como mostra a Tabela 4.

Antígeno	Doença/alvo	Status	Ref
Op 1	Alergia	<i>In vitro</i>	Lienard et al. 2007
Antígeno de proteção der p2	Antherax	Ensaio pré-clínicos em animais	Koya et al. 2005
Proteína principal do capsídeo L1	Cancro cervical	Ensaio pré-clínicos em animais	Lenzi et al. 2008
Antígeno VCA	Vírus Epstein-Barr	<i>In vitro</i>	Lee et al. 2006
HSP-A	<i>Piloro de Helicobacter</i>	Ensaio clínico de fase I/II	Gu et al. 2005
VP1	Febre aftosa	Ensaio pré-clínicos em animais	Wu et al. 2003
Hepatite B/C	HBsAg (HEP B)	Ensaio pré-clínicos em animais	Thani et al. 1995
F1-V	Praga	Ensaio pré-clínicos em animais	Del Prete et al. 2009
SARS-CoV-S1	Sars	Ensaio pré-clínicos em animais	Pogrebnyak na empresa al. 2005
Tet-C	Tétano	Ensaio pré-clínicos em animais	Tregoning et al. 2005
Diabetes tipo 1	GAD65	Experimentação pré-clínica animal	Ma et al. 2004
HIV p24 proteína capsídeo HIV	AIDS	<i>In vitro</i>	Zhang et al. 2002

TABELA 4: Exemplos de antígenos transientemente expressos usando o sistema Magniffection™.

Adaptado de cunha et al. 2017.

Uma série de vetores virais modernos baseados no TMV, chamados pICHs,

são otimizados para a expressão transiente de proteínas farmacológicas. Tais plasmídeos, referidos como pró-vetores, contêm íntrons de tabaco organizados sistematicamente por toda a molécula para permitir o processamento dos mRNAs no núcleo, além de apresentarem sítios de recombinação que permitem a manipulação do DNA ainda dentro da célula antes da conversão em um amplicon híbrido de RNA. Moléculas de DNA contendo os genes de interesse podem ser eficientemente recombinadas em plantas, utilizando recombinases sítio específicas tais como Cre ou a Integrase C31 de *Streptomyces sp.* (Gleba et al. 2014). Em resumo, o processo defende a montagem *in vivo* de pró-vetores de DNA por simples mistura e coinfusão de plantas com células de *Agrobacterium* portadoras dos componentes do vetor separadamente (Figura 3).

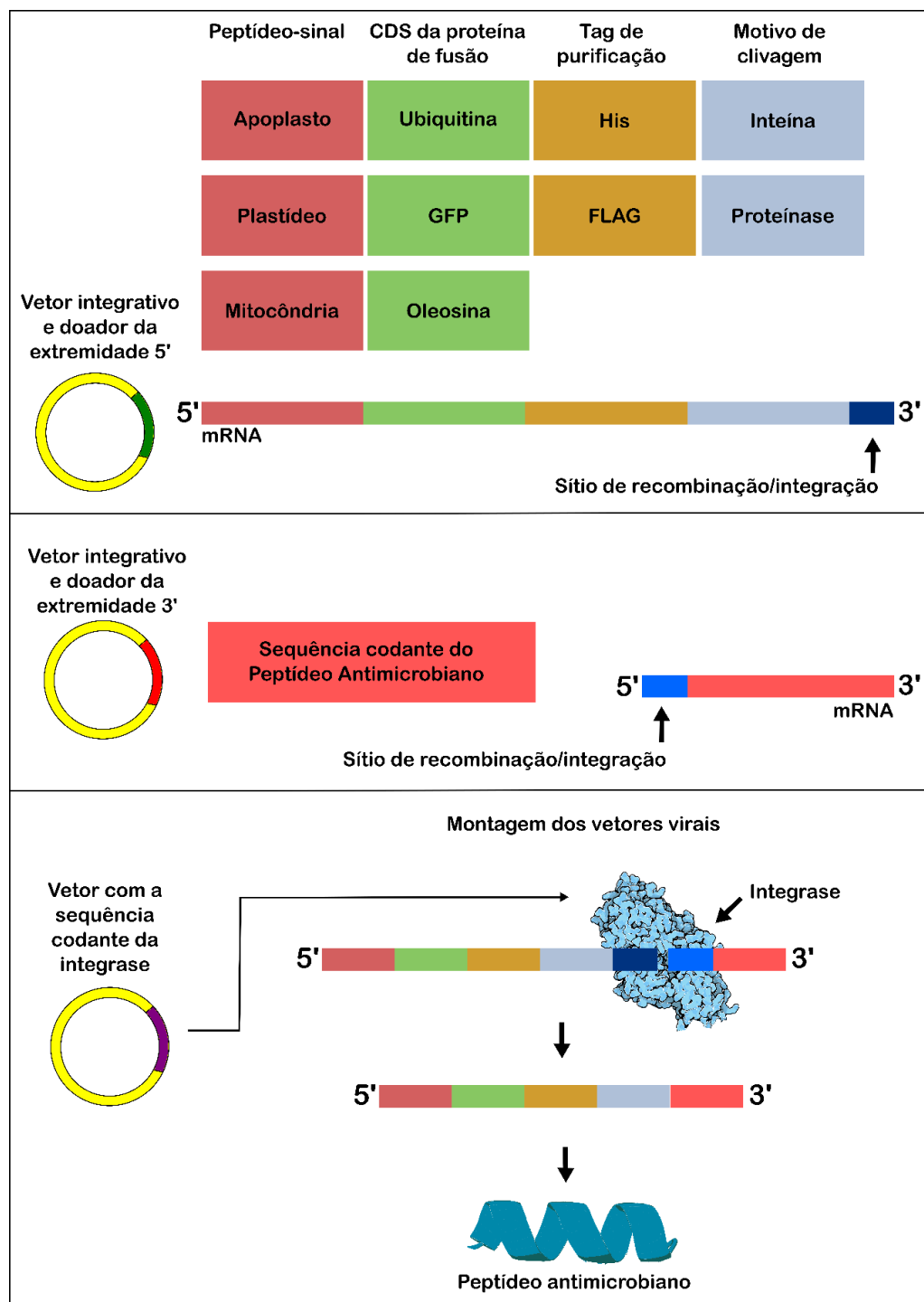


Figura 3 - Sistema Pró-vetor para montagem de módulos de expressão gênica. Dois vetores virais, doadores respectivamente das extremidades 5' e 3', são especificamente reconhecidos pela enzima Integrase C31 de *Streptomyces* sp. A enzima catalisa a recombinação entre os fragmentos pelo emparelhamento de bases homólogas nos locais de recombinação. O fragmento híbrido final apresenta todos os elementos genéticos para a expressão gênica em larga escala e para o endereçamento / purificação do AMP recombinante.

Desta maneira, três pró-vetores devem ser usados simultaneamente nos experimentos para obter altos níveis de expressão recombinante. Esta abordagem permite a rápida montagem dos vetores virais finais e a expressão de variantes de proteínas fusionadas a sinais peptídicos, a caudas de purificação facilitada e a domínios de ligação específicos a anticorpos, num arranjo versátil que permite a biossíntese de miligramas de proteínas em apenas alguns dias (Gleba et al. 2014,

2004, Marillonnet et al., 2005, 2004). Devido a todas as propriedades expostas, o sistema Magnifection™ pode ser uma excelente plataforma para a biossíntese em grande escala dos peptídeos antimicrobianos com atividades terapêuticas.

7 | CONCLUSÕES

A expressão recombinante dos PAMs usando o sistema Magnifection™ fornecerá subsídios para a sistematização da expressão em larga escala de moléculas com alto potencial terapêutico e capacidade de inibir uma ampla gama de patógenos que ameaçam a saúde humana. Combinações de pró-vetores virais representam um grande avanço em relação à produção de moléculas terapêuticas recombinantes. Como consequência da sua capacidade de automontagem, os vetores virais podem ser usados para estudar a expressão de vários outros PAMs extraídos de outras plantas, por exemplo, tioninas, snakinas, heveínas, defensinas, proteínas de transferência de lipídios e outros agentes citotóxicos. Tais melhorias permitirão a produção de grandes quantidades de PAMs suficientes para testar novas funções de controle antimicrobiano com potencial aplicação na agricultura, farmacologia e processamento de alimentos.

A biossíntese maciça de PAMs transitoriamente acumulados em folhas de *N. benthamiana* apresenta grande impacto científico, pois cria condições para o estudo sistemático da rápida expressão de peptídeos antimicrobianos em um sistema barato e seguro. Além disso, a produção em escala industrial de PAMs em um sistema simples recombinante com alta capacidade de escalonamento de produção, além do cultivo em estufa sob condições convencionais de crescimento, com apenas água, solo leve e fértil, representa um grande potencial econômico para a geração de produtos eficientes e baratos para o consumidor.

Vale ressaltar que essa abordagem de expressão transiente usando pró-vetores virais desconstruídos é uma tecnologia pioneira que representa a fronteira do que é mais sofisticado em termos do uso de sistemas vegetais heterólogos para fins terapêuticos.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF).

REFERÊNCIAS

- ANDERSSON DI, HUGHES D AND KUBICEK-SUTHERLAND JZ. 2016. **Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides**. *Drug Resist Updat* 26: 43-57.
- ABIRI R, VALDIANI A, MAZIAH M, SHAHARUDDIN N, SAHEBI M, BALIA YUSOF ZN, ATABAKI N AND TALEI D. 2015. **A Critical Review of the Concept of Transgenic Plants: Insights into Pharmaceutical Biotechnology and Molecular Farming**. *Curr Issues Mol Biol* 18: 21-42.
- CAPELL T AND CHRISTOU P. 2004. **Progress in plant metabolic engineering**. *Curr Opin Biotechnol* 15: 148-154.
- CHEN G-H, HSU M-P, TAN C-H, SUNG H-Y, KUO CG, FAN M-J, CHEN H-M, CHEN S AND CHEN C-S. 2005. **Cloning and Characterization of a Plant Defensin VaD1 from Azuki Bean**. *J Agric Food Chem* 53: 982-988.
- CONRAD U AND FIEDLER U. 1998. **Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity**. *Plant Mol Biol* 38: 101-109.
- CRAIK DJ, ČEMAŽAR M, WANG CKL AND DALY NL. 2006. **The cyclotide family of circular miniproteins: Nature's combinatorial peptide template**. *Biopolymers* 84(3): 250-266.
- CUNHA NB ET AL. 2017. **The next generation of antimicrobial peptides (PAMs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts**. *Drug Discov Today* 22: 234-248.
- CUNHA NB ET AL. 2011a. **Expression of functional recombinant human growth hormone in transgenic soybean seeds**. *Transgenic Res* 20: 811-826.
- CUNHA NB ET AL. 2011b. **Accumulation of functional recombinant human coagulation factor IX in transgenic soybean seeds**. *Transgenic Res* 20: 841-855.
- CUNHA NBD ET AL. 2016. **Cloning and characterization of novel cyclotides genes from South American plants**. *Biopolymers* 106: 784-795.
- DA CUNHA NB, VIANNA GR, DA ALMEIDA LIMA T AND RECH E. 2014. **Molecular farming of human cytokines and blood products from plants: Challenges in biosynthesis and detection of plant-produced recombinant proteins**. *Biotechnol J* 9: 39-50.
- DANIELL H, STREATFIELD SJ AND WYCOFF K. 2001. **Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants**. *Trends Plant Sci* 6: 219-226.
- DAVIES HM. 2010. **Commercialization of whole-plant systems for biomanufacturing of protein products: evolution and prospects**. *Plant Biotechnol J* 8: 845-861.
- DEL PRETE G, SANTI L, ANDRIANAIVOARIMANANA V, AMEDEI A, DOMARLE O, D'ELIOS MM, ARNTZEN CJ, L. R AND MASON HS. 2009. **Plant-derived recombinant F1, V, and F1-V fusion antigens of Yersinia pestis activate human cells of the innate and adaptive immune system**. *Int J Immunopathol Pharmacol* 22: 133-143.
- DRAKE PMW, SZETO TH, PAUL MJ, TEH AYH AND MA JKC. 2017. **Recombinant biologic products versus nutraceuticals from plants – a regulatory choice?** *Br J Clin Pharmacol* 83: 82-87.
- EGELKROUT E, RAJAN V AND HOWARD JA. 2012. **Overproduction of recombinant proteins in plants**. *Plant Sci* 184: 83-101.

- FAHAD S ET AL. 2015. **Recent developments in therapeutic protein expression technologies in plants.** *Biotechnol Lett* 37: 265-279.
- FINNEGAN J AND MCELROY D. 1994. **Transgene Inactivation: Plants Fight Back!** *Nat Biotechnol* 12(9): 883-888.
- FISCHER R, STOGER E, SCHILLBERG S, CHRISTOU P AND TWYMAN RM. 2004. **Plant-based production of biopharmaceuticals.** *Curr Opin Plant Biol* 7: 152-158.
- FRANCONI R, DEMURTAS OC AND MASSA S. 2010. **Plant-derived vaccines and other therapeutics produced in contained systems.** *Expert Rev Vaccines* 9: 877-892.
- GLEBA Y, KLIMYUK V AND MARILLONNET S. 2005. **Magnifection—a new platform for expressing recombinant vaccines in plants.** *Vaccine* 23: 2042-2048.
- GLEBA Y, KLIMYUK V AND MARILLONNET S. 2007. **Viral vectors for the expression of proteins in plants.** *Curr Opin Biotechnol* 18: 134-141.
- GLEBA Y, MARILLONNET S AND KLIMYUK V. 2004. **Engineering viral expression vectors for plants: the ‘full virus’ and the ‘deconstructed virus’ strategies.** *Curr Opin Plant Biol* 7: 182-188.
- GLEBA YY, TUSÉ D AND GIRITCH A 2014. **Plant Viral Vectors for Delivery by Agrobacterium.** In: PALMER, K AND GLEBA, Y (Eds.) *Plant Viral Vectors*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 155-192.
- GU Q, HAN N, LIU J AND ZHU M. 2005. **Cloning of Helicobacter pylori urease subunit B gene and its expression in tobacco (Nicotiana tabacum L.).** *Plant Cell Rep* 24: 532-539.
- HOLTZ BR, BERQUIST BR, BENNETT LD, KOMMINENI VJM, MUNIGUNTI RK, WHITE EL, WILKERSON DC, WONG K-YI, LY LH AND MARCEL S. 2015. **Commercial-scale biotherapeutics manufacturing facility for plant-made pharmaceuticals.** *Plant Biotechnol J* 13: 1180-1190.
- KAWAGUCHI R AND BAILEY-SERRES J. 2005. **mRNA sequence features that contribute to translational regulation in Arabidopsis.** *Nucleic Acids Res* 33: 955-965.
- KIM K-Y, KWON S-Y, LEE H-S, HUR Y, BANG J-W AND KWAK S-S. 2003. **A novel oxidative stress-inducible peroxidase promoter from sweetpotato: molecular cloning and characterization in transgenic tobacco plants and cultured cells.** *Plant Mol Biol* 51: 831-838.
- KOSIKOWSKA P AND LESNER A. 2016. **Antimicrobial peptides (PAMs) as drug candidates: a patent review (2003–2015).** *Expert Opin Ther Pat* 26: 689-702.
- KOYA V, MOAYERI M, LEPPLA SH AND DANIELL H. 2005. **Plant-Based Vaccine: Mice Immunized with Chloroplast-Derived Anthrax Protective Antigen Survive Anthrax Lethal Toxin Challenge.** *Infect Immun* 73: 8266-8274.
- LARRICK JW AND THOMAS DW. 2001. **Producing proteins in transgenic plants and animals.** *Curr Opin Biotechnol* 12: 411-418.
- LEE MYT, ZHOU Y, LUNG RWM, CHYE M-L, YIP W-K, ZEE S-Y AND LAM E. 2006. **Expression of viral capsid protein antigen against Epstein-Barr virus in plastids of Nicotiana tabacum cv. SR1.** *Biotechnol Bioeng* 94: 1129-1137.
- LENZI P ET AL. 2008. **Translational fusion of chloroplast-expressed human papillomavirus type 16 L1 capsid protein enhances antigen accumulation in transplastomic tobacco.** *Transgenic Res* 17: 1091-1102.

- LIENARD D ET AL. 2007. **Suspension-cultured BY-2 tobacco cells produce and mature immunologically active house dust mite allergens.** *Plant Biotechnol J* 5: 93-108.
- LOH H-S, GREEN BJ AND YUSIBOV V. 2017. **Using transgenic plants and modified plant viruses for the development of treatments for human diseases.** *Curr Opin Virol* 26: 81-89.
- LÓPEZ-ABARRATEGUI C ET AL. 2015. **Cm-p5: an antifungal hydrophilic peptide derived from the coastal mollusk *Cenchritis muricatus* (Gastropoda: Littorinidae).** *FASEB J* 29: 3315-3325.
- MA JKC, CHIKWAMBA R, SPARROW P, FISCHER R, MAHONEY R AND TWYMAN RM. 2005. **Plant-derived pharmaceuticals - the road forward.** *Trends Plant Sci* 10: 580-585.
- MA JKC, DRAKE PMW AND CHRISTOU P. 2003. **The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants.** *Nat Rev Genet* 4: 794-805.
- MA S, HUANG Y, YIN Z, MENASSA R, BRANDLE JE AND JEVNIKAR AM. 2004. **Induction of oral tolerance to prevent diabetes with transgenic plants requires glutamic acid decarboxylase (GAD) and IL-4.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 5680-5685.
- MALANOVIC N AND LOHNER K. 2016. **Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides.** *Biochim Biophys Acta* 1858: 936-946.
- MANDAL SM, DEY S, MANDAL M, SARKAR S, MARIA-NETO S AND FRANCO OL. 2009. **Identification and structural insights of three novel antimicrobial peptides isolated from green coconut water.** *Peptides* 30: 633-637.
- MARILLONNET S, GIRITCH A, GILS M, KANDZIA R, KLIMYUK V AND GLEBA Y. 2004. **In planta engineering of viral RNA replicons: Efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6852-6857.
- MARILLONNET S, THOERINGER C, KANDZIA R, KLIMYUK V AND GLEBA Y. 2005. **Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants.** *Nat Biotechnol* 23: 718-723.
- MARSIAN J AND LOMONOSSOFF GP. 2016. **Molecular pharming—VLPs made in plants.** *Curr Opin Biotechnol* 37: 201-206.
- MCCORMICK AA ET AL. 2008. **Plant-produced idiotype vaccines for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: Safety and immunogenicity in a phase I clinical study.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 10131-10136.
- MEYER P AND SAEDLER H. 1996. **Homology-dependent gene silencing in plants.** *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 23-48.
- MEYERS B, ZALTSMAN A, LACROIX B, KOZLOVSKY SV AND KRICHEVSKY A. 2010. **Nuclear and plastid genetic engineering of plants: Comparison of opportunities and challenges.** *Biotechnol Adv* 28: 747-756
- MOJSOSKA B AND JENSSEN H. 2015. **Peptides and Peptidomimetics for Antimicrobial Drug Design.** *Pharmaceuticals (Basel)* 8: 366-415.
- NAGEL TE, CHAN BK, DE VOS D, EL-SHIBINY A, KANG'ETHE EK, MAKUMI A AND PIRNAY J-P. 2016. **The Developing World Urgently Needs Phages to Combat Pathogenic Bacteria.** *Front Microbiol* 7: 882.
- NGUYEN GKT, LIM WH, NGUYEN PQT AND TAM JP. 2012. **Novel Cyclotides and Uncyclotides**

with Highly Shortened Precursors from *Chassalia chartacea* and Effects of Methionine Oxidation on Bioactivities. *J Biol Chem* 287: 17598-17607.

NGUYEN LT, HANEY EF AND VOGEL HJ. 2011. **The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action.** *Trends Biotechnol* 29: 464-472.

OBEMBE OO, POPOOLA JO, LEELAVATHI S AND REDDY SV. 2011. **Advances in plant molecular farming.** *Biotechnol Adv* 29: 210-222.

PADIDAM M. 2003. **Chemically regulated gene expression in plants.** *Curr Opin Plant Biol* 6: 169-177.

PARACHIN NS AND FRANCO OL. 2014. **New edge of antibiotic development: antimicrobial peptides and corresponding resistance.** *Front Microbiol* 5: 1-2.

PARACHIN NS, MULDER KC, VIANA AA, DIAS SC AND FRANCO OL. 2012. **Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides.** *Peptides* 38: 446-456.

PELEGRINI PB, QUIRINO BF AND FRANCO OL. 2007. Plant cyclotides: **An unusual class of defense compounds.** *Peptides* 28: 1475-1481.

PERRY J, WAGLECHNER N AND WRIGHT G. 2016. **The Prehistory of Antibiotic Resistance.** *Cold Spring Harb Perspect Med* 6: 1-9.

PINTO MFS ET AL. 2016. **Characterization of a Bioactive Acyclotide from *Palicourea rigida*.** *J Nat Prod* 79: 2767-2773.

POGREBNIYAK N, GOLOVKIN M, ANDRIANOV V, SPITSIN S, SMIRNOV Y, EGOLF R AND KOPROWSKI H. 2005. **Severe acute respiratory syndrome (SARS) S protein production in plants: Development of recombinant vaccine.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9062-9067.

REGNARD GL, HALLEY-STOTT RP, TANZER FL, HITZEROTH II AND RYBICKI EP. 2010. **High level protein expression in plants through the use of a novel autonomously replicating geminivirus shuttle vector.** *Plant Biotechnol J* 8: 38-46.

SANTANA MJ, DE OLIVEIRA AL, QUEIROZ JÚNIOR LHK, MANDAL SM, MATOS CO, DE O. DIAS R, FRANCO OL AND LIÃO LM. 2015. **Structural insights into Cn-AMP1, a short disulfide-free multifunctional peptide from green coconut water.** *FEBS Lett* 589: 639-644.

SCHILLBERG S, ZIMMERMANN S, VOSS A AND FISCHER R. 1999. **Apoplasmic and cytosolic expression of full-size antibodies and antibody fragments in *Nicotiana tabacum*.** *Transgenic Res* 8: 255-263.

SHAALTIEL Y, GINGIS-VELITSKI S, TZABAN S, FIKS N, TEKOAH Y AND AVIEZER D. 2015. **Plant-based oral delivery of β -glucocerebrosidase as an enzyme replacement therapy for Gaucher's disease.** *Plant Biotechnol J* 13: 1033-1040.

SILVA ON, FENSTERSEIFER ICM, RODRIGUES EA, HOLANDA HHS, NOVAES NRF AND CUNHA JPA. 2015. **Clavanin A improves outcome of complications from different bacterial infections.** *Antimicrob Agents Chemother* 59: 1620-1626.

SILVA ON, MULDER KC, BARBOSA AE, OTERO-GONZALEZ AJ, LOPEZ-ABARRATEGUI C AND REZENDE TM. 2011. **Exploring the pharmacological potential of promiscuous host-defense peptides: from natural screenings to biotechnological applications.** *Front Microbiol* 2: 1-14.

SILVA ON ET AL. 2012. Cn-AMP1: **A new promiscuous peptide with potential for microbial**

infections treatment. Biopolymers 98: 322-331.

STOGER E, MA JKC, FISCHER R AND CHRISTOU P. 2005. **Sowing the seeds of success: pharmaceutical proteins from plants.** Curr Opin Biotechnol 16: 167-173.

STOGER E, SACK M, PERRIN Y, VAQUERO C, TORRES E, TWYMAN RM, CHRISTOU P AND FISCHER R. 2002. **Practical considerations for pharmaceutical antibody production in different crop systems.** Mol Breed 9: 149-158.

STREATFIELD SJ. 2007. **Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants.** Plant Biotechnol J 5: 2-15.

TAKAIWA F, TAKAGI H, HIROSE S AND WAKASA Y. 2007. **Endosperm tissue is good production platform for artificial recombinant proteins in transgenic rice.** Plant Biotechnol J 5: 84-92.

THANAVALA Y, YANG YF, LYONS P, MASON HS AND ARNTZEN C. 1995. **Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen.** Proc Natl Acad Sci U S A 92: 3358-3361.

TÖPFER R, MAAS C, HÖRICKE-GRANDPIERRE C, SCHELL J AND STEINBISS H-H 1993. **Expression vectors for high-level gene expression in dicotyledonous and monocotyledonous plants.** Methods Enzymol 217: 67-78.

TREGONING JS, CLARE S, BOWE F, EDWARDS L, FAIRWEATHER N, QAZI O, NIXON PJ, MALIGA P, DOUGAN G AND HUSSELL T. 2005. **Protection against tetanus toxin using a plant-based vaccine.** Eur J Immunol 35: 1320-1326.

TSCHOFEN M, KNOPP D, HOOD E AND STÖGER E. 2016. **Plant Molecular Farming: Much More than Medicines.** Annu Rev Anal Chem 9: 271-294.

TWYMAN RM, STOGER E, SCHILLBERG S, CHRISTOU P AND FISCHER R. 2003. **Molecular farming in plants: host systems and expression technology.** Trends Biotechnol 21: 570-578.

UHLIG T, KYPRIANOU T, MARTINELLI FG, OPPICI CA, HEILIGERS D, HILLS D, CALVO XR AND VERHAERT P. 2014. **The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation.** EuPA Open Proteom 4: 58-69.

WATKINS RR AND BONOMO RA. 2016. Overview: **Global and Local Impact of Antibiotic Resistance.** Infect Dis Clin North Am 30: 313-322.

WU L, JIANG L, ZHOU Z, FAN J, ZHANG Q, ZHU H, HAN Q AND XU Z. 2003. **Expression of foot-and-mouth disease virus epitopes in tobacco by a tobacco mosaic virus-based vector.** Vaccine 21: 4390-4398.

XU J, DOLAN MC, MEDRANO G, CRAMER CL AND WEATHERS PJ. 2012. **Green factory: Plants as bioproduction platforms for recombinant proteins.** Biotechnol Adv 30: 1171-1184.

YANG J, BARR LA, FAHNESTOCK SR AND LIU Z-B. 2005. **High yield recombinant silk-like protein production in transgenic plants through protein targeting.** Transgenic Res 14: 313-324.

YOO BY AND CHRISPEELS MJ. 1980. **The origin of protein bodies in developing soybean cotyledons: a proposal.** Protoplasma 103: 201-204.

ZHANG GG, RODRIGUES L, ROVINSKI B AND WHITE KA. 2002. **Production of HIV-1 p24 protein in transgenic tobacco plants.** Mol Biotechnol 20: 131-136.

ZHENG Y, HE M, HAO S AND HUANG B. 1992. **The Ultrastructural Evidence on the Origin of**

Protein Bodies in the Rough Endoplasmic Reticulum of Developing Cotyledons of Soybean.
Ann Bot 69: 377-383.

ZIMMERMANN S, SCHILLBERG S, LIAO Y-C AND FISHER R. 1998. **Intracellular expression of TMV-specific single-chain Fv fragments leads to improved virus resistance in shape *Nicotiana tabacum*.** Mol Breed 4: 369-379.

SOBRE A ORGANIZADORA

DIOCLÉA ALMEIDA SEABRA SILVA - Possui Graduação em Agronomia pela Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, atualmente Universidade Federal Rural da Amazônia (1998), especialização em agricultura familiar e desenvolvimento sustentável pela Universidade Federal do Pará – UFPA (2001); mestrado em Solos e Nutrição de Plantas (2007) e doutorado em Ciências Agrárias pela Universidade Federal Rural da Amazônia (2014). Atualmente é professora da Universidade Federal Rural da Amazônia, no Campus de Capanema - PA. Tem experiência agricultura familiar e desenvolvimento sustentável, solos e nutrição de plantas, cultivos amazônicos e manejo e produção florestal, além de armazenamento de grãos. Atua na área de ensino de nos cursos de licenciatura em biologia, bacharelado em biologia e agronomia. Atualmente faz mestrado e especialização em educação, na área de tutoria à distância.

ÍNDICE REMISSIVO

A

Adaptabilidade 57, 150
Água de lavagem 298, 300
Ambiente rural 136, 138
Anaerobic digestion 174, 175, 176, 177, 181, 182, 183, 184
Anisotropia 256, 257, 259, 260
Autonomia 50
Azoxystrobina 149

B

Bactéria 25, 28, 79, 86, 87, 205
Benzimidazol 149, 156
Biogás 175
Bradyrhizobium japonicum 262, 263, 265

C

Carica papaya 57, 58
Cessão de uso 109, 110, 113, 115, 116, 117, 118
Composição mineral 14, 281
Compostos bioativos 123, 124
Compostos fenólicos 123, 124, 201
Comunidade pesqueira 44, 55, 56
Conhecimento ecológico local 44, 46
Controle alternativo 1, 2, 8, 11
Correlação de pearson 219, 221, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230

E

Eficácia 15, 27, 149, 159, 160, 161, 162
Expressão transiente de genes 185, 193

F

Fertirrigação 298, 301, 304, 305, 306, 307, 309
Folhas 3, 5, 9, 74, 79, 80, 81, 83, 84, 85, 86, 88, 89, 90, 91, 123, 124, 134, 153, 154, 155, 185, 187, 190, 192, 193, 195, 201, 202, 203, 206, 207, 208, 212, 247, 262, 264, 265, 266, 268, 270, 271, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 280, 281, 282, 283, 302
Fosfito de cu 153, 154

G

Gases de efeito estufa 298, 304, 306, 307, 309

Germinação 66, 71, 74, 75, 76, 77, 78, 232, 235, 236, 237, 238, 239, 243, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254

Glicosídeos 123, 124

Glycine max 85, 150, 167, 262, 263, 278, 286

Grounded theory 107

H

Heterorhabditis 22, 23, 26, 30

Hormônios vegetais 166, 167, 170

Hortaliça não convencional 280, 281, 283

L

Licenciamento ambiental 109, 111, 113, 114, 116, 117, 118, 120, 121

M

Magnifection 185, 186, 214

Mancozeb 149, 150, 152, 154, 156, 157, 158, 162, 164

Maturidade fisiológica 246, 249

Meio ambiente 18, 46, 53, 82, 107, 111, 114, 115, 136, 137, 138, 140, 141, 145, 147, 298, 299, 300, 309

Método de garson 219, 222, 223, 224, 226, 227, 228, 229, 230

Microbioma 79, 81, 83, 85, 86, 89, 90, 91, 96

Mistura 16, 29, 68, 149, 158, 159, 168, 210, 265, 303

N

Nicotiana benthamiana 185, 186, 193, 204

Nitrogenase 262, 263, 267, 268, 275

Nova cultura de célula 124

O

Oro-pro-nobis 281

P

Peptídeos antimicrobianos 185, 186, 212

Percepção 48, 53, 56, 136, 138, 139, 142, 251

Pesquisa qualitativa 106, 108, 117, 136

Phaseolus vulgaris L 232, 233, 242, 243, 245, 246, 263, 278

Protioconazol 149, 153, 154, 156, 157, 158, 159, 160, 161

Q

Qualidade 10, 19, 20, 51, 57, 59, 91, 93, 104, 114, 115, 116, 117, 121, 137, 140, 142, 145, 146,

147, 151, 192, 204, 232, 233, 234, 235, 237, 238, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250,
251, 252, 253, 254, 255, 256, 259, 308

Qualidade da madeira 256, 259

R

Redutase do nitrato 262, 276

S

Saúde 10, 107, 115, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 144, 145, 146, 147, 186, 212, 281, 283

Sementes 3, 10, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 88, 152, 173, 192, 197, 201, 203, 232, 233, 234,
235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253,
254, 255, 262, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 281

Simbiose 23

Sistemas integrados 286

Steinernema parasita 23

Stimulate® 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172

U

Umidade da madeira 256

V

Variabilidade genética 18, 57

Vigor 63, 69, 77, 232, 233, 237, 238, 239, 240, 243, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252,
253, 254, 255

Vinhaça 175, 298, 300, 301, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309

Z

Zona costeira amazônica 44

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-825-0



9 788572 478250